

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
« 04 » квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БОНДАРЧУК Марії Олегівни
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Lactobacillus helveticus* для одержання
пробіотичного препарату

керівник роботи СТАРОВОЙТОВА Світлана Олександрівна, к.б.н., доц.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи 4 стадії підготовки посівного матеріалу в
інокуляторах 10л і 60л, та біосинтез у ферментері об'ємом 500л, коефіцієнт
заповнення 0,8. Тривалість культивування 24 год., температура 42±0,5оС.
Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині біомаси 6,8
г/л, Річна потреба у препараті 497 кг при 330 трудоднях.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Розділ 1. Характеристика цільового продукту біосинтезу;
Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; Розділ
3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4. Обґрунтування вибору
допоміжних стадій виробництва; Розділ 5. Специфікація обладнання; Розділ 6.
Опис технологічної схеми; Розділ 7. Контроль
виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А1; Технологічна схема 1 лист А1

РЕФЕРАТ

Даний дипломний проект присвячений культивуванню *Lactobacillus helveticus* для одержання пробіотичного препарату. Наведена характеристика *Lactobacillus helveticus* – продуцента пробіотичного препарату, описано обґрунтування вибору біологічного агента та наведена характеристика цільового продукту. *Lactobacillus helveticus* здатен виживати в агресивних умовах шлунково-кишковому тракті, може пригнічувати потенційні шкідливі бактерії і запобігати шлунково-кишковим інфекціям, модулювати імунні реакції хазяїна та впливати на склад кишкової мікробіоти. Здатні виробляти молочну кислоту як ефективний продукт метаболізму глюкози. [2]

Технологічна схема біосинтезу *Lactobacillus helveticus* включає допоміжні роботи (приготування та стерилізація титрувальних агентів, та приготування і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (4 стадії підготовки посівного матеріалу в інокуляторах 10л і 60л, та біосинтез у ферментері об'ємом 500л, коефіцієнт заповнення 0,8. Тривалість культивування 24 год., температура $42\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині біомаси 6,8 г/л, Річна потреба у препараті 497 кг при 330 трудоднях.

Курсовий проект викладений на 79 стор. друкованого тексту, містить 13 таблиць, 11 рисунків і складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (40 джерел).

Ключові слова: *Lactobacillus helveticus*, пробіотичний препарат, пробіотики.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	20
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	20
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	25
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	26
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	27
3.1. Потреба у біомасі <i>Lactobacillus helveticus</i>	27
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	28
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму.....	30
ферментера	30
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	30
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА	34
4.1. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	34
4.2. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.	35
4.2.1. Приготування і стерилізація ПС для колб	36
4.2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для	37
культивування в інокуляторі об'ємом 10 л	37
4.2.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для.....	38
культивування в інокуляторі об'ємом 60л	38
4.2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для.....	38

культивування в інокуляторі об'ємом 500л.....	38
4.3. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН.....	39
4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	40
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	54
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	58
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	68
7.1. Мікробіологічний контроль.....	68
7.2. Показники росту і синтезу	71
7.2.1. Концентрація біомаси.	71
7.3. Визначення концентрації джерела азоту	72
7.4. Визначення концентрації джерела вуглецю	74
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА.....	76

Вступ

В Україні біотехнологія є перспективним напрямом розвитку, оскільки має достатню науково-технічну базу. Проте серед факторів, які гальмують розвиток даної галузі є відсутність модернізованого обладнання, яке необхідне не тільки для проведення досліджень, а й для втілення в життя нових ідей, які б дозволили покращити стан навколишнього середовища і поповнити міжнародний ринок продуктами власного виробництва [1].

Пробіотики – живі мікроорганізми, які при введенні в достатній кількості приносять користь для здоров'я хазяїна. Нині відзначається постійний ріст захворювань, пов'язаних із порушенням біологічної рівноваги між макроорганізмом, тобто людиною, та різноманітними популяціями мікробної флори його окремих органів і систем, що склалася в процесі еволюції. Загальноновизнаною вважається участь нормальної мікрофлори людини у підтримці гомеостазу організму, формуванні механізмів імунітету, метаболізму. Важлива проблема сучасної медицини – дисбіотичні порушення нормальної мікрофлори людини. Найперспективнішим та найефективнішим підходом до лікування дисбіозів є використання пробіотичних препаратів.

Тому *актуальним* є пошук нових перспективних продуцентів пробіотичних препаратів, які будуть характеризуватися високою швидкістю росту та накопиченням біомаси на порівняно дешевих середовищах [2].

Новизна

Для отримання пробіотичного препарату використовується штам *Lactobacillus helveticus milano*, у якого порівняно з іншими штамми висока продуктивність виходу біомаси, яка становить 6,8 г/л клітин, та відносно просте та дешеве середовище для його культивування, що дозволяє рекомендувати даний штам до використання у виробництві пробіотичного препарату.

Штам характеризується такими пробіотичними властивостями: здатен виживати в агресивних умовах шлунково-кишкового тракту, може пригнічувати потенційні шкідливі бактерії і запобігати шлунково-кишковим інфекціям, модулювати імунні реакції хазяїна та впливати на склад кишкової мікробіоти. А його ферментна активність (синтезує фермент лактазу) допомагає кращому засвоєнню їжі та зменшує вплив алергенів.

					НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук М.О.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					7	79
Реценз.						Кафедра БТМ 8		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

Пробіотики – це живі мікроорганізми, які можуть позитивно впливати на здоров'я людини, нормалізувати склад і функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Вони можуть використовуватися в двох видах, як лікарський препарат та в якості функціональних продуктів харчування, а також БАД.

За механізмом дії препарати пробіотиків є багатофакторними лікувальними засобами. Вони мають антагоністичну активність щодо широкого спектру патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здійснюють коригуючий вплив на біоценоз та стимулюють репаративні процеси в кишечнику. За формою випуску пробіотики діляться на дві групи - рідкі та сухі.

Сухі пробіотики - це ліофілізовані мікроорганізми, які можуть перебувати у порошку, капсулах, таблетках. Термін зберігання сухих препаратів більш тривалий, ніж рідких, до того ж вони менш залежні від умов зовнішнього середовища і, таким чином, не вимагають суворого дотримання критеріїв зберігання. Тому багато фірм, особливо зарубіжних, вважають доцільним виробляти саме сухі пробіотики, які також набагато зручніші і в транспортуванні. Недолік сухих пробіотиків полягає в тому, що при ліофілізації бактерії втрачають частину своїх корисних властивостей, а після вживання препарату необхідно від 1 до 8-10 годин для переходу бактерій із анабіозу в активну форму та початку дії.

Рідкі пробіотики - це бактерії «з активною життєвою позицією», тобто вони зберігають всі свої цінні властивості і починають діяти відразу ж після потрапляння в організм.

					НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Бондарчук М.О.					9	79
Перевір.		Старовойтова С.О.				Кафедра БТМ ⁹		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Рідкі пробіотики можуть складатися з:

- бактерій, які знаходяться у фізіологічно активному стані;
- спеціального живильного середовища, що служить джерелом живлення фізіологічно активних бактерій;
- додатково введених інгредієнтів, які підсилюють ефективність препарату (водорозчинні вітаміни, мікро- і макроелементи, амінокислоти тощо);
- метаболітів (продукти життєдіяльності бактерій).

Згідно даних отриманих після проведення клінічних досліджень пробіотики можуть ефективно використовуватись при лікуванні наступних захворюваннях:

- Інфекційна діарея в немовлят і дітей, включаючи гостру інфекційну діарею та антибіотик-асоційовану діарею
- Діарея мандрівників
- Некротичний ентероколіт у немовлят
- Інфекція *Helicobacter pylori*
- Інфекції респіраторного тракту в дорослих і дітей
- Інфекції вуха, горла та носа (ЛОР-інфекції)
- Інфекційні ускладнення в хірургічних пацієнтів і хворих у критичному стані [1].

Вплив пробіотиків роду *Lactobacillus* на імунні функції

Табл. 1.1.

Імунологічний ефект	Пробіотичні штами	Джерела літератури
Підвищення фагоцитозу	<i>Lactobacillus acidophilus (johnsonii) La1</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> <i>Lactobacillus rhamnosus HN001</i>	1. Arunachalam, K., Gill, H., & Chandra, R. (2000). <i>Enhancement of natural immune function by dietary consumption of Bifidobacterium lactis (HN019)</i> . <i>European Journal of Clinical Nutrition</i> , 54(3), 263–267. doi:10.1038/sj.ejcn.1600938 2. Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J. M., & Schiffrin, E. J. (1999). <i>Modulation of Nonspecific</i>

		<p><i>Mechanisms of Defense by Lactic Acid Bacteria: Effective Dose. Journal of Dairy Science, 82(5), 863–869. doi:10.3168/jds.s0022-0302(99)75304-x</i></p> <p>3. Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J. M., & Donnet-Hughes, A. (1995). <i>Immunomodulation of Human Blood Cells Following the Ingestion of Lactic Acid Bacteria. Journal of Dairy Science, 78(3), 491–497. doi:10.3168/jds.s0022-0302(95)76659-0</i></p>
Підвищення активності природних кілерних клітин	<p><i>Lactobacillus rhamnosus HN001</i> <i>Lactobacillus casei subsp. casei</i> + декстран</p>	<p>1. Gill, H. S., Rutherford, K. J., Cross, M. L., & Gopal, P. K. (2001). <i>Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic Bifidobacterium lactis HN019. The American Journal of Clinical Nutrition, 74(6), 833–839. doi:10.1093/ajcn/74.6.833</i></p> <p>2. Sheih, Y.-H., Chiang, B.-L., Wang, L.-H., Liao, C.-K., & Gill, H. S. (2001). <i>Systemic Immunity-Enhancing Effects in Healthy Subjects Following Dietary Consumption of the Lactic Acid Bacterium Lactobacillus rhamnosus HN001. Journal of the American College of Nutrition, 20(2), 149–156. doi:10.1080/07315724.2001.10719027</i></p>
Стимуляція продукції імуноглобуліну (Ig) А	<p><i>Lactobacillus acidophilus (johnsonii) La1</i> <i>Lactobacillus casei rhamnosus GG</i></p>	<p>1. Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E. J., & von der Weid, T. (2003). <i>Divergent Patterns of Colonization and Immune Response Elicited from Two Intestinal Lactobacillus Strains That Display Similar Properties In Vitro. Infection and Immunity, 71(1), 428–436. doi:10.1128/iai.71.1.428-436.2003</i></p> <p>2. Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., & Vesikari, T. (1995). <i>Lactic Acid Bacteria in the Treatment of Acute Rotavirus Gastroenteritis. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 20(3), 333–338. doi:10.1097/00005176-199504000-00012</i></p> <p>3. Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T., Feldmann, K. A., & Feyereisen, R. (2002). <i>A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. The Plant Journal, 31(1), 1–12. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01328.x</i></p>

<p>Пригнічення проліферації лімфоцитів. Індукція апоптозу.</p>	<p><i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Lactobacillus casei</i> GG <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i></p>	<p>1. Carol, M., Borruel, N., Antolin, M., Llopis, M., Casellas, F., Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2006). <i>Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. Journal of Leukocyte Biology, 79(5), 917–922.</i> doi:10.1189/jlb.0405188</p> <p>2. CHAPIN III, F. Stuart, et al. Role of land-surface changes in Arctic summer warming. <i>science</i>, 2005, 310.5748: 657-660. doi: 10.1126/наука.1117368</p>
--	--	---

Lactobacillus helveticus – одна з понад 80 молочнокислих бактерій, що належить до роду *Lactobacillus*. *L. helveticus* підходить для дітей з перших днів життя. Зокрема, його призначають новонародженим, яких годують молочними сумішами. Вживання *L. helveticus* у таких немовлят покращує стан мікрофлори кишечника, яка страждає через відсутність достатньої кількості лактобактерій [2].

Як свідчать результати досліджень, у людей похилого віку щоденне споживання *L. helveticus* допомагає знизити артеріальний тиск та не призводить до будь-яких негативних наслідків. Це підтверджується дослідженням на 40 добровольцях.

Інше дослідження, яке проводилось серед пацієнтів віком 60–81 років, продемонструвало, що споживання ферментованого *L. helveticus* молока може поліпшувати сон.

Зокрема, споживання молока з *L. helveticus* протягом 3 тижнів здоровими людьми похилого віку призвело до зменшення кількості епізодів неспання та до загального поліпшення якості сну. Ці ефекти було підтверджені анкетуванням та аналізом результатів актиграфії (метод підрахунку рухів під час сну). Вважається, що цей ефект був обумовлений наявністю трипептиду, продукованого *L. helveticus* під час зброджування молока.

А у жінок від 50 до 78 вживання цього пробіотику не лише покращує метаболізм кальцію, а й впливає на зниження рівня паратиреоїдного гормону (ПТГ), який пов'язаний з втратою кісткової маси.[3]

На цьому список потенційних переваг *L. helveticus* не вичерпуються.

Попередні результати досліджень показали, що комбінація *L. helveticus* та *Bifidobacterium longum* може допомагати зменшувати симптоми тривоги та депресії.

Подвійне сліпе дослідження 2010 року, результати якого були опубліковані у *British Journal of Nutrition*, демонструє, що комбінація *L. helveticus R0052* і *B. longum R0175*, виявляє анксиолітичну активність у щурів, а також позитивні психологічні ефекти у здорових добровольців, про що свідчить про статистично значуще зниження тривоги, депресії та гніву у учасників досліджень, а також покращення вирішення проблем та зниження рівня кортизолу.

Анксиолітики – (від грец. *lytikos* — здатний розчиняти, ослаблюючий) психорелаксанти [4].

Специфікація Пробіокід

Найменування показників контролю	Встановлені значення	Методи контролю
Опис	Кремowo - білий порошок з вкрапленнями від бежевого до світло коричневого кольору у саше по 1,5 г	За п.1 АНД
Автентичність	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Rosell- грам-позитивні факультативно анаеробні палички розміром 10-12 мкм. Вживає в кисліших середовищах, ніж пов'язані види (рН 4-5 або менше) та оптимально росте за температурами близько 30°C. <i>Bifidobacterium bifidum</i> Rose <i>Bifidobacterium infantis</i> Rosell-облігатно анаеробні грам-позитивні палички, які не утворюють спор і відрізняються гіллястою морфологією довжиною 2 — 5 мкм.	За п.2 АНД
Розчинення	При додаванні води <i>P</i> із розрахунку 30-50 мл на 1 дозу(пакетик 1,5 г) препарату протягом 5-10 хв утворюється гомогенна суспензія сірувато-бежевого кольору	За п.3 АНД
Прозорість	Суспензія має бути непрозорою	За п.4 АНД
Забарвлення	Суспензія повинна мати бежевий з сіруватим відтінком колір	За п.5 АНД

рН	5,5-6,5	За п.6 АНД, ДФУ вид. 1 р.2.2.3. с.17, потенціометри чно
Втрата в масі при висушуванні	5%	За п.7 АНД, ДФУ, вид. 1, р.2.2.32, с. 49, ваги
Специфічна нешкідливість	Препарат має бути нешкідливим	За п.8 АНД
Мікробіологічна чистота	Препарат не повинен містити ніякої сторонньої мікробіоти	За п.9 АНД ДФУ 2.6.12
1. Специфічна активність: -визначення кількості живих лактобактерій в 1 дозі препарату. 2. Визначення активності кислотоутворен ня	В одній дозі препарату повинно міститися не менше 6,8 г/л <i>Lactobacillus helveticus Milano</i> Активність кислотоутворення визначають титриметричним методом.	За п.10 АНД За п.10.1 АНД
Виробничий штам	<i>Lactobacillus helveticus, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium bifidum</i>	За п.11 АНД
Герметичність	Пакетики з пробіотичним препаратом повинні бути щільно запаєні	За п.12 АНД
Зберігання	В сухому, захищеному від світла та недоступному для дітей місці при температурі не вище 25°C.	За п.13 АНД
Термін придатності	2 роки	За п.14 АНД

Методи контролю

ПРОБІОКІД

1.Опис

Препарат являє собою кремово - білий порошок з вкрапленнями від бежевого до світло коричневого кольору у саше по 1,5 г. Визначають візуально.

2. Автентичність

Lactobacillus helveticus - грам-позитивні факультативно анаеробні палички розміром 10-12 мкм. Виживає в кисліших середовищах, ніж пов'язані види (рН 4-5 або менше) та оптимально росте за температурами близько 30°C. *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* Rosell-облігатно анаеробні грам-позитивні палички, які не утворюють спор і відрізняються гіллястою морфологією довжиною 2 — 5 мкм. Контроль проводять за методикою підприємства.

3. Розчинення

При додаванні води *P* із розрахунку 30-50 мл на 1 дозу (пакетик 1,5 г) препарату протягом 5-10 хв утворюється гомогенна суспензія сірувато-бежевого кольору. Визначають візуально.

4. Прозорість

Суспензія має бути не прозорою. Визначають візуально

5.Забарвлення

Суспензія повинна мати бежевий з сіруватим відтінком колір. Визначають візуально

6. рН

рН повинно становити 5,5-6,5. Визначають потенціометрично.

7. Втрата в масі при висушуванні

Втрата при заморожуванні та сушінні буде становити 5%. Визначають за допомогою вагів.

8. Специфічна нешкідливість

Препарат має бути не шкідливим для білих мишей, його вводять перорально в кількості однієї дози (1,5 грама). Випробовування проводять на п'яти безпородних мишах різної статті масою 14-16 г. Вміст флакону розводять водою. Кожній миші перорально вводять за допомогою шприца 0,5 см³ отриманої суміші. Термін спостереження триває 5 діб. Результат дослідження вважається позитивним, коли всі миші після досліду залишилися живими. Якщо у разі досліду миші загинули або втратили вагу, то дослід продовжують

уже на 10 мишах. Якщо і в цьому випадку є негативні результати досліджень, то усю партію препарату бракують.

9. Мікробна чистота

Препарат не повинен містити сторонньої мікрофлори.

Для визначення мікробіологічної чистоти культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (інкубують 24–48 год за температури 42 ± 2 °C), і на чашки з сусло–агаром (СА) або глюкозо–картопляним агаром (ГКА) для виявлення дріжджів і грибів (інкубують 7 діб за температури 42 ± 2 °C). Для цього в асептичних умовах піпеткою відбирають 0,1 мл суспензії і вносять у чашку Петрі. Пропалюють шпатель Дригальського і охолоджують проводячи ним по кришці чашки Петрі. Потім обережно розподіляють суспензію шпателем по всій поверхні поживного середовища. Чашку перевертають, загортають у папір і поміщають у термостат. Після інкубації чашки виймають із термостата і оцінюють посіви візуально на наявність сторонньої мікрофлори. У разі виявлення в посівах сторонніх мікроорганізмів контроль проводять на подвоєній кількості зразків препарату. За відсутності росту мікроорганізмів у разі повторного висіву досліджуваний препарат вважають таким, що відповідає вимогам. Якщо сторонні мікроорганізми ростуть за повторного висіву зразків, то серію препарату бракують та утилізують.

10. Визначення кількості життєздатних біфідобактерій

Проводять висівом на чашки Петрі з середовищем МРС методом послідовних десятикратних розведень (метод Коха). Культивування триває 24 год за температури 42°C.

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл клітинної суспензії і поміщають у 9 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води. З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Висів здійснюють по 0,1 мл, починаючи з

найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку і новий стерильний шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат, Культивування триває 24 год за температури 42°C. Після закінчення культивування колонії підраховують. Кількість живих лактобактерій N в одній дозі визначають за формулою: $N = n \times 10^{m-1}$, де n – кількість колоній в одній чашці, m – величина розведення мікробної суспензії.

10.1. Визначення активності кислотоутворення

Активність кислотоутворення визначають титриметричним методом. Добові культури, центрифугують і за оптичним стандартом мутності готують суспензію 1 млрд кл/см³ у фізіологічному розчині. По 1 см³ такої суспензії вносять у пробірки з 9 см³ середовища МРС та культують за температури 37 °С в анаеробних умовах упродовж 24-48 год. З кожної пробірки відбирають по 5 см³ суспензії та титрують розчином 0,1 н гідроксиду натрію за наявності індикатора фенолфталеїну до появи слабо -рожевого кольору. Показник активності кислотоутворення, виражений у градусах Тернера, має становити не менш як 200. Кінцевий результат у градусах Тернера визначають за формулою: $T = AK \cdot 20$,

де T - об'єм 0,1 н лугу на титрування 100 см³ досліджуваного зразка, см³ ; A - об'єм , 1 н лугу на титрування 5 см³ суспензії , см ; K - коефіцієнт, що визначається при титруванні 0,1 н розчину лугу , 0,1 н бурштиною кислотою.

11. Виробничий штаб

Lactobacillus helveticus, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium bifidum.

12. Герметичність

Пакет з пробіотичним препаратом повинен щільно бути закупорений та не пропускати вологу та сторонні мікроорганізми.

13. Зберігання

В сухому, захищеному від світла та недоступному для дітей місці при температурі не вище 25°C.

14. Термін зберігання

2 роки при відповідних умовах. Після відкриття та використання не цілого саше зберігати не можна.

Біологічний агент та біологічні тест-системи. Виробничі штами.

Виробничий штам пробіотичного препарату « Probiokid» належить до виду *Lactobacillus helveticus*, роду *Lactobacillus*, родини *Lactobacillaceae*.

Штам *Lactobacillus helveticus*- паличкоподібна бактерія роду *Lactobacillus*, що продукує молочну кислоту.

Lactobacillus — рід грам-позитивних факультативно анаеробних бактерій здатними рости як у присутності кисню, так і без нього. *L. helveticus* термофільні бактерії, виробниче культивування і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 42°C та рН 5,9.

Лактобацили- хемоорганогетеротрофи. Дуже вимогливі до джерел харчування, потребують складних середовищ.

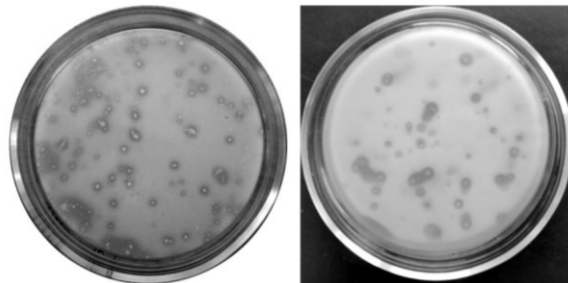


Рис.1. *Lactobacillus helveticus* на агарі

Виробничий штам даного пробіотичного препарату має бути безпечним для білих мишей при пероральному введенні його в кількості, що відповідає одній дозі даного препарату.

Пакування

Даний пробіотичний препарат фасується в пакетах-саше по 1,5г. В коробці міститься по 10 пакетиків- саше. В коробці міститься також інструкція та номер пакувальника.

Маркування

На пакетиках-саше фабрикою глибокого друку наносять українською або англійською мовою назву препарату, склад, показання, особливості вживання, номер серії, термін виробництва.

На пачці групової тари українською та англійською мовами нанесено: Lallemand S.A.S., Франція, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, лікарську форму, кількість пакетиків- саше в упаковці, «Для застосування перорально», умови зберігання, номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код.

Транспортування

Препарат транспортують у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури не вище 25 °С.

Зберігання

Зберігати в сухому, захищеному від світла, недоступному для дітей місці при температурі не вище 25°C.

Термін придатності.

2 роки [14].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Найчастіше в якості пробіотичних штамів використовують біфідобактерії, зокрема лактобацили, розглянемо декілька сучасних штамів *Lactobacillus helveticus*, які є основою пробіотичних препаратів.

У таблиці 2.1 наведена порівняльна характеристика продуцентів пробіотичних препаратів.

Lactobacillus helveticus GRL89 – синтезує біомаси 5,28 г/л, і синтезує дану кількість біомаси за 25 год культивування, та має відносно простий склад поживного середовища [6].

Lactobacillus helveticus milano в порівнянні з *L. helveticus* GRL89 має менший час культивування 24 год, використовує більш складне поживне середовище, та продукує більшу концентрацію біомаси – 6,8 г/л [7].

Lactobacillus helveticus ATCC 15009v – даний мікроорганізм серед наведених в таблиці має найбільшу концентрацію біомаси – 6,14 г/л, та має найбільший час культивування – 32 год [8].

Отже, порівнявши декілька продуцентів пробіотичних препаратів можна дійти висновку, що найбільш доцільно буде обрати як біологічного агента *L. helveticus milano*.

Для більш точного визначення найперспективнішого мікроорганізму для синтезу пробіотичного препарату розрахуємо вартість поживного середовища (табл.2.1).

НУХТ БТЕК 04. 01.05 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
		Бондарчук М.О.		
		Старовойтова С.О.		
		Стабніков В.П.		
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА				
		Літ.	Арк.	Акрюшів
		20	79	
Кафедра БТМ				20

Порівняльна характеристика продуцентів пробіотиків

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л / концентрація молочної кислоти, г/л	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Lactobacillus helveticus milano</i>	Порошок пермеату сироватки – 57 (лактоза – 48); CaCl ₂ – 3; Дріжджовий екстракт 20; триптичний пептон – 5; казеїновий пептон – 5.	6,8	24	t= 42°C, pH 5,9 ферментер V=2 л, регуляція pH – 10 М NaOH.	Amrane, A. Batch cultures of supplemented whey permeate using <i>Lactobacillus helveticus</i> : unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production.// <i>Enzyme and Microbial Technology</i> . – 2001. – Vol. 28, № 9-10. –P. 827–834. doi:10.1016/s0141-0229(01)00341-6
<i>Lactobacillus helveticus</i> GRL89	Лактоза -81; Дріжджовий екстракт 20;	5,28 / 50,08	25	t= 40°C, pH=5,7 біореактор Vроб= 600мл, без аерації, n=900 об/хв. Регуляція pH 6 М NaOH.	Kyla-Nikkila, K., Hujanen, M. Metabolic Engineering of <i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32 for Production of Pure L-(+)-Lactic Acid. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . – 2000. - Vol. 66, № 9. – P.3835–3841. doi:10.1128/aem.66.9.3835-3841.2000
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009v	Лактоза – 82 Дріжджовий екстракт – 23,36	6,14 / 59,38	32	pH 6,8, 40°C, ферментері V=3 л, n=150 об/хв, в анаеробних умовах, регуляція pH – 0,6 N NaOH	Leite, M. T., Barrozo, M. A. de S. Canonical Analysis Technique as an Approach to Determine Optimal Conditions for Lactic Acid Production by <i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009. <i>International Journal of Chemical Engineering</i> . – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–9. doi:10.1155/2012/303874

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
Lactobacillus helveticus штаму *milano*, *Lactobacillus helveticus* GRL89, та
Lactobacillus helveticus ATCC 15009v**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1-5)*
<i>Lactobacillus helveticus</i> штаму <i>milano</i>	Лактоза – 48	49	2,352	1
	CaCl ₂ – 3	65	0,195	2
	Дріжджовий екстракт – 20	1960	39,2	3
	Триптичний пептон – 5	6 802	34	5
	казеїновий пептон – 5	8336	41,68	4
	Вартість 1 л середовища – 117,427 грн			
<i>Lactobacillus helveticus</i> GRL89	Лактоза – 81;	49	3,969	1
	дріжджовий екстракт – 20;	1960	39,2	3
	Вартість 1 л середовища – 42,169 грн			
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009v	Лактоза – 82	49	4,018	1
	Дріжджовий екстракт – 23,36	1960	45,78	3
	Вартість 1 л середовища – 49,798 грн			

- [1.https://prom.ua/ua/p1241997202-laktoza-pischevaya-polmlek.html?gclid=aw.ds&utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=da&utm_campaign=KT_Produkty_pitaniya_napitki&gclid=CjwKCAiAxp-ABhALEiwAXm6IyVOWFQT99c07tncgvm5P4YOOOF7-u-FfNBTtnvmNgEH30-VTFv1CdpBoCUIgQAvD_BwE](https://prom.ua/ua/p1241997202-laktoza-pischevaya-polmlek.html?gclid=aw.ds&utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=da&utm_campaign=KT_Produkty_pitaniya_napitki&gclid=CjwKCAiAxp-ABhALEiwAXm6IyVOWFQT99c07tncgvm5P4YOOOF7-u-FfNBTtnvmNgEH30-VTFv1CdpBoCUIgQAvD_BwE)
- [2.https://klebrig.com.ua/ua/p1179966495-kaltsij-hloristyj-1kg.html](https://klebrig.com.ua/ua/p1179966495-kaltsij-hloristyj-1kg.html)
- [3. http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Yeast_Extract_250](http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Yeast_Extract_250)
- [4. https://shop.hlr.ua/pepton-tripton-merck-115290.html](https://shop.hlr.ua/pepton-tripton-merck-115290.html)
- [5.https://www.thomasci.com/Chemicals/Media-Components/_/Tryptone9?q=Casein%20Peptone%20%28tryptone%29](https://www.thomasci.com/Chemicals/Media-Components/_/Tryptone9?q=Casein%20Peptone%20%28tryptone%29)

6. Amrane, A. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production.// *Enzyme and Microbial Technology*. – 2001. – Vol. 28, № 9-10. –P. 827–834. doi:10.1016/s0141-0229(01)00341-6

7. Kyla-Nikkila, K., Hujanen, M. Metabolic Engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for Production of Pure L-(+)-Lactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. - Vol. 66, № 9. – P.3835–3841. doi:10.1128/aem.66.9.3835-3841.2000

8. Leite, M. T., Barrozo, M. A. de S. Canonical Analysis Technique as an Approach to Determine Optimal Conditions for Lactic Acid Production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *International Journal of Chemical Engineering*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–9. doi:10.1155/2012/303874

Розглянувши *таблицю 2.2* можна дійти висновку, що найнижчу вартість середовища має *Lactobacillus helveticus* GRL89 в порівнянні з *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009^v та *Lactobacillus helveticus* штам milano, у яких вартість більша у 1,1 та 3 рази відповідно.

Однак тривалість культивування в даних мікроорганізмів різна, тому для остаточного вибору найкращого біологічного агента проведемо розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту (*табл 2.3*).

Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні *Lactobacillus helveticus* штаму *milano*, *Lactobacillus helveticus* GRL89, та *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009v

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного пробіотику за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Lactobacillus helveticus milano</i>	6,8	24	0,283	117,427	17,26
<i>Lactobacillus helveticus</i> GRL89	5,28	25	0,211	42,169	7,98
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009v	6,14	32	0,191	49,798	8,11

Розглянувши показники з табл. 2.3, а саме, умовну вартість 1 г цільового продукту та кількості утвореного пробіотику за годину можемо стверджувати, що *L. helveticus* ATCC 15009v має найнижчу вартість 1 г цільового продукту в порівнянні з *L. helveticus* GRL89 та *L. helveticus milano*, однак даний мікроорганізм має нижчі показники кількості утвореної біомаси за годину – 0,191 г/год, відносно біологічного агента *L. helveticus milano* з кількості утвореного пробіотику за годину – 0,283 г/год.

Враховуючи дані з попередніх таблиць можемо зробити висновки, що незважаючи на меншу кількість синтезованої за годину біомаси, невелику вартість 1 г цільового продукту та невеликий час культивування, найбільш доцільним буде обрати біологічний агент – *Lactobacillus helveticus* GRL89. А також обраний штаму володіє такими основними пробіотичними властивостями - захисна функція полягає у: механічному захисті слизової оболонки за рахунок комплементарності гліколіпідів їхньої клітинної стінки до глікопротеїнів мембран ентероцитів; пригніченні патогенних та умовно

патогенних мікроорганізмів; конкуренції за поживні речовини; утворенні органічних кислот і багатоатомних спиртів, бактеріоцинів, пероксиду водню; зниженні рН у просвіті кишки. Імуномодулювальна дія виявляється у підвищенні фагоцитарної активності макрофагів і нейтрофілів; стимуляції утворення секреторного IgA; підвищенні вмісту цитокінів; продукції α -, β - і γ -інтерферонів [5].

Перевірочний розрахунок складу поживного середовища в даному випадку здійснювати не доцільно, оскільки, середовище для культивування *Lactobacillus helveticus* є складним та містить надлишкову кількість деяких компонентів, а перерахунок здійснюється тільки для синтетичних та напівсинтетичних поживних середовищ.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Штам *L. helveticus milano*, який є основою для виробництва пробіотичного препарату, характеризується такими морфолого — культуральними властивостями. Це прямі, не спороутворюючі палички, нерухомі розміром 10 – 12 мкм. [5] Загальний вигляд бактерії зображено на *рис. 2.1.*



Рис. 2.1 Lactobacillus helveticus milano

Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

По відношенню до кисню *Lactobacillus helveticus* – є факультативним анаеробом. Неспороутворюючі. Добре ростуть на поживному середовищі MRS. Здатні виробляти молочну кислоту як ефективний продукт метаболізму глюкози. Як правило, нерухливі і можуть виживати як

в аеробних, так і в анаеробних середовищах . Джерелом вуглецю та енергії при культивуванні є глюкоза. Хемоорганогетеротрофи, потребують збагачених середовищ для культивування. Метаболізм бродильного типу.

Активно засвоюють лактозу, галактозу, мальтозу, манозу; не ферментують маніт, рафінозу, арабінозу, стійкі до 0.4-0.5 % фенолу. Основними вуглеводами, ферментованими *Lactobacillus helveticus* шляхом гліколізу, є лактоза та галактоза. Оптимальний температурний режим становить від 35 до 45°C [5].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента[9].

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacili*

Порядок: *Lactobacillales*

Родина: *Lactobacillaceae*

Рід: *Lactobacillus*

Вид: *helveticus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у біомасі *Lactobacillus helveticus*

Найчастіше в якості пробіотичних штамів використовують біфідобактерії і молочнокислі бактерії, зокрема лактобацили. Ці пробіотики називають класичними, оскільки вони засновані на штамів, що домінують у різних біотопах людини, починаючи з перших днів життя. Зазначеним мікроорганізмам властива висока здатність до колонізації епітелію, що служить захисним бар'єром на шляху проникнення патогенної мікрофлори і, в свою чергу, забезпечує стабілізацію нормального складу мікробіоценозу за рахунок закислення середовища та синтезу антибіотичних речовин. Потрапляючи в сприятливі умови, лактобацили і біфідобактерії розмножуються й продукують багато біологічно активних речовин (органічні кислоти, ліпіди, провітаміни, імуномодулятори тощо), тим самим підвищуючи неспецифічну резистентність організму господаря. У процесі їх життєдіяльності утворюються вітаміни В1, В2 і К, а також молочна й оцтова кислоти. Кисле середовище сприяє кращому засвоєнню еукаріотичними клітинами жирів, вітамінів, іонів заліза і кальцію, затримує розмноження патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [10].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), число людей зі зниженим функціональним станом імунної системи постійно збільшується, що обумовлює загострення хронічних захворювань, у тому числі й викликаних умовнопатогенними мікроорганізмами. У зв'язку з цим і виникли питання про способи відновлення оптимальної мікрофлори, тобто мікроекології і ендоекології макроорганізму [11].

					НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бондарчук М.О.			Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Старовойтова С.О.				27	79
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

3.2. Розрахунок потужності виробництва

З кожним роком все збільшуються випадки заострень хвороб кишечника. Причин, що сприяють розвитку дисбіозу, досить багато. До найбільш поширених чинників, здатних викликати порушення складу нормальної мікрофлори, належать[12]:

- гострі та хронічні захворювання травного тракту (кишкові інфекції, коліти, ентерити та ін.);
- онкологічні захворювання;
- імунодефіцитні стани (ВІЛ-інфекція);
- ендокринна патологія (цукровий діабет);
- аутоімунні захворювання;
- алергії;
- глистяна інвазія;
- незбалансоване харчування;
- професійні шкідливості;
- нестача вітамінів і мікроелементів в організмі;
- шкідливі звички;
- нераціональне і безконтрольне застосування антибіотиків та інших медикаментозних препаратів;
- тривала гормональна, цитостатична або променева терапія;
- стрес;

Ця проблема є дуже актуальною, оскільки і у світі, і в Україні, збільшується захворюваність запальними захворюваннями кишечника. Це хронічні рецидивуючі захворювання, внаслідок яких відбувається запалення як і товстого, так і тонкого кишківника, і які здебільшого призводять до інвалідизації, важких ускладнень, хірургічних втручань.

Від гастроентерологічних захворювань страждають всі вікові групи населення: більшість пацієнтів знаходиться в працездатній групі, вдвічі менша частота поширення хвороб органів травлення (ХОТ) серед дітей, поширеність серед міського населення у 2 рази вища, ніж серед сільського.

Абсолютний показник захворюваності у 2017 р. становив 7 097 303 чол. [13].

Оскільки, є доволі висока конкуренція пробіотичних препаратів на ринку України, тому пропонується забезпечувати 1% потреб хворих даним пробіотиком. Далі розраховуємо кількість людей, яких будемо забезпечувати даним препаратом:

$$7\,097\,303 \text{ хворих} - 100\%$$

$$X \text{ хворих} - 1\%$$

$$X = \frac{7\,097\,303 \times 1\%}{100\%} \approx 71 \text{ тис. хворих}$$

Для початку, розрахуємо кількість пробіотику для одного прийому препарату для однієї людини:

1 пакетик-саше містить 1,5 г пробіотику (із загальної маси пакетика 750 мг займають саме про біотичні культури) [14]. При ХОТ прийом пробіотиків в середньому складає 10-14 днів, тому подальший розрахунок будемо вести саме на 14 днів - курс лікування, 2 пакетика-саше. Оскільки моноштамові пробіотики на основі запропонованого біологічного агента у науковій літературі не знайдено, припустимо, що штами в препараті знаходяться у рівному співвідношенні (*Lactobacillus helveticus* R0052, *Bifidobacterium infantis* R0033, *Bifidobacterium bifidum* R0071).

Таблиця 3.1

Розрахунок річної потреби у про біотичному препараті

Категорії хворих	Кількість клітин в одній дозі препарату на добу, мг	Кількість прийомів доз на добу	Тривалість лікування, діб	Загальна кількість хворих, яких плануємо забезпечити даним препаратом	Загальна кількість саше на всіх хворих (на курс лікування 14 днів), кг
1	2	3	4	5	6
Дорослі та діти старше 12 років	250	2	14	71000	497
Всього					497

Тоді $750/3 = 250$ мг *Lactobacillus helveticus*

Тоді $250 \text{ мг} \times 2 = 500$ мг/доба

$500 \text{ мг} \times 14 = 7000$ мг (7г) – на 14 днів

Тоді, курс для 71 тис. людей становить:

$71 \text{ тис. чол.} \times 7 \text{ г} = 497000 \text{ г} = 497 \text{ кг}$ – курс 14 днів

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 330, тоді кількість виробничих циклів становитиме:

$$N = T_{\text{роб.}} \times 24 / T_{\text{цф}} = 330 \times 24 / 34 = 232,9 = 233 \text{ цикли}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (24 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год).

Кількість сухого препарату за цикл:

$$G_{\text{ц}} = G_{\text{гп}} / N = 497 \text{ кг} / 233 = 2,1 \text{ кг/цикл}$$

Технологія отримання сухого пробіотику досить проста – сепарування для виділення біомаси, підготовка захисного середовища та змішування його з біомасою, ліофільне висушування. Втрати при сепаруванні – до 3-5 %, ліофільне висушування – до 3-5%, втрати при фасування в саше – 1-2%. Разом 12 %. Тому об'єм культуральної рідини (з урахуванням втрат) становить:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times G_{\text{ц}} \times CP / (P_{\text{кр}} \times (1 - E_{\text{гп}})) = 1,1 \cdot 2,1 \cdot 0,90 / (6,8 \cdot (1 - 0,12)) \approx 0,35 \text{ м}^3 = 350 \text{ л}$$

Робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{рф}} = V_{\text{кр}} = 350 \text{ л (для анаеробного процесу)}$$

Можливий геометричний об'єм ферментера при $K_3 = 0,8$

$V_{\text{мф}} = V_{\text{рф}} / K_3 = 350 / 0,8 \approx 437$. Найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\text{гф}} = 500$ л

Уточнюємо $K_3 = V_{\text{рф}} / V_{\text{гф}} = 350 / 500 = 0,7$, що відповідає визначеним межам (0,7-0,8).

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 350$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_f) = 350/(1-0,15) \approx 412\text{л},$$

де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$$V_{роб.1}=412\text{л}.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,7-0,8$ для анаеробного культивування розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (V_f), що становить

$$V_f = V_{роб.1}/K_{зап} = 412/0,8 \approx 515\text{л}.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 500\text{л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 412/500 = 0,82.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_f) = 412/(1+0,1) = 374\text{л},$$

де $X_f = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 412-374 = 38\text{л}.$$

Для одержання 214л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 38 / (1 - 0,10) \approx 42 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 42 / (1 + 0,1) = 38 \text{ л,}$$

де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 42 - 38 = 4 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 42 \text{ л}$ можна одержати під час культивування продуцента у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 42 / 0,8 \approx 52 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} \approx 60 \text{ л}$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 42 / 60 = 0,7.$$

Для одержання 4 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 4 / (1 - 0,10) \approx 4,4 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 4,4 / (1 + 0,1) = 4 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріала для інокулятора становить

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 4,4 - 4 = 0,4 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 4,4 \text{ л}$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 4,4 / 0,8 = 5,5 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} \approx 6$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{сф} = 4,4 / 6 = 0,73.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм3} = 0,4$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме $N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 400 / (750 \cdot 0,2) = 2,6$. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 500 л з коефіцієнтом заповнення 0,8 буде проходити у три етапи (колби на качалках, інокулятори 10 л та 60 л).

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Lactobacillus — рід грам-позитивних факультативно анаеробних бактерій здатними рости як у присутності кисню, так і без нього. При цьому кисень пригнічує бродіння, і воно змінюється диханням. Потреба у кисні під час біотехнологічного процесу відсутня. Періодично середовище перемішують, з низькими обертами мішалки (мішалку вмикають на 15-20хв кожну годину) для цього використовуємо лопатеву мішалку[15]. Але, для підтримки оптимального тиску в апарат, а також для перекачування посівного матеріалу з інокуляторів до ферментера, використовуємо трубу перетискування (зі збільшенням внутрішнього тиску в апараті стерильним повітрям).

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи (опромінення ультрафіолетовими променями).

Технологічна система стиснення та очищення повітря складається з трьох послідовно з'єднаних підсистем: очищення від пилу та стиснення; приведення повітря до термодинамічного стану з певною температурою та вологістю для утворення аерозолі; відділення аерозолі у фільтрах грубого та тонкого очищення.

Перша підсистема. Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті 20-30 м, де стабільна концентрація мікроорганізмів. Насамперед повітря потрапляє у фільтри попереднього очищення, в яких звільняється від грубого аерозолі - пилу. Фільтри попереднього очищення не тільки захищають компресори від забруднення,

					НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук М.О.			ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрівів
Перевір.		Старовойтова С.О.					34	79
Реценз.						Кафедра БТМ 34		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

а й істотно знижують кількість контамінантів, які могли б потрапити у другу підсистему. Після цього повітря стискають у турбокомпресорі [16].

Друга підсистема. Щоб забезпечити випадання вологи в краплевловлювачі, повітря «переохолоджують до температури 25-40 °С в теплообмінному апараті. Потім повітря потрапляє до ресиверу – де стабілізується та врівноважується тиск у системі. Після ресиверу повітря, для забезпечення надійної роботи фільтрів другого і третього рівнів, нагрівають до температури 70-90 с. При таких температурах не відбувається конденсація пари и на волокнах фільтра. З цією метою повітря після краплевловлювача підігрівають у теплообміннику, при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора. Кількість підмішуваного повітря визначається умовами відносної вологості, яка не повинна перевищувати 40%[18].

Третя підсистема. Складається з двох фільтрів другого і третього рівнів і очищення. Фільтр другого рівня, або головний фільтр, зазвичай розміщений на території заводу поруч із цехом. На головному фільтрі очищають повітря для усіх ферментаторів цеху. З головного фільтра повітря колектором подається в індивідуальні фільтри третього рівня, встановлені на кожному ферментаторі незалежно від його місткості[18].

4.2. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.

Метою стерилізації є звільнення поживного середовища від живих мікроорганізмів або їх форм спокою. Стерилізація поживного середовища залежить від фізико-хімічних властивостей його компонентів.

Середовище для виробничого біосинтезу має такий склад, г/л [17]:

- Порошок пермеату сироватки – 57;
- Лактоза – 48;
- CaCl_2 – 3;
- Дріжджовий екстракт – 20;
- Триптичний пептон – 5;

– Казеїновий пептон – 5;

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Lactobacillus helveticus milano*, оскільки біотехнологічний процес проходить в асептичних умовах, їх умовно ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

Композиція А: Лактоза, порошок пермеату сироватки, дріжджовий екстракт, триптичний та казеїновий пептони (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCl₂ (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Приготування поживних середовищ здійснюється у спеціальних реакторах (збірниках), обладнаних мішалками, а стерилізують вже безпосередньо у збірниках та підготовленому ферментері.

Згідно розрахунків, виробничий біосинтез буде здійснюється у ферментері об'ємом 500 л, що містить 374 л середовища. Одержання інокуляту відбувається у три етапи (у колбах на качалці та інокуляторах об'ємом 10л та 60л).

Таблиця 4.1.

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, л	Об'єм посівного матеріалу (10%), л	Конденсат (10%), л	Об'єм поживного середовища, л
500	0,8	412	38	38	374
60	0,8	42	4	4	38
10	0,8	4,4	0,4	0,4	4

4.2.1. Приготування і стерилізація ПС для колб

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *L. helveticus milano*, оскільки біотехнологічний процес проходить в асептичних умовах, їх умовно ділимо на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів). Об'єм поживного середовища в колбах на качалці складає 0,4 л.

Композиція А: Лактоза, порошок пермеату сироватки, дріжджовий екстракт, триптичний та казеїновий пептони (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCl_2 (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Приготування і стерилізація композиції А

Зважаючи на те, що об'єм композиції А невеликий, тому її будемо готувати в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Зважаючи на те, що об'єм композиції Б невеликий, тому її будемо готувати в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі – 131°C (тиск – 0,15 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

4.2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л

Композиція А: Лактоза, порошок пермеату сироватки, дріжджовий екстракт, триптичний та казеїновий пептони (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCl_2 (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л необхідно приготувати 4,4л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятору використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 0,4л, загальний об'єм композиції ≈ 4 л.

Приготування і стерилізація композиції А

Стерилізувати композицію А будемо безпосередньо в інокуляторі. Наважки поміщають ректор – змішувач і додають воду. Розчин, переносять у попередньо простерилізований інокулятор. Температура стерилізації – 112°C, тривалість 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

Приготування та стерилізація композиції Б

Зважаючи на те, що об'єм композиції Б невеликий, тому її будемо готувати в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі – 131°C (тиск – 0,15 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

4.2.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 60л

Композиція А: Лактоза, порошок пермеату сироватки, дріжджовий екстракт, триптичний та казеїновий пептони (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCl₂ (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Для культивування в інокуляторі об'ємом 60 л необхідно приготувати 42л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 4л, загальний об'єм композиції ≈ 38л.

Приготування та стерилізація композиції А

Стерилізацію проводять у реакторі – змішувачі, наважку завантажують та додають воду. Стерилізація відбувається при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Зважаючи на те, що об'єм композиції Б невеликий, тому її будемо готувати в окремій колбі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі – 131°C (тиск – 0,15 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

4.2.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 500л

Композиція А: Лактоза, порошок пермеату сироватки, дріжджовий екстракт, триптичний та казеїновий пептони (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція Б: CaCl_2 (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Для культивування у ферментері об'ємом 500 л необхідно приготувати 412л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 38л, загальний об'єм композиції ≈ 374 л.

Приготування та стерилізація композиції А

Стерилізацію проводять у реакторі – змішувачі, наважку завантажують та додають воду. Стерилізація відбувається при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

Приготування та стерилізація композиції Б

Стерилізувати композицію Б будемо безпосередньо у ферментері. Наважки поміщають у збірник – змішувач і додають водопровідну воду. Розчин переносять у попередньо простерилізований ферментер. Температура стерилізації – 131°C (тиск – 0,15 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

4.3. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Оскільки в процесі культивування *Lactobacillus helveticus* виділяє молочну кислоту, що призводить до зміни рН, яке не бажане, так як для кращого накопичення біомаси необхідно забезпечити оптимальний для продуцента рівень рН 5,9. Тому, має необхідність закупівля готового титруючого 25% розчину NH_4OH для виробничого ферментера (500л), а також для культивування в інокуляторах (60л та 10л). Зберігається на складі в заводських каністрах. Гарантійний термін зберігання – 1 рік з дати виготовлення. За даними розрахунками кількість титруючого розчину для виробництва посівного матеріалу та виробничого біосинтезу (з запасом) потрібно 1л 768мл, було прийнято рішення, що доцільніше та економічно вигідніше купувати саме готову аміачну воду від виробника для подальшого

використання на підприємстві. Аміак водний 25 %, чда Фасовка 1 л, коштує 62 грн. Оскільки у вільному продажі граничні об'єми каністр 1л, 5л та 10л, купуємо 2 пляшки по 1л. Є збірник для зберігання, об'єм якого 5л. NH_4OH - це розчин технічного аміаку у воді, лужної реакції, в якому частка аміаку складає не менше 25%. Безбарвна або жовтувата рідина з різким запахом, що містить 20-21 % азоту.

4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

1. Загальні нормативні вимоги, що пред'являються до мийних та дезінфікуючих засобів.

Очищення чистих приміщень та виробничого обладнання є обов'язковою вимогою GMP і важливим аспектом роботи фармацевтичного підприємства. А значить, питання вибору, обліку та обігу мийних і дезінфікуючих засобів вимагають кваліфікованого і вдумливого підходу, а не випадкового і хаотичного вибору. Основою вимогою є ДСТУ 2972:2010. [19]

Мийні засоби повинні бути:

- нешкідливими для здоров'я людини і не надавати токсичну, алергічне і шкірно-резорбтивна дія, а компоненти, що входять до складу мийних засобів не чинити на організм мутагенну, тератогенну, канцерогенну, ембріотоксичну дію;
- добре розчинятися у воді;
- володіти високими мийними властивостями
- легко і швидко змиватися з посуду, інвентарю тощо;
- біологічно руйнуватися у воді (більше 80%), тому що вони негативно впливають на процеси природного самоочищення і водні організми.

Мийні засоби не повинні:

- кумулюватися (накопичуватися) в організмі людини;
- мати різкий і стійкий запах;
- впливати на якість продуктів;
- надавати шкідливої дії на мийні об'єкти. [20]

Кожен дезінфікуючий засіб повинен відповідати певним вимогам ДСТУ EN14476:2018

Основні вимоги:

- 1) Виражена ефективність по відношенню до різних мікроорганізмів;
- 2) Низька токсичність та алергічність для людини ;
- 3) Екологічна нешкідливість;
- 4) Хороша розчинність у воді;
- 5) Нешкідливість по відношенню до об'єктів, які піддаються обробці;
- 6) Простота застосування
- 7) Тривалість терміну зберігання без втрати активності та додаткові вимоги- можливість їх застосування без засобів захисту;
- 8) Наявність мийних властивостей;
- 9) Здатність до очищення;
- 10) Не мати стороннього запаху [21].

Система менеджменту безпеки продуктів ХАССП вимагає від підприємств строго контролювати санітарно-гігієнічний стан виробництва. Кожне підприємство, розробляючи свою програму ХАССП, обов'язково включає в неї робочу програму миття та дезінфекції.[22]

2. Миючі засоби

Миючі засоби - детергенти (від лат. Detergere - очищати) - речовини, що володіють високою поверхневою активністю і в зв'язку з цим миючим, деяким дезінфікуючим і розчинюючим дією, що пов'язане зі здатністю цих речовин знижувати поверхневий натяг розчинника і здатністю видаляти різні забруднення [20].

Класифікація за агрегатним станом

Цей тип визначає миючий засіб в групу, в залежності від його агрегатного стану: порошкоподібний, пастоподібний, твердий або рідкий.

Порошкоподібні миючі засоби.

В основному їх використовують для очищення кахлю, емалі та інших поверхонь, яким не шкодить тертя.

Пастоподібні миючі засоби.

Найчастіше використовуються на автомийках, так як засоби у вигляді пасти не залишають подряпин на поверхні, а навпаки здатні відполірувати її до природного блиску.

Тверді засоби для миття- найбільш поширеним серед них є мило.

Рідкі засоби для миття.

Ці концентрати дозволяють відмити забруднення будь-якої складності, і гарантують при цьому відсутність пошкоджень поверхні [23].

Основними критеріями вибору синтетичних миючих засобів є їх ціна і миюча здатність. Більшість використовуваних синтетичних миючих засобів містить небезпечні речовини, які негативно впливають на здоров'я споживачів та навколишнє середовище. Їх небезпека полягає у важкому вимиванні небезпечних сполук із тканин та поганій біологічній розкладності [24].

Концентрація синтетичних миючих, засобів у миючому розчині не повинна перевищувати:

- 0,5 % - при ручному митті обладнання;
- 1,0 % - при механічному митті обладнання.

Концентрація каустичної соди у миючому розчині не повинна перевищувати:

- 0,2 % - при ручному митті обладнання;
- 2,0 % - при механічному митті обладнання.

При митті обладнання із алюмінію каустичну соду не застосовують. Концентрація кальцинованої соди у миючому розчині не повинна перевищувати:

- 0,5 % - при ручному митті обладнання;
- 2,0 % - при механічному митті обладнання.

Миття обладнання гарячою водою з температурою (60 - 80) град. С для повного видалення з поверхні обладнання миючих засобів. Миття

обладнання розчинами дезінфікуючих засобів або обробка парою для повного знищення мікрофлори, яка залишилася після миття [25].

У сучасному виробництві продуктів харчування вимоги до санітарного стану постійно підвищуються. Але в той же час підвищуються і стандарти біологічної та екологічної безпеки. Виробникам все важче стає знайти оптимальний баланс між ефективністю і безпекою дезінфікуючих засобів, які часто містять небезпечні для здоров'я хімічні речовини.

Було обрано такі миючі засоби:

- Миючий та дезінфікуючий засіб «Санікон»

Рідкий концентрований лужний миючий дезінфікуючий засіб з посиленою мийною дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних і генеральних прибирань і санітарної обробки.

Антимікробна активність.

Миючий дезінфікуючий засіб Санікон володіє широким спектром антимікробної активності, має бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну (кандидозів, дерматомікозів та ін. патогенних грибів і цвілі, в т. ч. *Aspergillus niger*), спороцидну (тест на *B.Subtilis* в спорових форм) дії.

Показники безпеки.

IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76). Не містить альдегідів, фосфатів, активного хлору, кисню та інших агресивних, високотоксичних, летких і екологічно небезпечних компонентів. Засіб дозволено для застосування в присутності пацієнтів та персоналу, що не бере участь в проведенні дезінфекції, не дратує органи дихання і очі.

Властивості.

Засіб добре змішується з холодною і гарячою водою в будь-якому співвідношенні. Водні розчини мають виражені мийні властивості, які посилюються при підвищенні температури робочих розчинів (розчини зберігають властивості при нагріванні до 90°C і сумісні з парою); не мають фіксуєної дії, видаляють органічні забруднення з поверхонь об'єктів обробки, добре змиваються, не залишають плям і нальоту. Робочі розчини не

ушкоджують поверхні об'єктів, виготовлених з металів, скла, полімерних матеріалів, гуми, пластмас, лакофарбове, гальванічне покриття, не знебарвлюють і не зменшують міцність тканин.

Застосування.

Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,2% до 5,0% в залежності від сфери застосування, цілі обробки, виду забруднення, збудника, об'єктів обробки. Норма витрати робочого розчину – 100 мл/м².

Способи обробки.

Ручний (протирання, зрошення, замочування, занурення), механізований (в т. ч. із застосуванням підлогомиїх машин), в ультразвуковому і циркуляційному миючому обладнанні, з піногенератором, аерозольний. [26]



Рис.1 Миючий і дезінфікуючий засіб «Санікон»

- ТМ 90 (ТМ90)- універсальний рідкий миючий засіб, призначений для ручного миття різних поверхонь на підприємствах харчової, молочної промисловості та на виробництві напоїв.

Властивості.

ТМ 90 (ТМ90) є слаболужним засобом, що містить суміш секвестрантів, змочуючих агентів і емульгаторів. Завдяки унікальній рецептурі він особливо ефективний при видаленні жирів тваринного і рослинного походження, а також білкових забруднень з підлоги, стін і будь-яких поверхонь, в тому числі поверхонь для приготування їжі. Крім того, засіб рекомендується для мийки зовнішніх поверхонь на переробних

підприємствах і миття транспортних засобів. ТМ 90 (ТМ90) має помірно низьке піноутворення і підходить для нанесення вручну або за допомогою підлогомиїх машин або за допомогою устаткування для пінної мийки низького тиску.

Спосіб застосування.

Рекомендована концентрація від 0.2- 2% за обсягом в залежності від типу і ступеня забруднення [27].



Рис.2 Миючий засіб ТМ 90 (ТМ90)

○ Бланідає

Концентрований миючий засіб з низьким рівнем піноутворення для миття всіх видів поверхонь.

Властивості:

- Засіб має нейтральний рівень рН.
- Низький рівень піноутворення.
- Швидко висихає, гарно очищає поверхню будь-якого забруднення з мінімальним дозуванням засобу.
- Не залишає брудних розводів.
- Не містить шкідливих речовин.

Сфера застосування:

Концентрований засіб для миття всіх видів поверхонь (стіл, підвіконь, підлоги, твердих меблів, обідніх столів, журнальних столиків, інших меблів

та їх твердих частин, робочих поверхонь, устаткування тощо) у закладах охорони здоров'я різного профілю, на підприємствах фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної, мікробіологічної, харчової та переробної промисловості, підприємствах комунального господарства, громадського харчування і торгівлі, на всіх видах транспорту, в учбових та дошкільних закладах, побуті та в інших закладах де потрібно дотримуватися належної гігієни.

Режими:

Мінімальне забруднення - 50-100мл на 10л води.

Максимальне забруднення -300-500мл на 10л води [28].



Рис.3 Миючий засіб «Бланідас»

3. Дезінфікуючі засоби

Дезінфектанти – хімічні засоби різноманітного походження, складу та призначення, що викликають загибель або припинення життєдіяльності мікроорганізмів і вірусів[29].

Одним з найпоширеніших методів дезінфекції є хімічний метод. При цьому використовуються хімічні речовини –дезінфікуючі засоби [20].

Дезінфікуючі засоби в гігієнічному відношенні повинні:

- мати широкий антимікробний спектр дії;
- володіти низькою токсичністю і алергічністю для людини;
- мати хорошу розчинність у воді або легко утворювати в ній суспензії, емульсії;
- діяти в можливо малих концентраціях і в можливо короткі терміни вбивати мікроорганізми;
- зберігати активність в незаражується середовищі;
- бути достатньо стійкими при зберіганні;
- чи не пошкоджувати оброблювані поверхні;
- бути доступними, дешевими і зручними в транспортуванні, при зберіганні і вживанні.

Найкраще середовище для контакту з мікробної клітиною - вода, тому в якості дезінфектантів використовують препарати, добре розчинні у воді. Наявність грудочок дезінфектанту в розчині або ті що знаходяться на дні, призводить до зменшення розрахункової концентрації робочих розчинів. При впливі дезінфікуючої речовини на мікробну клітину передусім має відбутися проникнення дезінфектанту в клітку, а потім - реакція між діючою речовиною і складовими частинами клітини [20].

Серед дезінфікуючих засобів найшвидше діють спирт та хлор, ефективність яких досягається за 2 хв на чистій поверхні при безпосередньому контакті з бактеріями; інактивація дезінфікуючих засобів може відбуватися за умов наявності мил, мийних засобів, жорсткої води, пластмас.

Високу антимікробну активність і широкий спектр дії мають сполуки на основі 5–6% надоцтової кислоти — дезоксони, які виявляють виражені бактерицидні, вірулоцидні, туберкулоцидні, фунгіцидні та спороцидні властивості. Дезоксони (дезоксон-0, дезоксон-4, делаксон, одоксон) мають один недолік — сильний запах оцту, що стримує їх широке застосування [30].

Для дезінфекції обладнання використовують (0,5 - 1,0) % розчини хлорного вапна, хлораміну або іншого дезінфікуючого розчину, дозволеного МОЗ України. Температура дезінфікуючих розчинів становить 15 - 20 °С [25].

Дезінфікуючі засоби:

- Амісепт- ДСТУ EN 14348:2014

Рідкий концентрований безхлорний засіб для проведення поточної, заключної, профілактичної дезінфекції і генеральних прибирань, для дезінфекції, очищення та стерилізації виробів медичного призначення, в тому числі ендоскопів, інструментарію, для дезінфекції посуду, санітарно-технічного обладнання, білизни тощо.

Засіб на основі третинних амінів і четвертинних амонійних сполук. Не містить хлор, альдегіди, окислювачі. Має активність по відношенню до збудників внутрішньо лікарняних інфекцій, інфекцій бактеріальної етіології, інфекцій грибової етіології (кандидози, дерматомікози, плісняві грибки), має спороцидні властивості [31].



Рис.4 Дезінфікуючий засіб «Амісепт»

- Полідез- ДСТУ/ГОСТ: ТУ У 24.2-216435506-003:2007

Має сильну бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну дію. Ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, аеробних, анаеробних мікроорганізмів. Зокрема, бактерій групи кишкової палички,

стрептококів, стафілококів, сальмонел, а також біоценозів бактерій, грибів, водоростей і амеб.

Призначений для дезінфекції всіх видів технологічного обладнання, комунікацій, ємностей, інвентарю, тари, спецодягу, транспортних засобів і поверхонь виробничих, допоміжних, побутових приміщень.

Спосіб застосування:

- Для приготування робочого розчину використовують ємності з будь-яких матеріалів (скла, полімерів, металів та ін.).
- Робочий розчин готують розведенням розчину «Полідез» водою, яку підігрівають до 30-40 ° С. Перемішувати розчин слід до повної однорідності і розчинення.
- Для приготування розчину, що відповідає концентрації, користуватись таблицею 1.
- Розчин зберігає свою протимікробну активність і придатний для проведення дезінфекції протягом 6 місяців від дати виготовлення. Допускається багаторазове використання розчинів.

Табл. 4.2.

Розрахунок для приготування розчинів дезінфікуючого засобу «Полідез».

Концентрація розчину по ДВ, %	Кількість засоби «Полідез», (мл) для приготування	
	1 л розчину	10 л розчину
0,05	2,4	24
0,1	4,8	48
0,3	14,4	144
1,0	48,1	481
1,5	72,1	721
2,0	96,2	962

2,5	120,0	1200
3,0	144,2	1442
5,0	240,0	2400

Концентрацію робочих розчинів «Полідез» вибирають в залежності від типу і ступеня забруднених поверхонь, способу проведення дезінфекції.

Мінімальна витримка засобу на поверхні становить 20 хвилин.

Переваги засобу:

- Хімічно стійкий в широкому інтервалі температур.
- Добре розчиняється у воді.
- Не має запаху.
- Після обробки поверхонь приміщення не надходить у повітря.
- Пожежо- та вибухо- безпечний.
- Не викликає корозії, не пошкоджує виробів з металів, гуми, лінолеуму, синтетичних, полімерних матеріалів, скла, дерева, бетону, цегли та ін.
- Застосовується для житлових і виробничих приміщень, лікувально-профілактичних, комунальних організацій, підприємств торгівлі і на транспорті.
- Забезпечує пролонгований знезаражуючий ефект внаслідок створення непомітною полімерної плівки, яка при необхідності змивається водою.
- Виявляє дезодоруючі властивості.
- У рекомендованих концентраціях не подразнює шкіру, слизову оболонку очей, і верхніх дихальних шляхів [32].



Рис.5 Дезінфікуючий засіб «Полідез»

○ Гуасепт- ДСТУ 7239:2011

Універсальний дезінфікуючий засіб у вигляді концентрату для знезараження поверхонь, дезінфекції ВМП, достерилізаційного очищення та стерилізації на основі ПГМГ. З інгібітором корозії. Діючою речовиною дезінфікуючого засобу Гасепт є водорозчинне полімерне гуанідинове з'єднання, високого ступеню очищення на основі 26% полігуанідинів (ПГМГ). Воно володіє дивовижним поєднанням фізико-хімічних властивостей і широким спектром біоцидної дії. Унікальність даного продукту в тому, що на поверхнях оброблених цим засобом може зберігатись антимікробна активність на тривалий термін від декількох днів до 8-ми місяців!

Склад: полігексаметиленгуанідину хлориду 26,0%±1,5%, допоміжні речовини.

Призначення:

-поточне, заключне, генеральне прибирання; можливість проведення екстреної дезінфекції об'єктів;

-дезінфекція суміщена з достерилізаційним очищенням виробів медичного призначення;

- стерилізація ВМП (вкл. жорсткі та гнучкі ендоскопи та інструменти до них; ДВР гнучких ендоскопів та інструментів до них;
- дезінфекції наркозно-дихальної апаратури;
- дезінфекція поверхонь за допомогою систем Вермоп;
- знезараження (дезінфекція) м'яких меблів та килимового покриття;
- для дезінфекції білизни в процесі прання у пральних машинах;
- дезінфекція поверхонь з метою профілактики та боротьби з пліснявою [33].



Рис.6 Дезінфікуючий засіб «Гуасепт»

○ Каустична сода - *ГОСТ 2263-79*

Універсальне високоефективне речовина, застосування якого призводить до гарних результатів у вирішенні ряду побутових проблем (очищення поверхонь, прання білизни тощо.). Вона здатна замінити багато хімічні засоби. Необхідно тільки дотримуватися запобіжних заходів при роботі з цією речовиною, слідувати рекомендаціям та інструкціям щодо застосування для конкретних видів робіт.

Каустична сода застосовується для чищення емальованих раковин, поверхонь плит, сильнозагязненняя кухонного посуду від жиру, кіптяви, нагару. Для цього потрібно змішати її з рідким миючим засобом або з пральним порошком, розвести водою до консистенції пасти, нанести на поверхню. Через 20-30 хвилин змити великою кількістю води.

Перевірений і ефективний спосіб очищення — кип'ятіння забрудненого посуду в розчині наступного складу:

- вода — 5 л;
- каустик — 100 г;
- стружка господарського мила — 50 г;
- клей канцелярський — 75 м

Ємність для кип'ятіння повинна бути емальований або сталевий. Розчин потрібно добре розмішати, довести до кипіння, опустити туди всю брудний посуд. Тримати на маленькому вогні металевий посуд 2 години, скляний і фарфоровий — 10 хвилин. Потім вийняти, добре прополоскати. Використовувати каустичну соду на оцинкованих, алюмінієвих і тефлоновим поверхнях не можна. Їх можна зіпсувати [34].

Отже, для миття та дезінфекції технологічного, обробного обладнання використовуємо засіб «Санікон», для ручного миття різних поверхонь на підприємствах використовуємо засіб «ТМ 90 (ТМ90)», для миття всіх видів поверхонь (стіл, підвіконь, підлоги, твердих меблів, обідніх столів, журнальних столиків, інших меблів та їх твердих частин, робочих поверхонь, устаткування, вікон використовуємо «Бланіда», для дезінфекції поверхонь, обладнання і апаратури – «Амісепт», для дезінфекції всіх видів технологічного обладнання, комунікацій, ємностей, інвентарю, тари, спецодягу, транспортних засобів і поверхонь виробничих приміщень – «Полідез», для поверхні в приміщеннях – «Гуасепт», а для обладнання – каустичну соду.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	2	Пристрій забірний, обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна
ФГО – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	<p>Модель: Фільтр ФяП</p> <p>Початковий аеродинамічний опір, Па, не більше: 60</p> <p>Пропускна спроможність, м3/година: 1540</p> <p>Висота, мм: 514</p> <p>Ширина, мм: 514</p> <p>Допустимо вміст пилу на вході, мг/м3: 1</p> <p>Фільтруючий матеріал: пінополіуретан</p> <p>Маса, кг: 3,4</p> <p>Питома повітряна навантаження, м3/(ч*м2): 7000</p> <p>Ефективність очищення %: 80±5 [1].</p>
К – 3	Компресор	1	Габарити: 1050*750*1000 mm. Маса: 400 kg. 0.7 - 1.2 м ³ /хв, 7-12 бар, 15 кВт [2].
ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	2	<p>Витрата: до 640 м³/год</p> <p>Робочий тиск: 140 атм.</p> <p>Температура: -195 °С - +220 °С</p> <p>Нержавіюча сталь AISI 316</p> <p>Виробник: Швеція [3].</p>
Р – 5	Ресивер	1	Ресивер повітряний, об'єм 1000 л, Розміри (ДхШхВ), мм 2100х900х900, вага 320кг. Виробник (Туреччина) [4].

НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Бондарчук М.О.		
Перевір.		Старовойтова С.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.
				54
			Кафедра БТМ	
			54	

ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	2	Монтажний розмір 1000 x 500 (мм), довжина 200 мм, приєднання труб муфтове G1. Потужність теплообмінника складає 80 кВт, при температурі теплоносія 70°C. Кількість повітря, м ³ /год: 7500 [5].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м ³ /год [6].
З-8	Збірник	1	Збірник об'ємом 5 л. Матеріал – нержавіюча сталь. Виробник: ХимМикс Країна виробник: Україна [7].
РЗ-9	Реактор – змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 8 л оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: ХимМикс Країна виробник: Україна [7].
РЗ-10	Реактор – змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 80л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Виробник: ХимМикс Країна виробник: Україна [7].
РЗ-11	Реактор – змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 200 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. Конструкція реактора дозволяє працювати як при вакуумі, так і при тиску до 4 атмосфер. Сорочка нагріву забезпечує нагрівання продукту до 160 градусів Цельсія. Виробник: ХимМикс Країна виробник: Україна [7].
РЗ-12	Реактор – змішувач	1	Об'єм – 10 літрів Циліндрична вертикально розташована ємність, що герметично роз'ясненнями ємна (фланцеве з'єднання єднання кришки з корпусом). Матеріал деталей контактуючих з продуктом сталь AISI316L, не контактуючих з продуктом сталь AISI304. Виробник: ХимМикс Країна виробник: Україна [7].
НВ-18	Насос відцентровий	1	Виробник: <i>Pedrollo</i> Насос відцентровий Максимальна температура робочої рідини: 90 град. Максимальний напір: 95 м Мінімальна температура робочої рідини: - 10 град. Напруга мережі: 380~400 В

			Пропускна здатність: 345 куб.м/год [8].
ІН-13	Інокулятор	1	Біореактор фірми «BIOSTAT® Cplus», геометричний об'єм 10 л, швидкість перемішування 20об/хв. [11],
ІН-15	Інокулятор	1	Біореактор фірми «BIOSTAT® Cplus», геометричний об'єм 60 л швидкість перемішування 1500об/хв, потужність 800Вт [12].
Ф-14 Ф-16 Ф-19	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Microfluor®II Стерилизующие фильтры из фторопласта. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %.
ФР-17	Ферментер	1	Ферментер геометричний об'єм 500 л, максимальна робоча температура + 150 0С, та додатково додатково має вставку з кільцеподібних ланок, закріплених на лопатях перемішувального пристрою [13].

1. ФІЛЬТР ФЯП Фильтр ячеювый [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://ventilator.ua/ua/product/filtr_fyap/#techincal
2. Винтовые компрессоры KESHIDI [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://compressor.dp.ua/vintovye-kompressory-keshidi?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=g&utm_content=526420020199&utm_term=%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BE%D1%80%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9&gclid=CjwKCAiA78aNbHAIeIwA7B76p1SeCNNdawIxyMW8ErUKDO3L6LQ6D_1oAHCJL7mCymJQnluBq1xfSBoCInwQAvD_BwE
3. Паяные теплообменники Swep [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://termoprom.com.ua/produkt/heat-exchangers/swep.php?gclid=cjwkaia78anbhaleiwa7b76p4phx1_vluisowtuzxn6nmoifxogg9frekvxufc5s5zb8ddburlkbocczkqavd_bwe
4. Ресивер Setkom 1000 LT/ DIK TANK [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kma-ukraine.com.ua/ua/p1482433495-resiver-setkom-1000.html>

5. Система підігріву повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php
6. Фильтр тонкой очистки воздуха [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>
7. Реактори-змішувачі [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/Reaktory-smesiteli.html>
8. Відцентровий насос Pedrollo серія F до 75 кВт. промисловий, фланцевий [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://aquaris.com.ua/ua/p532405365-tsentrobezhhnyj-nasos-pedrollo.html>
9. BIOSTAT® Cplus [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://www.sartogsm.ru/biostat_c_plus.html
10. BIOSTAT D-DCU [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors/stainless-steel-bioreactors/biostat-d-dcu>
11. Биореакторы для культивирования, ферментирующие Биореакторы [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://russian.alibaba.com/product-detail/bioreactor-cultivation-tanks-fermentor-bioreactor-62540791494.html?spm=a2700.7735675.normal_offer.d_title.3fcf6346TxAn07&s=p

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

Повітря, яке використовується для аерації у процесі культивування посівного матеріалу в інокуляторі та в процесі біосинтезу в ферментері, повинно бути стерильним та мати температуру 30–35°C.

Перед тим, як повітря потрапляє до ферментеру, воно проходить повну очистку та стерилізацію, в результаті якої звільняється від мікроорганізмів. Подальша стерилізація виробничого обладнання паром відбувається через подачу її через барботер.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється повітрозбірником (ПЗ-1) Повітря збирають з висоти приблизно 20-30 м.

Потім повітря через повітрозабірну шахту під дією вентилятора потрапляє до фільтру грубої очистки (ФГО-2).

ДР 1.2. Очищення від пилу і механічних часток.

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 150-300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки – ФЯП. Який складається з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої покладений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан).

Ефективність очищення повітряними фільтрами ФЯП становить 80 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стиснення повітря здійснюється у компресорі (К-3) при тиску 0,35–0,5 МПа, при цьому температура може підніматися до 200°C.

					НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук М.О.			ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					58	79
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.						58		
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Повітря «переохолоджують» до температури 25–40 °С в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4). При охолодженні стисненого повітря випадає 50 – 70 % вихідної вологи, яка відділяється вологовідділювачами.

ДР 1.5 Стабілізація та нагрівання

Для забезпечення надійної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 60°С в теплообміннику-нагрівачі (ТН-6).

ДР 1.6. Очищення в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-7). Для головних фільтрів використовується фільтр ФТО-750 з ефективністю $E = 99,92\%$. З головного фільтра (Ф-7) повітря подається в індивідуальні фільтр (Ф-21,23,26), які встановлені на кожному ферментері.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Для індивідуального очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр. Стерилізацію фільтруючого матеріалу проводять парою при температурі 145 °С. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,9999 %.

ДР 2. Зберігання аміачної води

$$2\text{мл/л} + 8\text{л} = 16\text{ мл(без запасу)}$$

$$16 \times 2 = 32\text{мл} - \text{для інокулятора } 10\text{л}$$

$$2\text{мл/л} \times 42\text{ л} = 44\text{ мл(без запасу)}$$

$$44 \times 2 = 88\text{мл- для інокулятора } 60\text{ л}$$

$$2\text{мл/л} \times 412\text{л} = 824\text{ мл (без запасу)}$$

$$824 \times 2 = 1648\text{ мл} - \text{для ферментера } 500\text{л}$$

Загалом: $1648 + 88 + 32 = 1768 = 1\text{л } 768\text{ мл (2л)}$. Для використання потрібно 2л NH_4OH . Зі збірника (З-8) передається трубопроводом (Т7.2) у ємність при виробничому устаткуванні (інокуляторах та ферментері) для автоматичної системи контролю рН. Титруючий розчин зберігається на складі, до подальшого використання.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища об'ємом 2 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках (табл. 6.1.).

Таблиця 6.1.

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	48	19,2	А	0,3
Порошок пермеату сироватки	57	22,8		
Дріжджовий екстракт	20	8		
Триптичний пептон	5	2		
Казеїновий пептон	5	2		
Вода		1,2	Б	0,1
CaCl_2	3	1,2		
Вода		0,2		
Разом:		0,4		0,4

Усі композиції готують у лабораторному посуді і стерилізують в автоклаві

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 19г лактози, 23г порошку пермеату сироватки, 8 г дріжджового екстракту, 2 г триптичного пептону та 2 г казеїнового пептону. Наважки композиції завантажують до колби об'ємом 0,5 л та за допомогою мірника додають 300 мл водопровідної води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,2 г CaCl_2 . Наважку поміщують у колбу об'ємом 0,2 л, і за допомогою мірника додають 100 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 10 л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 4,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 4,4 л поживного середовища наведено в (табл. 6.2).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 0,4 л (10% від загального об'єму займає посівний матеріал) рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 4 л (з урахуванням конденсату)).

Таблиця 6.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 4,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	48	211,2	А	3,9
Порошок пермеату сироватки	57	250,8		
Дріжджовий екстракт	20	88		
Трипичний пептон	5	22		
Казеїновий пептон	5	22		
Вода		3,12		
Конденсат		0,39		
CaCl_2	3	13,2	Б	0,1
Вода		0,1		
Разом:		4		4

*Враховуємо 10 % конденсату при подальших стадіях стерилізації

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 211г лактози, 251 г порошку пермеату сироватки, 88 г дріжджового екстракту, 22 г триптичного пептону та 22 г казеїнового пептону. Наважку компонентів композиції завантажують до реактора-змішувача (РЗ-9) об'ємом 8 л та додають, через конектор, за допомогою автоматизованого лічильника 3 л водопровідної води. Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Тоді, готовий розчин за рахунок самопливу подається до інокулятора. Стерилізувати композицію А будемо безпосередньо в малому інокуляторі. Температура стерилізації – 112°C, тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 72 г CaCl_2 . Наважку поміщають у колбу об'ємом 0,2 л, і додають за допомогою мірника 100 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 60 л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 42 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 42 л поживного середовища наведено в (табл. 6.3.).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 4 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 38 л (з урахуванням конденсату)).

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 42 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 42 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	48	2016	А	37
Порошок пермеату сироватки	57	2394		
Дріжджовий екстракт	20	840		
Триптичний пептон	5	210		
Казеїновий пептон	5	210		
Вода		33,3		
Конденсат		3,7	Б	1
CaCl ₂	3	126		
Вода		1		
Разом:		38		

**Враховуємо 10 % конденсату при подальших стадіях стерилізації*

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 2016г лактози, 2394 г порошку пермеату сироватки, 840 г дріжджового екстракту, 210 г триптичного пептону та 210 г казеїнового пептону. Наважку компонентів композиції завантажують до реактора-змішувача (РЗ-10) об'ємом 80 л та через конектор, за допомогою автоматизованого лічильника додають 33 л водопровідної води. Тоді, готовий розчин за рахунок самопливу подається до інокулятора. Стерилізувати композицію А будемо безпосередньо в інокуляторі. Температура стерилізації – 112°C, тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних зважують 126 г CaCl₂. Наважку поміщають до колби об'ємом 2л, і додають за допомогою мірника 1 л водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера 500л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 412 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 412 л поживного середовища наведено в (табл. 6.4.).

Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 38 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 374 л (з урахуванням конденсату)).

Таблиця 6.4.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 412 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 412 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Лактоза	48	19776	А	100
Порошок пермеату сироватки	57	23484		
Дріжджовий екстракт	20	8240		
Триптичний пептон	5	2060		
Казеїновий пептон	5	2060		
Вода		90		
Конденсат		10	Б	274
CaCl ₂	3	1236		
Вода		246,6		
Конденсат		27,4		
Разом:		374		374

**Враховуємо 10 % конденсату при подальших стадіях стерилізації*

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 20 кг лактози, 23кг порошку пермеату сироватки, 8,2 кг дріжджового екстракту, 2кг триптичного пептону та 2кг казеїнового пептону. Наважку компонентів композиції завантажують до реактора-змішувача (РЗ-11) об'ємом 200 л та через конектор, за допомогою автоматизованого лічильника додають 100 л водопровідної води.

Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. Подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 112°C, тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Тоді, самопливом стерильна композиція *Б* перетікає до виробничого ферментеру (ФР-24).

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,2кг CaCl₂. Наважку поміщають до збірника-змішувача (РЗ-12) об'ємом 10л, та за допомогою автоматизованого лічильника додають 5 л водопровідної води, перемішують (весь інший об'єм завантажують безпосередньо до ферментера ≈ 240 л). Тоді, готовий розчин солей самопливом перетікає до ферментера (ФР-24). Стерилізація композиції *Б* буде відбуватися безпосередньо у виробничому ферментері. Подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримка колекційної культури

Колекційну культуру *Lactobacillus helveticus milano*, зберігають у стані ліофілізації в запаяних флаконах (ампулах) за температури- 4 С°, пересіви роблять раз на 3- 4 місяці.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Відкриваємо запаяні флакони (від ТП 4.1) та піпеткою в асептичних умовах вносимо 5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію та перемішуємо. Тією ж піпеткою переносимо в пробірки з приготованим середовищем МРС. Вирощуємо протягом 48 год при температурі 38°C.

ТП 4.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу, у 13 стерильних качалочних колбах об'ємом 750мл, в асептичних умовах наливають по 250 мл поживного середовища від ДР3.1.

У пробірку з робочою культурою *L. helveticus milano* (від ТП 4.2), вирощеною на агаризованому МРС середовищі, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Вирощування *L. helveticus milano* ведуть у колбах на круговій качалці (150 об/хв) при температурі 38°C впродовж 48 год. З колби відбирають пробу для мікробіологічного контролю (відсутність сторонньої мікробіоти та наявність робочої культури).

ТП 4.4. Вирощування в інокуляторі 10л

У попередньо простерилізований інокулятор з 2 л (ІН-13) композиції Б (від ДРЗ.2.2) через конектор стерильно вносять композицію А (від ДРЗ.2.1). Охолоджують компоненти суміші в інокуляторі шляхом подачі холодної води в рубашку апарата (40±0,5°C). Після цього, через факел через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 4.3.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку, температуру 42±0,5°C підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 24 год (під час культивування проводять періодичний контроль КР для мікробіологічного аналізу). Для створення надлишкового тиску при виробничому культивуванні (щоб уникнути вакууму), в апарат подають стерильне очищене повітря.

ТП 4.5. Вирощування в інокуляторі 60л

У попередньо простерилізований інокулятор з 86 л (ІН-15) композиції Б (від ДРЗ.3.2) через конектор стерильно вносять композицію А (від ДРЗ.3.1). Охолоджують компоненти суміші в інокуляторі шляхом подачі холодної води в рубашку апарата (40±0,5°C). Після цього, через трубу перетискання вносять посівний матеріал (від ТП 4.4.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку, температуру 42±0,5°C підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 24 год (під

час культивування проводять періодичний контроль КР для мікробіологічного аналізу). Подача кисню відбувається через верхній пуск апарату. Подальша стерилізація виробничого обладання парою відбувається через подачу її через барботер.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом 500л (ФР-17) (робочий об'єм – 412 л). У попередньо простерилізований ферментер з розчином солі (від ДР 3.4.2) самопливом, вносять композицію А (від ДР 3.4.1). Охолоджують компоненти суміші у ферментері. Далі через трубу перетискання подається посівний матеріал (від ТП 4.5). Перемішуючим пристроєм слугує турбінна мішалка закритого типу, якою обладнаний ферментер. Вмикають мішалку (перемішування вмикають - на 15-20 хв. кожну годину і кількість обертів мішалки - низька), температура $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, тривалість культивування 24 год. Під час процесу культивування у середовищі накопичується молочна кислота яка змінює рН середовища. Для підтримки оптимального значення рН 5,9 використовуємо титруючий агент NH_4OH – подається зі збірника (3-8) автоматично за зміною значення рН середовища.

Культивування припиняють при досягненні у культуральній рідині концентрації клітин 6,8 г/л. Кожні 4 год з ферментера відбирають 20 мл зразку культуральної рідини для мікробіологічного аналізу (відсутність сторонньої мікробіоти та концентрація біомаси культури).

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

Зважаючи на те, що культивування *Lactobacillus helveticus* з метою одержання пробіотиків проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації сторонньою мікрофлорою.

Кожні 4 год з ферментера відбирають 20 мл зразку культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: мікроскопіюванням та висів на агаризовані поживні середовища.

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійної олії. У полі зору мають спостерігатися лише клітини біологічного агента *Lactobacillus helveticus*: прямі, не спороутворюючі палички, нерухома розміром 10 – 12 мкм. Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки олії з імерсійного об'єктива. Загальний вигляд бактерії зображено на *рис. 5.1*.

					НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бондарчук М.О.			Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Старовойтова С.О.				68	79
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		
					68		



Рис. 7.1 Lactobacillus helveticus

Для визначення мікробіологічної чистоти культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (інкубують 24–48 год за температури 42 ± 2 °С), і на чашки з сусло–агаром (СА) або глюкозо–картопляним агаром (ГКА) для виявлення дріжджів і грибів (інкубують 7 діб за температури 42 ± 2 °С). Для цього в асептичних умовах піпеткою відбирають 0,1 мл суспензії і вносять у чашку Петрі. Пропалюють шпатель Дригальського і охолоджують проводячи ним по кришці чашки Петрі. Потім обережно розподіляють суспензію шпателем по всій поверхні поживного середовища. Чашку перевертають, загортають у папір і поміщають у термостат. Після інкубації чашки виймають із термостата і оцінюють посіви візуально на наявність сторонньої мікрофлори [35].

7.1.1 Кількості життєздатних клітин проводять висівом на чашки Петрі з середовищем МРС методом послідовних десятикратних розведень (метод Коха). Культивування триває 24 год за температури 42°С.

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл клітинної суспензії і поміщають у 9 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води. З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів на поверхню агаризованого середовища у чашки Петрі. Висів здійснюють по 0,1 мл,

починаючи з найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку і новий стерильний шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат, Культивування триває 24 год за температури 42°C. Після закінчення культивування колонії підраховують. Підрахунок клітин здійснюється за допомогою електронного обладнання. [36]. Підготовка штаму *Lactobacillus helveticus* до селекційної роботи включає приготування суспензії культури за стандартом каламутності та визначення її титру або КУО, тобто концентрації бактеріальних клітин у ній. Для отримання розведення в 100 разів (10⁻²) з пробірки з суспензією піпеткою переносять 0,05 см³ суспензії в іншу пробірку з 5 см³ ФР, а для отримання розведення в 10 разів (10⁻¹) переносять 0,5 см³ суспензії. Отриману суспензію розводять у пробірках із 5 см³ стерильного ФР послідовно в 100 разів (в 10⁻²), ще раз в 100 разів (в 10⁻⁴) та ще раз в 10 разів (в 10⁻⁵). При виконанні кожного етапу розведення піпетка змінюється на нову, перед розведенням суспензія в пробірці обережно перемішується, щоб клітини рівномірно розподілились в суспензії, перемішування виконують таким чином, щоб рідина не змочувала ватно-марлеву пробку. Розведену таким чином суспензію 1:10000 (в 10⁻⁴) і 1:100000 (в 10⁻⁵) висівають мікропіпеткою по 0,02 см³ на МПА в трьох повторях та обережно розтирають по поживному середовищі пропаленим та охолодженим шпателем. Однією і тією ж мікропіпеткою можна провести висів на чашки Петрі спочатку більшого розведення (1:100000), потім меншого (1:10000). Кількість живих лактобактерій N в одній дозі визначають за формулою: $N = n \times 10^{m-1}$, де n – кількість колоній в одній пробірці; m – величина розведення мікробної суспензії. Насамперед враховують результат у ряду розтитровування РСЗ. Якщо ріст бактерій спостерігається в розведенні не менше, ніж 10⁻¹⁰, це свідчить про задовільні ростові властивості поживного середовища та достовірність результатів аналізу. Якщо в ряду розведень РСЗ ріст спостерігається в розведенні

меншому, ніж 10^{-10} , то дослід необхідно повторити на іншій серії поживного середовища. Препарат вважають придатним, якщо ріст лактобактерій в ряді десятикратних розведень досліджуваного препарату відмічається не менше, ніж у пробірці з розведенням 10^{-10} , що відповідає вмісту 10^9 КУО живих мікробних клітин в одній дозі. Якщо вміст живих мікробних клітин в одній дозі досліджуваного препарату менше, ніж 10^9 КУО, а в 1 мл РСЗ – 10^9 КУО, тоді контроль необхідно повторити на подвоєній кількості зразків. Якщо при повторному контролі показники РСЗ відповідають пред'явленим вимогам, а показники досліджуваного препарату нижче, то серію препарату бракують [40].

7.2. Показники росту і синтезу

У процесі біосинтезу проводять періодичний контроль таких параметрів: концентрація біомаси, джерела вуглецю та азоту. Також проводять постадійний контроль.

7.2.1. Концентрація біомаси.

Концентрацію біомаси визначають ваговим методом. Він складається із трьох послідовних операцій: доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення, відділення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини, визначення їх маси.

Спочатку фільтри, попередньо покладені у відкриту чашку Петрі поміщають у сушильну шафу й висушують протягом 1-2 год при температурі $80-85^\circ$ й $90-100^\circ$ відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами виймають із сушильної шафи й переносять в ексікатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl_2) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексікатор ставлять біля аналітичних ваг, на яких буде проводитися зважування. Через годину фільтри зважують із точністю до 0,0001 г. Висушування й зважування повторюють, дотримуючись зазначеної послідовності операцій, доки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її значеннях не перевищать $\pm 0,0001$ г .

Відділення мікроорганізмів від середовища можливо центрифугуванням або фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають у скляну лійку й фільтрують через нього точно вимірний обсяг культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багаторазово промивають підкисленою дистильованою водою [37].

Щоб визначити масу сухих клітин, фільтр із осадом клітин поміщають у сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування й зважування той же, що використовується при визначенні маси фільтрів. Суху біомасу визначають за формулою:

$$M = ((A - B) \cdot 1000) / V$$

де M — суха біомаса в г/л;

A — маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г;

B — маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г;

V — обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл [37]

7.3 Визначення концентрації джерела азоту

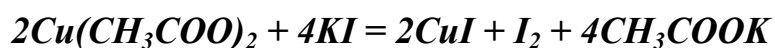
Основним джерелом азоту в даному середовищі є порошок пермеату сироватки.

Амінним називається азот, який входить до вільних аміногруп ($-NH_2$) амінокислот та інших продуктів гідролізу білків. Його визначають при вивченні активності протеолітичних ферментів, складу форм азотистих з'єднань в сировині, напівпродуктах і товарній продукції, а також в інших випадках, наприклад, при вивченні реакції утворення меланоїдинів, тощо [38].

Визначення концентрації джерела амінного азоту проводять мідним способом. В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $Cu_3(PO_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні

з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [39].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину добавляють йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентному кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію.

Техніка аналізу. В мірну колбу місткістю 50 см³ піпеткою вносять 5 см³ культуральної рідини, додають 3-4 краплини індикатору тімолфталейну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм³ до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 см³ суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим [39].

10 см³ абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 см³ 80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 см³ розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 см³ фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, що пішла на титрування, на 0,28. Це відповідає з урахуванням розчинення 1 см³ суслу. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = \frac{a \times 0,28 \times b \times 10 \times 100}{50} \text{ мг в } 100 \text{ см}^3$$

де а – розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³, який пішов на титрування, см³; б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, см³.

7.4 Визначення концентрації джерела вуглецю

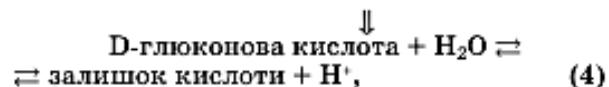
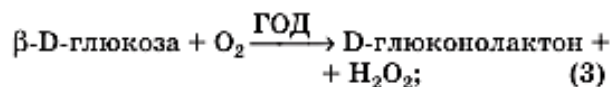
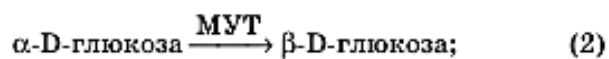
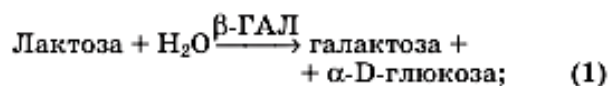
Джерелом вуглецю в даному середовищі є лактоза (молочний цукор). Концентрацію лактози визначаємо за допомогою лактозного біосенсора.

Методика вимірювання



Вимірювання проводили у калій-фосфатному буферному розчині різної молярності за різних значень рН при кімнатній температурі у відкритій комірці з інтенсивним перемішуванням. Спочатку сенсор розміщували у комірці для вимірювання об'ємом 2 мл. заповненій фосфатним буферним розчином. Для одержання стабільного початкового сигналу (базової лінії) сенсор вимочували деякий час у буферному розчині. Потім для отримання сигналу на субстрат необхідної концентрації в комірку додавали певну аліквоту стандартного концентрованого вихідного розчину субстрату. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливанням температури, рН середовища, коливаннями напруги в мережі, нівелювалися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань, тобто вимірювали різницю сигналів із двох пар електродів з активною та неактивною мембраною, розташованих на одному перетворювачі.

В основі роботи кондуктометричної біосенсорної системи для визначення лактози лежить каскад ферментативних реакцій:



де β -ГАЛ - β -галактозидаза, МУТ - мутаротаза, ГОД-глюкозооксидаза.

β -Галактозидаза, мутаротаза та глюкозооксидаза поетапно розщеплюють лактозу до пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон, у свою чергу, спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку й можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача. Оскільки лактозний сенсор дає відгук і на глюкозу, і на лактозу, для визначення саме лактози необхідно є наявність також глюкозного сенсора. У зв'язку із цим вимірювання лактози в зразках слід проводити у два етапи. Спочатку визначаємо концентрацію глюкози в зразку глюкозним сенсором, а потім - сумарну концентрацію лактози - глюкози у досліджуваному розчині за допомогою лактозного сенсора. Різниця цих двох концентрацій відповідає концентрації лактози в розчині [39].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Купко Н.В. Застосування пробіотиків для профілактики та лікування інфекційних захворювань/Купко Н.В.//Дитячий лікар. – 2011 – 4 (11)' 2011. – с. 62-72. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://d-l.com.ua/ua/archive/2011/4%2811%29/pages-62-72/zastosuvannya-probiotikiv-dlya-profilaktiki-ta-likuvannya-infekciynih-zahvoryuvan>
2. Лактіале [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://laktiale.ua/pro-laktiale/lactobacillus-helveticus/>
3. Taverniti, Valentina, and Simone Guglielmetti. "Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*." *Frontiers in microbiology* 3. 2012: 392. doi:10.3389/fmicb.2012.00392
4. Т.Р. Уманець. ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України», Київ/ Імуномодулюючі ефекти пробіотиків: Укр. мед. Часопис, 2017, с. 77-81
5. Технологія пробіотиків : підручник / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог ; НУХТ, 2012. — 318 с.
6. Дрожжевой екстракт. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Yeast_Extract_250
7. Хлористий кальцій. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://klebrig.com.ua/ua/p1179966495-kaltsij-hloristyj-1kg.html>
8. Лактоза харчова. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1241997202-laktoza-pischevaya-polmlek.html?gclid=aw.ds&utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=da&utm_campaign=KT_Produkty_pitaniya_napitki&gclid=CjwKCAiAxp-ABhALEiwAXm6IyVOWFQT99c07tncgvm5P4YOOOF7-u-FfNBTtnvmNgEH30-VTFv1CdpBoCUIgQAvD_BwE

					НУХТ БТЕК 04. 01. 05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук М.О.			СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					76	79
Реценз.						Кафедра БТМ ⁷⁶		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

9. Таксономія. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.uniprot.org/taxonomy/1587>

10. СУЧАСНІ НАПРЯМКИ СТВОРЕННЯ ТА УДОСКОНАЛЕННЯ ПРОБІОТИКІВ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/8824/1/04-10.pdf>.

11. Калініченко С. В., Бабич Є. М., Рижкова Т. А., Маслій І. Г., Коротких О. О., Даніліна С. С., ... & Десятникова О. В. "Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних х та синбіотичних препаратів." *Аннали Мечниковського інституту* 3. 2013: 5-12.

12. ДИСБІОЗ (ДИСБАКТЕРІОЗ) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://into-sana.ua/enc/disbioz-disbakterioz/>.

13. Степанов, Ю. М., І. Ю. Скирда, and О. П. Петішко. "Хвороби органів травлення—актуальна проблема клінічної медицини." *Гастроентерологія* 53, № 1. 2019: 1-6. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://repo.dma.dp.ua/4798/1/163450-364077-1-PB.pdf>

14. ПРОБІОКІД [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://liky.org/drug/probiokid-lallemand-sashe-3>

15. Griffiths Mansel W., and Angela Maria Tellez. "Lactobacillus helveticus: the proteolytic system." *Frontiers in Microbiology* 4. 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00030.

16. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.

17. Amrane, A. Batch cultures of supplemented whey permeate using Lactobacillus helveticus: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production.// *Enzyme and Microbial Technology*. – 2001. – Vol. 28, № 9-10. –P. 827–834. doi:10.1016/s0141-0229(01)00341-6.

18. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии — М.: МГУ, 1995. — 224 с.

19. ДСТУ 2972:2010 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://vialek.ua/ua/archive/2016/228.html>

20. Миючі засоби [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://medbib.in.ua/moyuschie-sredstva.html>
21. Дезінфекційні засоби [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2423/dezinfektanti-abo-dezinfekcijni-zasobi>
22. Профхімія [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://officem.com.ua/uk/eksperty-rekomendujut/vikoristannja-profhimii-na-pidприємствah-vidповідно-do-standartu-hassp>
23. Класифікація миючих засобів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://spicetech.com.ua/klasifikaciya-miyuchix-zasobiv/>
24. Синтетичні миючі засоби [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/16053/1/89.pdf>
25. Синтетичні миючі засоби [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://search.ligazakon.ua/l_doc2.nsf/link1/ST001880.html
26. Санікон [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanikon-interdez-kiiev>
27. Лізоформ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/tm-90-tm90/>
28. Бланідас [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://clean-ua.com/blanidas-c-star-20l/>
29. Дезінфектанти [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.tmr.gov.ua/press-center/news-offices/148-viddil-z-pytan-diialnosti-pravookhoronnykh-orhaniv-oboronnoi-ta-mobilizatsiinoi-roboty/15004-rekomendatsii-derzhprodspozhyvsluzhby-shchodo-dezinfektsii>
30. Дезінфекційні засоби [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2423/dezinfektanti-abo-dezinfekcijni-zasobi>

31. Амісепт [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://amoreshop.com.ua/ua/amisept-sredstvo-dlya-dezinfekcii-i-sterilizacii-poverhnostey-i-instrumentov-1000-ml/>
32. Полідез [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.kin.kiev.ua/ua/prep/dezinfektanti/polidez-sredstvo-dla-dezinfekcii/>
33. Гуасепт [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://lysoform.shop/product/guasept-1000-ml/>
34. Каустична сода [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://grimjim.com.ua/kaustichna-soda-ii-zastosuvannja-formula-i.html>
35. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии — М.: МГУ, 1995. — 224 с.
36. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напрямку 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. — К.: НУХТ, 2011. — 143 с.
37. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии — М.: МГУ, 1995. — 224 с.
38. Визначення вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>.
39. Пешкова, В. М., Саяпіна, О. Я., Солдаткін, О. О., & Дзядевич, С. В. "Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози." 2009 [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://cyberleninka.ru/article/n/fermentnyy-konduktometrisheskiy-biosensor-dlya-opredeleniya-laktozy/viewer>
40. Основи генетичної та клітинної інженерії. Ч. І. Генетичне конструювання in vivo: метод. вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Уклад. : І.Р. Клечак, Т.С. Тодосійчук, В.М. Ліновицька, Л.О. Тітова. — Київ : КПІ імені Ігоря Сікорського, 2017. — 50 с.
-