

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації**

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
Валентина ПОЛІЩУК
«___» _____ 2023 р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Технологія виробництва дієтичної добавки на основі
пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum*. Ділянка біосинтезу»**
Виконала:
студентка IV курсу, групи БТ-92
Карпенко Уляна Олександрівна

Керівник:
Професор кафедри промислової біотехнології та біофармації, д.ф-м.н, проф.
Литвинов Григорій Сергійович _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:
Доцент кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н., доц.
Шибєцький Владислав Юрійович _____

Рецензент:
Доцент кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н.,
Козар Марина Юріївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Студентка _____

Київ – 2023 рік

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП БТ-9210. 00.0000 ПЗ	Пояснювальна записка	125	
3	A1	ДП БТ-9210. 01.0000 ТС	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП БТ-9210. 02.0000 АС	Апаратурна схема	2	
5	A1	ДП БТ-9210. 03.0000 КА	Ферментер	1	

				ДП БТ9210 00.000.00		
	ПІБ	Підпис	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Карпенко У. О.				1	125
Керівн.	Литвинов Г.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-92	
Консульт.	Шибєцький В. Ю.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)
Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

« 19 » квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Карпенко Уляні Олександрівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum*. Ділянка біосинтезу», керівник проєкту Литвинов Григорій Сергійович, д.ф-м.н, проф., затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1888-с
2. Термін подання студентом проєкту 10.06.2023 р.
3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт дієтична добавка на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697; ферментер для промислового культивування - об'єм 2 м³.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum*; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його

виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк.

A1, технологічна схема – 1 арк. A1, апаратурна схема – 2 арк. A1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю. доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання курсового проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	19.04.23-25.04.23 р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	25.04.23-30.04.23 р.	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	30.04.23-05.05.23 р.	
4.	Технологічна частина	10.05.23-15.05.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	15.05.23-20.05.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	20.05.23-25.05.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки	26.05.23-30.05.23 р.	
8.	Подання дипломного проєкту на рецензування	31.05.23-05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проєкту та рецензії до експертної комісії	до 10.06.23 р.	

Студент

Керівник

Уляна КАРПЕНКО

Григорій ЛИТВИНОВ

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва дієтичної добавки на основі
пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum*. Ділянка біосинтезу»

Київ – 2023 рік

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить 125 с., 18 рис., 6 табл., 86 посилань.

Проєкт присвячена розробці технології виробництва виробничого дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum* та ділянці біосинтеза.

У якості продуцента було обрано штам *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 та запропоновано схему його селекції шляхом вирощування на середовищі з додаванням розеофлавіну. Для вирощування посівного матеріалу та для виробничого культивування обрано поживне середовище Біфідум на основі панкреатичного гідролізату казеїну, екстракту пекарських дріжджів, глюкози та лактози.

Для отримання біомаси *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 вибрано обладнання для біосинтезу – ферментер з лопатевою мішалкою та наведено його технологічний і конструктивний розрахунки.

У проєкті представлені технологічна та апаратурна схеми виробництва виробничого дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum* у формі ліофільного порошка, упакованого у флакони №10. Розроблена технологія відповідає санітарно-гігієнічним та екологічним нормам, а також вимогам техніки безпеки та охорони праці.

ДІЄТИЧНА ДОБАВКА, ПРОБІОТИК, *BIFIDOBACTERIUM LONGUM SUBSP. INFANTIS* ATCC 15697, ФЕРМЕНТЕР, АНАЕРОБНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, ЛІОФІЛЬНИЙ ПОРОШОК

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Карпенко У. О.					5	125
Конс.								
Керівн.		Литвинов Г. С.						
Затверд.								
						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		

ANNOTATION

The diploma project contains 125 pages, 18 figures, 6 tables, 86 references.

The project is devoted to the development of a production technology for a dietary supplement based on the probiotic strain *Bifidobacterium longum* and the biosynthesis area.

The strain *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 was chosen as a producer and a scheme of its selection by growing on a medium with the addition of roseoflavin was proposed. Bifidum nutrient medium based on pancreatic casein hydrolyzate, baker's yeast extract, glucose and lactose was chosen for the cultivation of inoculum and for production cultivation.

To obtain the biomass of *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697, the equipment for biosynthesis - a fermenter with a paddle stirrer - was selected and its technological and design calculations were presented.

The project presents the technological and equipment scheme for the production of a dietary supplement based on the probiotic strain *Bifidobacterium longum* in the form of a lyophilized powder packaged in vials No. 10. The developed technology complies with sanitary, hygienic and environmental standards, as well as with health and safety requirements.

DIETARY SUPPLEMENT, PROBIOTIC, *BIFIDOBACTERIUM LONGUM*
SUBSP. INFANTIS ATCC 15697, FERMENTER, ANAEROBIC CULTIVATION,
LYOPHILIZED POWDER

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ANNOTATION	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Карпенко Ч. О.					6	125
Конс.						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Литвинов Г. С.						
Затверд.								

ЗМІСТ

ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	14
1.1 Основні промислові продуценти	14
1.2 Систематичне положення.....	20
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки	21
1.4 Культуральні ознаки	23
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки	24
1.6 Поширення в природі	33
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	34
2.1 Характеристика цільового продукту	34
2.2 Схема хімічних перетворень	35
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного	39
препарату, отриманого в процесі реалізації технології	39
2.4 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	42
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ ..	45
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту	45
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного	46
промислового продуцента.....	46
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	50
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	54
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва	54
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що	59
використовуються у виробництві	59
4.3 Опис технологічного процесу	65
4.4 Матеріальний баланс	85
4.5 Контроль виробництва	87

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Карпенко Ч. О.					7	125
Конс.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Литвинов Г. С.						
Затверд.								

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	95
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних	95
матеріалів для окремих елементів апарату	95
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	101
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання	110
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	111
ВИСНОВКИ	114
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	115

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВСТУП

Після того, як А. Флемінг відкрив перший антибіотик – пеніцилін, починаючи з 1940-х років використання антибіотиків стало значно більш розповсюдженим. Приблизно у той же час, у 1950-х роках, почали звучати формулювання такого поняття, як «пробіотик». Всі визначення цього терміна сходилися в тому, що пробіотики - це живі мікроорганізми, які можуть бути частиною кишкової або вагінальної мікрофлори людини, які при введенні в адекватних кількостях приносять користь здоров'ю господаря [1]. З часом виявилось, що не зважаючи на значну кількість переваг, антибіотики, як і більшість препаратів, мають недоліки та побічні ефекти. Одним з них є дизбактеріоз - кількісні та якісні зміни в складі нормофлори різних ділянок організму, або, якщо простіше, порушення рівноваги між нормальною симбіотичною мікрофлорою людини та патогенних організмів, що можуть колонізувати травну систему і спричиняти велику кількість захворювань, від закрепа і діареї до виразок. Тому пробіотики почали активно досліджувати з метою розкрити їх потенціал у якості модуляторів та регуляторів кишкової мікрофлори, що з будь-яких причин була порушена. Розроблялися технології виробництва лікарських препаратів пробіотиків, було визначено антагоністичні та антибактеріальні властивості пробіотичних організмів. Зараз відомо ряд корисних властивостей, якими володіють пробіотичні культури. Установлено, що у здорових дорослих людей в екосистемі кишечника домінують дві бактеріальні групи – *Bacteroidetes* і *Firmicutes*, що становлять 90 % всіх мікробів. Решта 10 % - це *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* і *Fusobacteria* [2]. Корисна дія кишкової мікрофлори, яку також називають «стійкістю до колонізації» або «бар'єрним ефектом», є важливим механізмом, який використовують місцеві (автохтонні) кишкові бактерії для підтримки своєї присутності та забезпечення

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розроб.	Карпенко Ч. О.						
Конс.	.						
Керівн.	Литвинов Г. С.						
Затверд.							
					Стадія	Аркцш	Аркцшів
						9	125
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

захисту ніші від щойно спожитих мікроорганізмів, включаючи патогени. Пробіотики також стимулюють, модулюють і регулюють імунну відповідь господаря, ініціюючи активацію специфічних генів локалізованих у клітинах господаря. Вони продукують органічні кислоти, вітаміни, антибактеріальні сполуки. Пробіотики відіграють важливу роль у індукції кишкового ангіогенезу за допомогою сигналізації рецептора васкулярного ендотеліального фактора росту (VEGFR), який, у свою чергу, регулює гостре та хронічне запалення в тканині слизової оболонки кишечника, викликане прогресуванням запального захворювання кишечника (IBD) [3].

У світі ставлення до пробіотиків та їх популярність сильно різняться. Причиною є відсутність чітких даних про «лікувальну» здатність пробіотиків, а також побоювання розвитку антибіотикорезистентних штамів, бактеріальних інвазій тощо. Попри це, пробіотичні культури продаються як лікарські форми у країнах, де їх використання регулюється і дозволено, але переважна кількість пробіотичних продуктів є дієтичними добавками. Дієтичні добавки (ДД) – це вітамінні, вітамінно-мінеральні або трав'яні добавки окремо та/або у поєднанні у формі таблеток, порошків тощо, які приймаються орально разом з їжею або додаються до їжі в межах фізіологічних норм для додаткового порівняно зі звичайним харчуванням вживання цих речовин; дієтичні добавки також містять різні речовини або суміші речовин, у тому числі протеїни, вуглеводи, амінокислоти, їстівні масла та екстракти рослинних і тваринних матеріалів, живі мікроорганізми та/або їх метаболіти, що вважаються необхідними або корисними для харчування та загального здоров'я людини. За дією ДД умовно поділяють на три групи: нутрицевтики, парафармацевтики та пробіотики. Пробіотики – біологічно активні добавки до їжі, до складу яких входять живі мікроорганізми та/або їх метаболіти. Вони стимулюють зростання та активність представників корисної мікрофлори кишечника, сприяючи тим самим підтриманню її нормального стану [38]. Світовий ринок дієтичних добавок ще у 2021р оцінювався у 7 млн. доларів США, з прогнозованим зростанням на 3,75% у період

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

від 2021 по 2026 роки. На популярність таких дієтичних добавок неабиякий вплив мала пандемія COVID-19, яка призвела до зміни купівельної поведінки споживачів, внаслідок чого продажі електронної комерції зросли до 1,5 мільярда доларів США. Європейський ринок пробіотичних добавок оцінювався у 1,464 млн євро (тобто 25% від світового ринку), причому Італія, Франція, Німеччина та Польща були і залишаються лідерами [4,5].

В Україні ринок пробіотичних дієтичних добавок був і залишається доволі розвиненим. На ринку є як лікарські засоби, так і дієтичні добавки, причому кількість останніх значно переважає. Постачальниками ДД та лікарських засобів є як вітчизняні, так і іноземні компанії. Серед українських компаній-виробників дієтичних добавок на основі пробіотичних штамів лідирує АТ «Фармак», що виробляє лінійку дієтичних добавок «Лактіале» у капсулах, стіках/пакетах-саше, флаконах, корпорація «Артеріум», що випускає дієтичну добавку «Пробіланс» у формі капсул та саше, ДП «Ензим», що випускає пробіотик «Біфідумбактерин» та пробіотик з цинком «Ловер», ТОВ «Валартін Фарма» - пробіотик «БіфітенНЕО». Популярність ДД обумовлена деякітькома факторами, такими як доступність та безрецептурність. На сьогодні в Україні відсутні вимоги щодо обов'язкового контролю якості та безпеки для ДД, що, у свою чергу, відкриває доступ на ринок для недоброякісної продукції. Така ситуація склалася завдяки тому, що ще понад сім років тому Законом України № 1602-VII від 20.09.2015 р. було відмінено державну реєстрацію ДД. Наразі дієтичні добавки частково врегульовані низкою законів про харчові продукти, зокрема Законом України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів». Війна, а потім і повномасштабний наступ Росії на територію України суттєво вплинули на ринок ДД. З березня 2022 р. Зареєстровано обсягів продажу, що є відгуком на різке підвищення цін на дієтичні добавки [6].

Наразі є потреба у дослідженні, розробці та поліпшенні існуючих методів виготовлення пробіотичних дієтичних добавок та створення нових доступних українських продуктів на ринку. Актуальною проблемою залишається слабка та

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

недовершене регулювання ринку пробіотиків, що, в свою чергу, формує певні ризики та побоювання.

Метою цього дипломного проєкту є розробка технології виробництва дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum*. Завданнями проєкту є:

- Короткий огляд продуцентів, що можуть бути використані у якості пробіотичних штамів та обґрунтування вибору одного з них;
- Опис культуральних, фізіолого-біохімічних, морфологічних та цитологічних ознак обраного продуцента - *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697;
- Представлення способів впливу мікроорганізму на організм людини та біохімічних особливостей виробництва;
- Визначення методів отримання промислових продуцентів з указанням схеми отримання *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697, що здатен до надсинтезу рибофлавіну;
- Характеристика кінцевої продукції виробництва, матеріалів та сировини, що застосовуються у процесі виготовлення, опис технологічного процесу та методів його контролю;
- Розрахунок матеріального балансу технологічного процесу;
- Розрахунок та представлення креслення ферментера для отримання біомаси цільового продукту, розробка та представлення технологічної та апаратурної схем

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

За останні 10 років технології виготовлення пробіотичних дієтичних добавок значно просунулися, як і знання про кишкову мікрофлору та її важливість для здоров'я шлунково-кишкового тракту та організму в цілому. Серед кишкової мікрофлори домінують бактерії типів *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* та *Verrucomicrobia*, причому два типи *Firmicutes* і *Bacteroidetes* представляють 90% мікробіоти кишечника. Тип *Firmicutes* складається з понад 200 різних родів, таких як *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* і *Ruminococcus*. Роди *Clostridium* представляють 95% типу *Firmicutes*. *Bacteroidetes* складається з переважаючих родів, таких як *Bacteroides* і *Prevotella*. Тип *Actinobacteria* пропорційно менш поширений і в основному представлений родом *Bifidobacterium* [7].

Для приготування дієтичних добавок на основі пробіотичних штамів використовують штами бактерій, що входять до облігатної, факультативної та транзитної мікрофлори кишківника людини. До таких штамів висувається певна кількість вимог, а саме:

- 1) штами мають бути безпечними, непатогенними;
- 2) штами мають проявляти антагоністичні властивості до патогенних мікроорганізмів;
- 3) стійкість до літичних ферментів слини (лізоцим), травних ферментів (пепсин, ліпаза) і до жовчі;
- 4) стійкість до дії кислоти шлункового соку;
- 5) адгезивна активність і колонізаційна резистентність;
- 6) стійкість до антибіотиків;

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Карпенко Ч. О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш
Конс.							13
							125
Керівн.		Литвинов Г. С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затверд.							

7) вища порівняно з коменсальною мікрофлорою питома швидкість росту пробіотичних культур, що дозволяє їм швидше освоїти живильний субстрат, а отже, збільшити продуктивність клітин пробіотичних штамів;

8) штам повинен бути стабільним при культивуванні та інших стадіях технологічного процесу;

9) штам має чинити імуномодуляторну та імуногенну дію [8].

Отже, для виготовлення дієтичних добавок зазвичай використовують представників облигатної мікрофлори, такі як *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*. Вони є найчисленнішими у кишківнику, задовольняють всі наведені вище вимоги і, що найголовніше, дуже рідко проявляють патогенну активність. Рідше використовують представників транзиторної та облигатної мікрофлори *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Деякі з них можуть бути патогенними, і кількість цих мікроорганізмів у кишківнику менша, ніж біфідобактерій та лактобацил. Дуже широку популярність здобули дієтичні препарати на основі представників транзиторної мікрофлори *Bacillus* та *Saccharomyces*.

Рід *Lactobacillus*

Бактерії роду Лактобацилюс це неспороутворюючі грам-позитивні палички, форма яких може варіюватися залежно від виду. Каталазу та пігменти не утворюють, відношення до кисню варіюється – деякі види суворі анаероби, деякі – мікроаерофіли або аеротолерантні. Оптимальна температура росту - 37°C, рН – 5,5-7. Розкладають олігосахариди на молочну кислоту шляхом гомоферментативного бродіння. Використовуються у харчовій промисловості для виробництва кисломолочної продукції, ферментованої продукції та продуктів функціонального харчування, а також для виробництва пробіотичних препаратів та дієтичних добавок. Можна виділити з калу немовлят та дорослих, також є частиною вагінальної мікрофлори разом з *Bifidobacterium*. Лактобактерії мають багато властивостей, які роблять цей рід підходящим для виробництва

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

пробіотиків. Вони мають високу толерантність до кислоти та жовчі, здатні прилипати до поверхні кишечника, витримують низький рН, шлунковий сік, інгібують потенційно патогенні види (антимікробна активність за допомогою бактеріоцинів), виявляють деяку антибіотикорезистентність, виробляють екзополісахариди. Види, що найчастіше використовуються у дієтичних добавках - *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* та *L. fermentum* [9], [10].

Рід *Bifidobacterium*

Біфідобактерії є однією з основних складових мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини. Найважливішу роль у шлунково-кишковому тракту людини відіграють *B.bifidum*, *B.infantis*, *B.breve*, *B.longum* та *B.adolescentis*. Крім того, були відкриті нові різновиди, такі як *B.lactis*, *B.inopintanum*, *B.denticolens*. Недостатність або значне зниження їх кількості у шлунково-кишковому тракту призводить до серйозних порушень у процесах травлення та обміну речовин. У випадку дефіциту біфідофлори стафілококи, протеї та грибки роду *Candida* активно розмножуються і виявляють свою патогенну дію. Біфідобактерії представлені поліморфними паличками з біфуркаціями на одному або двох кінцях. Вони розташовані групами або окремими клітинами, парними, ланцюжками, палісадом або розетками. Вони не рухливі і не утворюють спори. Грампозитивні, забарвлення часто нерівномірне. Форма суттєво варіабельна в залежності від виду. На ранніх стадіях розвитку переважно спостерігаються паличкоподібні клітини довжиною до 8 мкм і середньою товщиною 0,4-0,5 мкм. Строгі анаероби, здатні рости тільки в умовах відсутності кисню та при низькому окисно-відновному потенціалі середовища. У тонкому кишечнику через низький рівень рН та достатній рівень кисню можливий лише обмежений ріст мікроорганізмів. Біфідобактерії, як найбільш строгі анаероби, колонізують найближчу до епітелію зону, де завжди панує від'ємний окисно-відновний потенціал (не тільки в товстій кишці, але й в інших, більш аеробних біотопах організму, таких як ротоглотка, піхва та шкіра). Вони є хемоорганотрофами і

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

активно бродять вуглеводи з утворенням оцтової та молочної кислоти, потребують вітамінів. Вони не утворюють газів та каталази, і не здатні розщеплювати желатин. Стійкі до канаміцину та мономіцину, але чутливими до антибіотиків з роду пеніциліну та гентаміцину. Проявляють антагоністичну активність щодо *Sh. sonnei*, *Sh. flexneri*, ентеропатогенних кишкових паличок та стафілококів. Позитивний вплив біфідобактерій на фізіологічні функції організму дітей і дорослих пов'язують з їхньою здатністю продукувати молочну та оцтову кислоти, які забезпечують кисле середовище в кишечнику, що запобігає розмноженню патогенної, гнильної та газоутворюючої мікрофлори. *Bifidobacterium* також можуть виділяти бактеріоцини (біфідин та біфілонг), які мають антимікробну активність проти багатьох видів ентеробактерій, вібріонів, стрептококів та стафілококів. Кислоти, які продукують біфідобактерії, та бактеріоцини запобігають проникненню мікробів до верхніх відділів шлунково-кишкового тракту та сприяють формуванню неспецифічної резистентності. Висока адгезивність біфідобактерій до слизової оболонки товстого кишечника відіграє важливу роль у їхній протективній активності [11].

Рід *Enterococcus*

Грам-позитивні коки, розміщуються поодинокі або парами, у вигляді невеликих скупчень або ланцюжків. Неспороутворюючі, декі види рухливі за рахунок 1-4 джгутиків. Ентерококи це факультативні анаероби, ростуть за температури 35-37°C та рН 4,2-4,6. Дуже термостійкі і витримують нагрівання до 60°C упродовж 30 хв. Заморожені та ліофільно висушені культури можуть зберігатися роками. Виявляють резистентність до β -лактамних антибіотиків та аміноглікозидів, можуть набувати резистентності до інших антибіотиків, у тому числі і ванкоміцину. Відновлюють нітрати до нітритів, тип метаболізму – бродіння з утворенням молочної кислоти. Один з факторів пробіотичної активності – продукування бактеріоцинів [12]. Ентерококи вирізняються надзвичайно великою кількістю бактеріоцинів, що називають ентероцинами, що активні проти деяких видів *Bacillus*, *Listeria*, *L. monocytogenes*.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Найактивніші продуценти ентероцинів – види *E. faecalis*, *E. faecium*. З цієї причини, а також тому, що вони є низькопатогенними, ці види використовують для виготовлення пробіотичних добавок як для людини, так і для тварин [13], [14].

Рід *Bacillus*

Рід Бацилюс представлений прямими або дещо викривленими паличками, поодинокими або зібраними в пари, ланцюжки та нитки. Формує ендоспори. Є як Грам-позитивні, так і Грам-негативні види. Присутні і рухливі, і нерухливі види, рухливі види мають перитрихіальні джгутики. Зазвичай аеробні, рідше – факультативні анаероби, дуже рідко зустрічаються анаеробні форми. Цей рід надзвичайно різноманітний, від здатності протистояти змінам рН до солестійкості, різноманітне і забарвлення колоній, їх форма та розмір. Спори Бацилюсів дуже стійкі до нагрівання, кислот, радіації, дезінфекційних речовин. Каталазопозитивні, хемоорганотрофи, ацетат, ацетоїн, 2,3-бутандіол, етанол і лактат. Вони нездатні до адгезії, тому у кишківнику не затримуються надовго, виявляючи там антагоністичні властивості та змінюючи рН. Мало видів є патогенними. Для виготовлення дієтичних добавок використовують види *B. subtilis*, *B. clausii*. *Bacillus cereus* також входить до складу певних добавок, але він може бути патогенним і зазвичай викликає харчові отруєння та опортуністичні інфекції. Є дуже патогенний вид - *Bacillus anthracis*, він викликає сибірську виразку [15], [11].

Рід *Saccharomyces*

Дріжджі роду *Saccharomyces* належить до родини *Saccharomycetaceae* (тип *Ascomycota*, царство Гриби). Видатною характеристикою представників *Saccharomyces* є їх здатність перетворювати цукор на вуглекислий газ і етанол за допомогою ферментів. Як і інші гриби, дріжджі є еукаріотичними організмами. Зазвичай вони мають діаметр близько 0,075 мм і представлені різноманітними формами - від сферичної до яйцеподібної та ниткоподібної. Більшість дріжджів розмножуються нестатевим шляхом - брунькуванням: з батьківської клітини

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

виступає невеликий горбок, який збільшується, дозріває і відокремлюється. Деякі дріжджі розмножуються поділом, коли материнська клітина ділиться на дві рівні клітини. *S. boulardii* часто використовується як пробіотик у ліофілізованій формі для лікування діареї, він безпечний і лише в рідкісних випадках може викликати фунгемію у людей з компроментованою імунною системою [10]. Головні пробіотичні характеристики, якими володіє цей гриб, включають у себе резистентність до антибіотиків, що дозволяє використовувати його паралельно з антибіотикотерапією, наявність ліпосахаридів та ліпотейхоєвих кислот на клітинних стінках, які можуть бути імуногенним факторами та здатність існувати у досить широкому діапазоні pH (4,5-6,5) Оскільки *S. boulardii* не є постійною складовою кишкової мікробіоти, з часом він виводиться з організму, що дозволяє уникати порушення балансу мікрофлори кишківника [16].

Рід *Streptococcus*

Стрептококи - це грампозитивні, нерухомі, неспороутворюючі, каталазонегативні коки, які зустрічаються парами або ланцюжками. Старіші культури можуть втратити свій грампозитивний характер. Більшість стрептококів є факультативними анаеробами, деякі — облігатними (суворими) анаеробами. Для більшості з них потрібні збагачені середовища (кров'яний агар). Стрептококи групи А мають гіалуронову кислотну капсулу [17]. Цей рід також відноситься до молочнокислих бактерій, тому *Streptococcus thermophilus* широко використовують для виготовлення заквасок для йогуртів [18]. *Streptococcus thermophilus* є представником нормальної мікрофлори людини, проте рід налічує і патогенні та небезпечні види. У зв'язку з тим, що *S. thermophilus* продукує молочну кислоту і є представником кишкової мікрофлори, його використовують у якості пробіотичної культури. *S. thermophilus* здатний синтезувати термофіліни, які є бактеріюцинами, невеликими пептидами, здатними пригнічувати ріст або вбивати близькоспоріднені бактерії. До цього часу було ідентифіковано десять термофілінів із десяти різних штамів *S. thermophilus*, такі як термофілін 1277, який виробляється *S. thermophilus* SBT1277. Показано, що термофіліни *in vitro* мають

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

інгібіторну дію щодо інших кисломолочних бактерій, однак також проти грампозитивних патогенних штамів, таких як *E. faecalis*, *Clostridium* (*C.*) *botulinum*, *Staphylococcus aureus* і *Listeria monocytogenes* [19].

У якості пробіотичного штаму для виготовлення дієтичної добавки у цьому проєкті було обрано пробіотичний вид з роду *Bifidobacterium*, а саме *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697. Вибір саме цього виду та штаму зумовлений декількома факторами: *Bifidobacterium longum subsp. infantis* є одним з перших представників кишкової мікрофлори, що колонізують кишківник одразу після народження немовляти. Ця бактерія виробляє молочну та оцтову кислоти і не продукує етиловий спирт або вуглекислий газ. *B. longum* метаболізує групу олігосахаридів, що знаходяться у людському молоці, і може ефективно використовувати їх для отримання енергії. Обраний організм, як і інші біфідобактерії, проявляє резистентність до деяких груп антибіотиків, таких як аміноглікозиди, поліпептиди, хінолони та антибіотики фузидової кислоти та метронідазолу. Він не є патогенним, описано дуже мало випадків бактеремій, пов'язаних цим видом. *B. longum* продукує ряд вітамінів та бактеріюцини, виявляє антагонізм по відношенню до бактерій роду *Shigella*. Крім переліченого, варто згадати, що *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 був одним перших біфідобактерій, яку відкрили та описали. Цей штам добре досліджений, його геном повністю розшифровано і він володіє достатньо високою генетичною стабільністю.

1.2 Систематичне положення

Згідно із загальноприйнятою класифікацією, *Bifidobacterium longum* відноситься до домену *Bacteria*, типу *Actinomycetota*, класу *Actinomycetes*, порядку *Bifidobacteriales*, родини *Bifidobacteriaceae*, роду *Bifidobacterium*, виду *Bifidobacterium longum*, підвиду *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, штаму *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 [20]

У «Визначнику бактерій Берджі» *Bifidobacterium longum* віднесено до II категорії – Грампозитивні мікроорганізми, що мають клітинну стінку, 20 групи –

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми, роду *Bifidobacterium* [21].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Бактеріальні клітини Біфідобактерій мають форму паличок. Форма дуже варіабельна - зустрічаються зігнуті, булавоподібні та розгалужені клітини. Розташовані бактеріальні клітини поодинокі, парами, V-подібно, присутні конгломерації ланцюжками, палисадні (рис. 1.3) або розеткоподібні. Характерною особливістю виду *B.longum* є сильна видовженість клітин, які при цьому доволі тонкі, та порівняно невисока вірогідність формування розгалужених клітин (рис. 1.4) (у порівнянні з іншими видами роду) [22]. Зрідка зустрічаються роздуті клітини у формі коків. Спори не утворюють, капсул, слизових шарів чи чохлів не мають [21]. Клітинна стінка однорідної густини, товщиною 16 нм, іноді зустрічаються ділянки нерівномірної товщини (рис. 1.1). Цитоплазматична мембрана має структуру з трьох шарів сумарною товщиною 9 нм [11]. Грампозитивні, при фарбуванні по Граму клітинні стінки забарвлюються нерівномірно (рис. 1.2). Біфідобактерії нерухомі і не мають джгутиків.

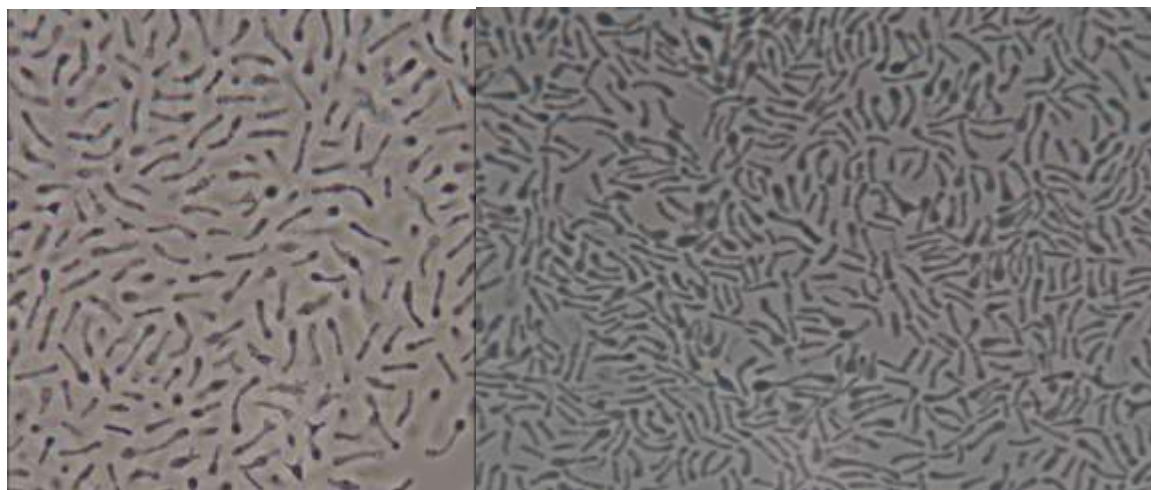


Рисунок 1.1 - Мікроскопічне фото клітин *B.longum*, що культивувалися на середовищі *Lactobacilli* MRS Broth за температури 37°C протягом 2 днів.

Збільшення x1000 Видно булавоподібні форми клітин [23]

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

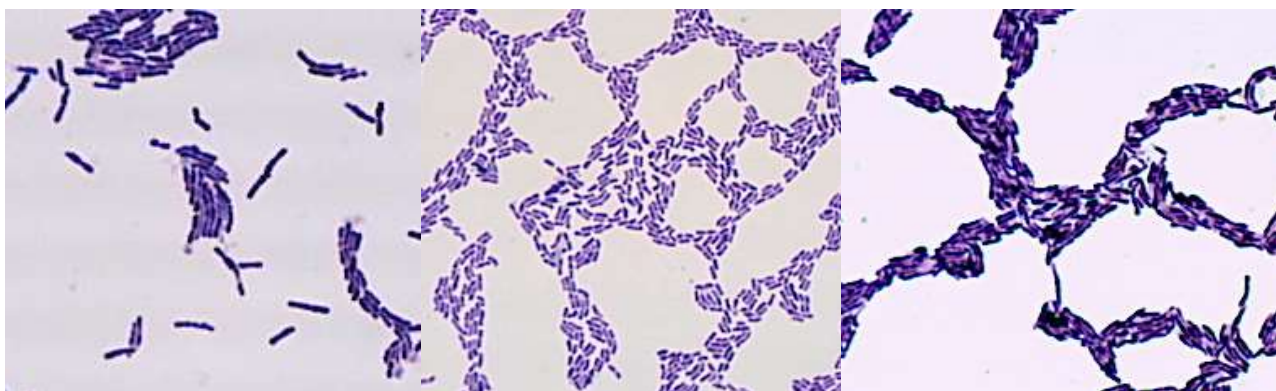


Рисунок 1.2 - Колонії *B. longum*, фарбування за Грамом *B. longum*. Збільшення $\times 1000$. Фіолетове забарвлення клітин свідчить про те, що бактерія є грам-позитивною. На першому справа зображенні видно нерівномірне забарвлення клітин [24]

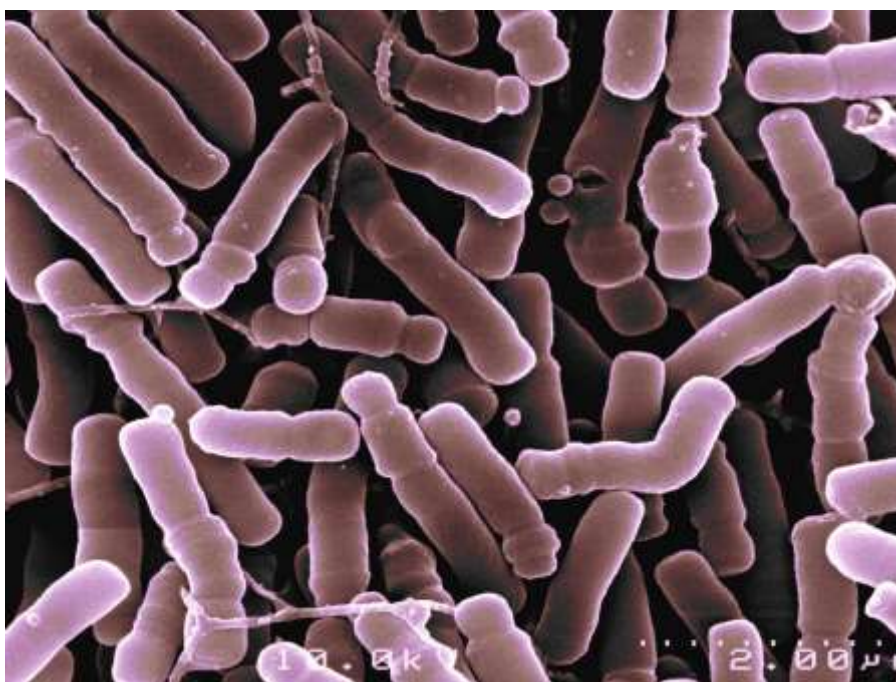


Рисунок 1.3 - Сканувальна електронна мікроскопія *B. longum* R-175. Видно високу варіабельність форми та відсутність розгалужених клітин [25]

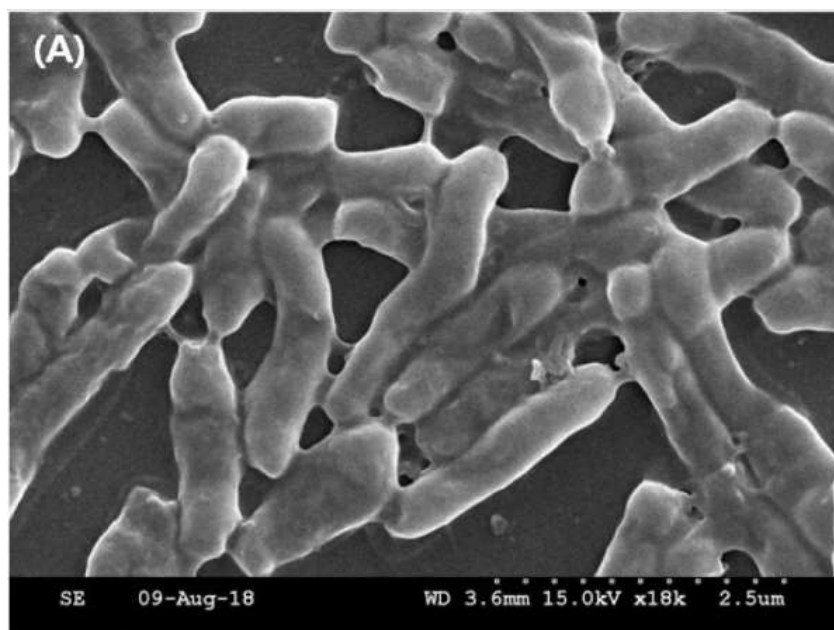


Рисунок 1.4 - Сканувальна електронна мікроскопія *Bifidobacterium longum* MG723. Видно V-подібне розташування клітин [26]

1.4 Культуральні ознаки

При поверхневому рості на твердому поживному середовищі в анаеробних умовах біфідобактерії утворюють добре окреслені гладенькі, випуклі колонії кремового або білого кольору, блискучі та м'якої консистенції (рис. 1.5, рис. 1.6, рис. 1.7). У товщі агару - характерні колонії у вигляді "гречаного зернятка" або "диску" [27]. В рідких поживних середовищах біфідобактерії ростуть по всій висоті об'єму, крім зони аеробіозу. Пігмента дана бактерія не утворює [11].



Рисунок 1.5 - Вигляд колоній *B. longum* на середовищі *Lactobacilli* MRS Broth за температури 37°C протягом 2 днів [23].

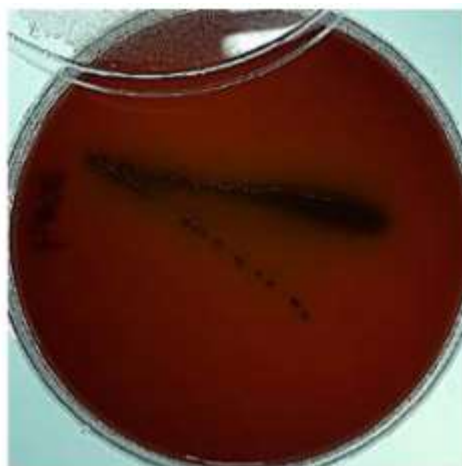


Рисунок 1.6 - Вигляд колоній *B. longum* на середовищі кривавий агар. Темнова мікроскопія. За відсутністю світлих зон біля колоній бактерії можна зробити висновок, що даний вид нездатний до гемолізу [28]



Рисунок 1.7 - Вигляд колоній *B. longum* на середовищі глюкозний кривавий печінковий агар після 4-денної інкубації при 37°C в анаеробних умовах [24].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Усі організми роду *Bifidobacterium* є гетеротрофними, і *B. longum* не є виключенням. Вони є хемоорганотрофами, і для отримання енергії зброджують ряд вуглеводів. Деякі вуглеводи, такі як лактоза, галактоза та сахароза, розщеплюються переважною більшістю видів біфідобактерій, інші вуглеводи – лише певними видами. Усі підвиди *B. longum* здатні зброджувати D-фруктозу, D-галактозу, D-лактозу, мальтозу, рафінозу та сахарозу. *B. longum subsp. infantis* не здатен розщеплювати арабіногалактан та L-арабінозу, на відміну від двох інших

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

підвидів. Натомість він здатен розщеплювати целобіозу, D-глюкоронову кислоту та інулін. *B. longum subsp. suis* не розщеплює мелецитозу, D-галактозамін та D-рибозу, але може зброджувати амілозу та амілопектин. Жоден з підвидів не здатен розщеплювати глюконат, гуарову камедь, D-манітол, свинячий муцин, саліцин, D-сорбітол, крохмаль, трегалозу чи ксилан. Важливо зауважити, що попри нездатність певного підвиду чи виду *B. longum* до збродження певних вуглеводів, можуть зустрічатися штами, які мають здатність до збродження таких сполук [22], [29].

Тип бродіння біфідобактерій – гетероферментативний. Цим бактеріям притаманний унікальний метаболічний шлях розщеплення гексоз, що має назву «біфідний шунт», або ж фруктозо-6-фосфатний шлях. Ключовим ферментом даного шляху є фруктозо-6-фосфатфосфокетолаза (Ф6ФФК), і тести, що досліджують її наявність у бактерії використовуються для ідентифікації бактерій роду *Bifidobacterium*. Спрощену схему біфідного шунта наведено на рис. 1.8. У результаті бродіння утворюється енергія у формі АТФ та оцтова і молочна кислоти у співвідношенні 3:2. Біфідобактерії не утворюють вуглекислий газ, масляну та пропіонову кислоти [21].

Як і інші біфідобактерії, *B. longum* доволі вимогливий до складу поживного середовища та умов культивування. Окрім вуглеводів, вони потребують джерела азоту та макро- і мікронутрієнтів. Сполуки, що значно покращують ріст біфідобактерій на середовищі, називають біфідус-факторами. Зазвичай їх додають до поживних середовищ, готових форм пробіотиків тощо з метою досягти швидшого накопичення біомаси клітин. У природі такі речовини входять до складу материнського молока, разом з іншими олігосахаридами людського молока (human milk oligosaccharides – НМО). Було виявлено, що це глікопротеїни та олігосахариди, що містять N-ацетил-d-глюкозамін, а також фруктооолігосахариди та трансгалактозилзовані олігосахариди [29], [30].

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

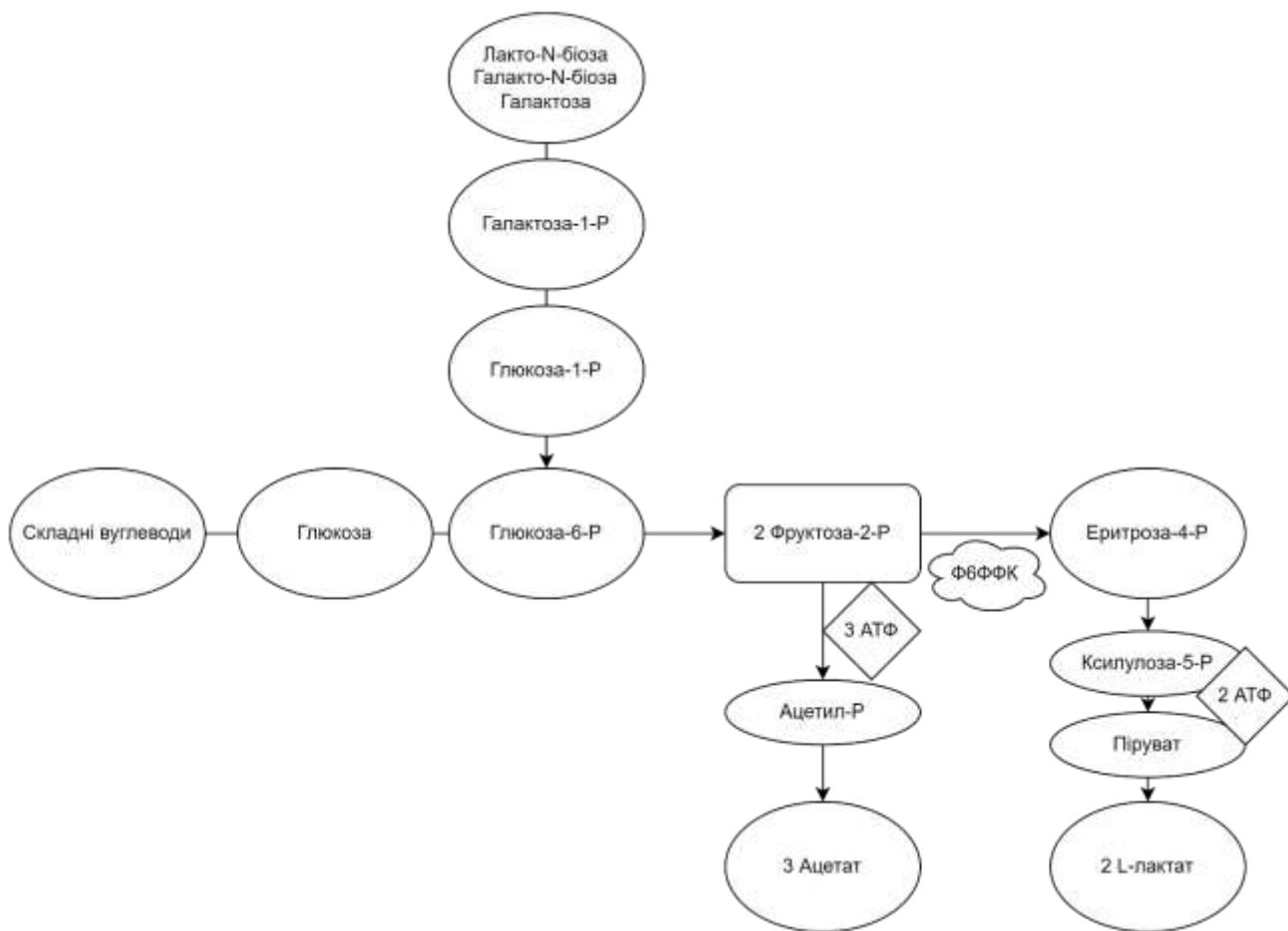


Рисунок - 1.8 Спрощена схема з виділенням ключових метаболічних етапів біфідного шунта [30]

Біфідобактерії потребують залізо для успішного росту. Лактоферин, ключовий транспортер заліза, є одним з найбільш поширених білків у грудному молоці людини, і його присутність може сприяти біфідогенним властивостям молока. Порівняно з бичачим молоком лактоферин міститься в набагато вищих концентраціях у жіночому молоці, що свідчить про специфічність середовища кишечника людини. Проте ефективність біфідогенної дії лактоферину залежить від виду і штаму біфідобактерій, а також насиченості мікробного середовища. Структура лактоферину змінюється залежно від рівня його насичення і може утримувати до двох іонів Fe^{3+} . У бідному залізом середовищі додавання людського або бичачого лактоферину, не зв'язаного із залізом або лише частково насиченого, пригнічує ріст і *B. longum subsp. infantis*. Навпаки, коли хололактоферин, білок, насичений залізом, додається до середовища з обмеженим

вмістом заліза, ріст біфідобактерій не пригнічується. Так само, коли присутнє залізо, ступінь насичення лактоферином не має значення, і ріст біфідобактерій активний і не пригнічується, включаючи *B. longum subsp. longum*, *B. longum subsp. infantis*. У сукупності ці результати показують, що якщо зв'язування заліза лактоферином буде шкідливим для біфідобактерій, наприклад, у середовищі з обмеженим вмістом заліза, то біфідогенного ефекту немає. Однак, якщо в навколишньому середовищі багато заліза, ріст біфідобактерій сприяє, можливо, також через секвестрацію заліза. Загалом біфідогенний ефект, спричинений насиченим гололактоферином, сильніший, ніж незв'язаний аполактоферин [30].

Окрім вищенаведених вуглеводів та заліза *B. longum* зазвичай потребує певних вітамінів та амінокислот, а саме: пантетин В₅, метакінон К₂, тетрагідрофолат В₉, параамінобензоєва кислота, L-цистеїн та метіонін. Тетрагідрофолат та амінобензоєва кислота, як і цистеїн та метіонін, можуть бути взаємозамінними, тобто для якісного росту бактеріям достатньо одного з пари компонентів [31]. Варто зауважити, що потреби у вітамінах можуть варіюватися залежно від штаму. Деякі штами навпаки мають здатність до суперсинтезу фолату, і використовуються для створення функціональних продуктів харчування з його підвищеним вмістом.

Біфідобактерії пристосовані для життя у безкисневому середовищі, вони є повними анаеробами. Причиною є майже повна відсутність генів, що кодують каталазоутворення. Без каталази, фермента, що каталізує розпад гідрогену пероксиду на воду та кисень, біфідобактерії не мають ефективної системи захисту від ураження вільними радикалами. Однак деякі види біфідобактерій є слабо аеротолерантними та аеротолерантними, оскільки вони мають інші ферменти або системи оксидаз/пероксидаз, що захищають їх від впливу Н₂О₂. *Bifidobacterium longum* характеризується чутливістю до кисню у середовищі, проте він може рости при низькому його вмісті [30]. Дослідження здатності *B. longum* до росту в середовищі з різним вмістом СО₂, N₂ та О₂ показали, що присутність СО₂ є важливим фактором для поверхневого росту досліджуваних штамів

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						26
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Bifidobacterium в безкисневих умовах. Роль CO₂ полягає не стільки в покращенні переносимості O₂, скільки в стимулюванні росту. За відсутності 1% CO₂ *B. longum* не утворював колоній в атмосфері з 5% O₂ та 95% N₂ (рис. 1.9). У присутності 1% CO₂ *B. longum* утворював колонії в умовах 5% O₂, однак розвиток колоній все більше пригнічувався зі збільшенням концентрації O₂ (рис. 1.10)[32].

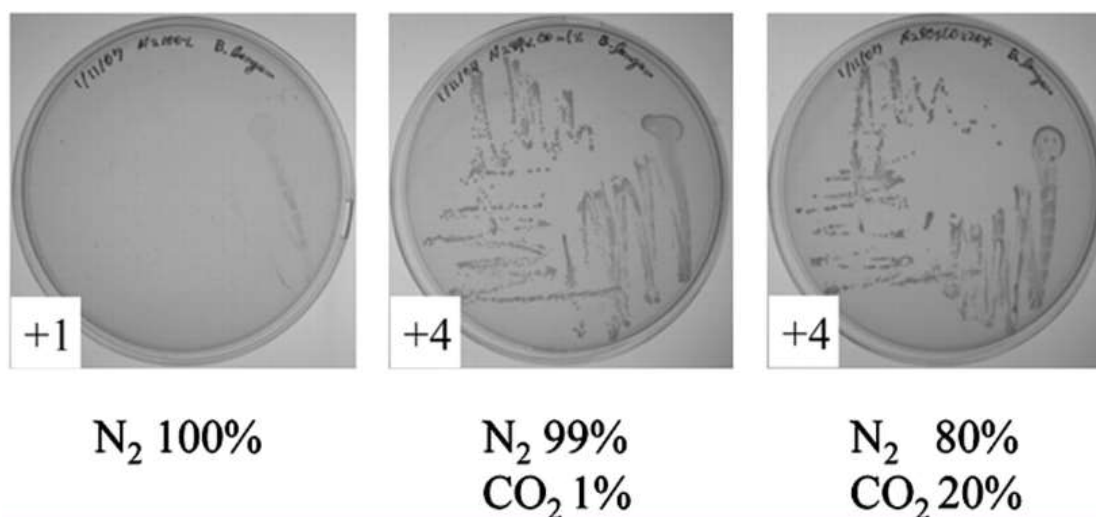


Рисунок 1.9. - Порівняння росту *B. longum* на щільних поживних середовищах в умовах CO₂ та N₂ [32]

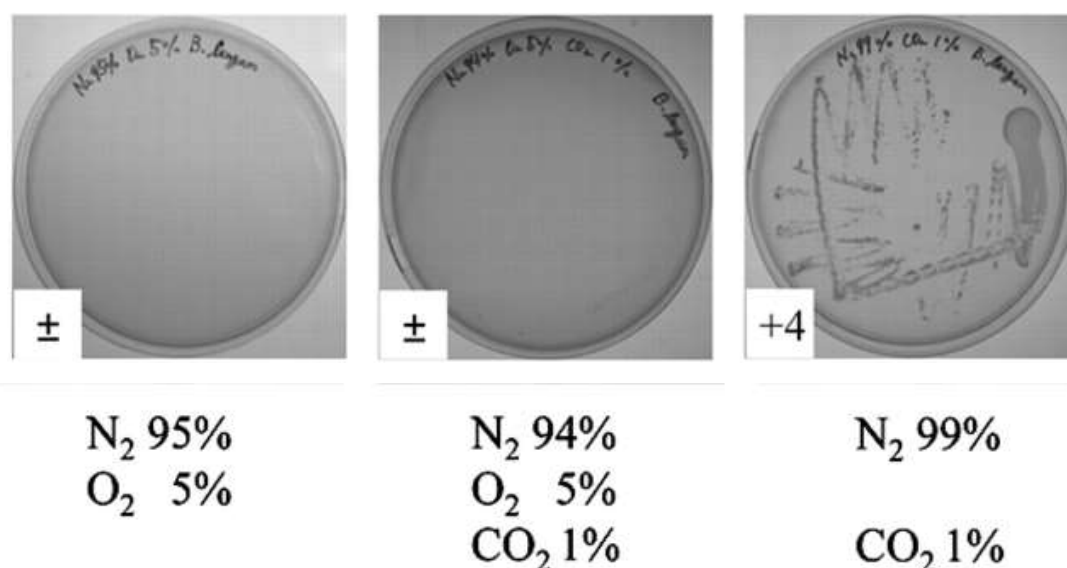


Рисунок 1.10 - Порівняння росту *B. longum* на щільних поживних середовищах в умовах з різним вмістом CO₂, O₂ та N₂ [32]

У кишківнику різні типи факторів, такі як травні ферменти, жовчні кислоти, α-дефензин, антитіла до імуноглобуліну А та коротколанцюгові жирні кислоти

(SCFA), що утворюються в процесі травлення, є основними інгібіторами росту кишкових мікробів.

B. longum може рости в діапазоні температур 25–45 °С, з максимальною температурою росту 43–45 °С і мінімальною температурою росту 25–28 °С. Оптимальна температура становить від 36 до 38 °С. Оптимальний рН для росту біфідобактерій становить 6,5–7,0. При рН нижче 4,5–5,0 і вище 8,0–8,5 росту не відбувається. Нижче рН 4,1 більшість видів гине менш ніж за тиждень навіть при 4 °С, а нижче рН 2,5 більшість видів гине менш ніж за 3 години [33].

Пептидоглікан (також відомий як муреїн) є основним компонентом клітинної стінки більшості грампозитивних бактерій (приблизно 30–70% клітинних стінок) і грамнегативних (лише незначний компонент клітинної стінки <10%) бактерій. Пептидоглікан в основному складається з ланцюгів глікану, що складаються з повторів β -1,4-пов'язаних одиниць дисахариду N-ацетилглюкозаміну та N-ацетилмурамової кислоти, з'єднаних короткими пептидами. Склад і структура пептидоглікану досить постійні серед грамнегативних бактерій, але значно відрізняються серед грампозитивних бактерій. Клітинна стінка *B. longum* містить пептидоглікан типу A3 β за Шлейфером та Кандлером (типи перехресних зв'язків), A21.3 за Шуманом. Амінокислотна послідовність пептидоглікану *B. longum* - L-Орн-L-Сер-L-Ала-L-Тре-L-Ала. Ліпідний склад клітинних стінок біфідобактерій представлений фосфатидилінозитольними ліпідами, яким характерна відсутність азотовмісних фосфоліпідів, нерозгалужених насичених жирних кислот і мононенасичених жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю в ланцюзі жирних кислот. Зокрема, в клітинних стінках зустрічаються фосфатидилгліцерин, дифосфатидилгліцерин і аланілфосфатидилгліцерин. 60% маси клітинної стінки займають тейхоеві кислоти. *B. longum* притаманні ліпоглікани, оскільки у бактерій з високим вмістом гуаніну та цитозину (більше 55 моль%) ліпотейхоеві кислоти замінені на ліпоглікани. Серед полісахаридів клітинної стінки *B. longum* можуть

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

бути L-рамноза і галактоза, галактофураноза і галактопіраноза з глюкопіранозою у якості розгалужених полісахаридів.

Різні види біфідобактерій здатні синтезувати різні види жирних кислот, хоча пальмітинова кислота характерна для всіх видів. *B. longum* синтезує пальмітинову, лауринову, міристинову, стеаринову, елаїдинову, лінолеву, олеїнову жирні кислоти [30].

B. longum має високий вміст гуаніну та цитозину G+C: 60,5 моль% у *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, 61 моль% у *Bifidobacterium longum subsp. longum* та 62 моль% у *Bifidobacterium longum subsp. suis*. Крім того *Bifidobacterium longum*, мабуть, єдиний вид серед тих, що зазвичай зустрічаються в людських фекаліях, який має велику різноманітність плазмід [29].

Більшість бактерій розмножуються нестатевим бінарним поділом, і *Bifidobacterium longum* не є виключенням. Бінарний поділ починається з реплікації ДНК, яка відкривається в пухирець. Реплікаційний пухирець розділяє подвійний ланцюг ДНК, кожен ланцюг діє як матриця для синтезу дочірнього ланцюга шляхом напівконсервативної реплікації, доки вся прокаріотична ДНК не буде дубльована. Після цього процесу клітинний ріст відбувається там, де кожен кільцевий ланцюг ДНК прикріплюється до клітинної мембрани. Потім клітина подовжується, викликаючи розрив хромосоми на дві частини. Поділ клітин у бактерій контролюється декількома білками, які збираються навколо місця поділу, відомого як FtsZ. Там ці білки керують складанням перегородки відділу. Клітинна стінка та плазматична мембрана починають рости в поперечному напрямку майже від середини клітини, що ділиться, і батьківська клітина поділяється на дві майже однакові дочірні клітини, кожна з яких має ядерне тіло. Потім клітинна мембрана інвагінує (вростає всередину) і розщеплює клітину на дві дочірні клітини, розділені щойно вирощеною клітинною пластинкою [34].

Bifidobacterium longum має резистентність до аміноглікозидів, які включають: фраміцетин, гентаміцин, канаміцин, неоміцин, параміцину сульфат і стрептоміцин; поліпептидів - поліміксин В; хінолонів: налідиксової кислоти та

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

офлоксацину та антибіотиків фузидової кислоти та метронідазолу. Внутрішня стійкість до аміноглікозидів, ймовірно, зумовлена відсутністю цитохром-опосередкованого транспорту сполук серед анаеробів. Дія метронідазолу зумовлена переважним відновленням вихідної сполуки системою бактеріального феридоксину, що призводить до утворення проміжного продукту, відповідального за розриви дволанцюгової ДНК. Деякі штами біфідобактерій не мають системи феридоксину, відповідальної за відновлення вихідної сполуки, і мають високий ступінь резистентності до метронідазолу, препарату, активного проти практично всіх облігатних анаеробів [29].

Bifidobacterium longum здатен продукувати бактеріоцини, але кількість та вид бактеріоцинів сильно залежать від штаму. Наприклад, біфідин I з *B. longum subsp. infantis* BCRC 14602 (частково секвенований), і лантибіотичний бізин з *B. longum subsp. longum* DJO10A, які мають гомологію з їх N-кінцевою областю. Нелантибіотичний бактеріоцин з *B. longum subsp. infantis* LH_664 біфідокоцин_664, виявляє помірну проти *C. perfringens* та імуномодулюючу активність [35].

Біфідобактерії населяють травну систему людини, і одним з пристосувань, що дозволяє їм затримуватися у кишківнику, є здатність до адгезії. Адгезивні властивості варіюються в залежності від штаму, і є одним з механізмів захисту кишківника біфідобактеріями [36].

Оскільки біфідобактерії є дуже вимогливими до складу поживного середовища і не здатні рости на синтетичних поживних середовищах через нестачу таких важливих компонентів як олігосахариди та L-цистеїн, а також біфідус-факторів, для їх культивування використовують складні напівсинтетичні середовища, що містять джерела вуглеводів та нітрогену, а також неорганічні солі. До середовищ можуть додавати полісорбат твін 80 для того, щоб компоненти середовища краще змішувалися. Дуже часто для культивування нема потреби у використанні селективних середовищ, оскільки забезпечується анаеробний режим та асептика процесу, тому біфідобактерії можуть культивувати на середовищах

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						30
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

для лактобактерій та інших пробіотичних культур-анеробів. Деякі з середовищ, що застосовуються:

- Середовище Блаурокка містить пептон, лактозу, цистеїн, NaCl, агар, печінковий настій, та має рН 7,0-7,2.
- Казеїново-дріжджове середовище, що містить панкреатичний гідролізат казеїну, дріжджовий аутолізат, лактозу, натрію хлорид, агар-агар, L-цистин та ін [11].
- Також використовують середовище Біфідум, що містить панкреатичний гідролізат казеїну, екстракт пекарських дріжджів, глюкозу, лактозу, цистеїн, NaCl, MgSO₄, аскорбінову кислоту, ацетат натрію, лимоннокислий амоній, агар, та має рН 6,8-7,3.
- Кукурудзяно-лактозне середовище відрізняється доступністю та дешевизною, оскільки містить пептон, глюкозу, лактозу, цистеїн, MgSO₄, лимоннокислий натрій NaH₂PO₄, K₂HPO₄, агар, кукурудзяний екстракт та має рН 7,4-7,5. Таке середовище добре використовується продуцентом, проте не є селективним і не містить біфідус-факторів.
- Ще одним середовищем є модифіковане середовище МРС: пептон, глюкоза, MgSO₄, ацетат натрію, лимоннокислий амоній, MnSO₄, K₂HPO₄, агар, м'ясна вода, дріжджовий аутолізат, печінковий екстракт, твін-80. рН середовища - 6,4- 6,8 [13]. Це складне багатокомпонентне середовище, яке доволі важко стерилізувати та готувати у промислових масштабах. Крім цього, воно дороге, що підвищить кінцеву вартість продукту.

Деякі з наведених вище середовищ у світі використовуються мало і в основному популярні в Україні. У світі для культивування біфідобактерій також використовують середовище ТРҮ (триптон фітонне дріжджове середовище), що має у складі панкреатичний гідролізат казеїну, глюкозу, панкреатичний перевар соєвого шроту, дріжджовий екстракт, K₂HPO₄, цистеїн·HCl, MgCl₂·6H₂O ZnSO₄·7H₂O, CaCl₂, FeCl₃, твін-80 [37].

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1.6 Поширення в природі

Біфідобактерії є типовими представниками індигенної, або ж облігатної кишкової мікрофлори людини та тварин. Їх виділяють з калу немовлят та дорослих людей, а також з людської вагіни. Вони формують мутуалістичні зв'язки з організмом-хазяїном та виконують імонумодулюючі функції. Проживання у кишківнику людини забезпечує анаеробні умови, а також постійне надходження поживних речовин, які не можна знайти вільно. Колонізація біфідобактеріями відбувається у момент проходження дитини через пологові шляхи. *Bifidobacterium longum* співіснує з іншими бактеріями, що населяють кишківник та жіночу піхву, такими як бактерії роду *Lactobacillus*. *Bifidobacterium longum* можна виділити зі стічних вод та забруднених стічними водами річок, куди продуцент потрапляє з людських фекалій.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика цільового продукту

Цільовим продуктом є дієтична добавка, що містить ліофільно висушену біомасу клітин *Bifidobacterium longum subsp. infantis* S12 (він же *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697) у кількості не менше ніж $1 \cdot 10^9$ КУО/доза. Дієтична добавка має вигляд порошкоподібної пористої або кристалічної маси бежевого кольору різної інтенсивності або бежевого кольору із сіруватим відтінком зі специфічним запахом і смаком. Пакування – флакони №10, у кожен флакон 5 або 10 доз.

Згідно з визначенням ДФУ 2.0, дієтичні добавки (ДД) – це вітамінні, вітамінно-мінеральні або трав'яні добавки окремо та/або у поєднанні у формі таблеток, порошків тощо, які приймаються орально разом з їжею або додаються до їжі в межах фізіологічних норм для додаткового порівняно зі звичайним харчуванням вживання цих речовин; дієтичні добавки також містять різні речовини або суміші речовин, у тому числі протеїни, вуглеводи, амінокислоти, їстівні масла та екстракти рослинних і тваринних матеріалів, живі мікроорганізми та/або їх метаболіти, що вважаються необхідними або корисними для харчування та загального здоров'я людини [38]. За дією ДД умовно поділяють на 3 групи: нутрицевтики, парафармацевтики та пробіотики. Дієтичні добавки, що містять живі культури мікроорганізмів або їх метаболіти, відносять до групи пробіотиків. Існує класифікація пробіотиків, що ділить їх на покоління:

I покоління – монокомпонентні добавки. Містять один штам бактерій (біфідобактерій, лактобактерій, колібактерій, аерококів та ін.);

II покоління – антагоністи, що самостійно елімінуються з організму. Складаються зі спорових бацил та дріжджеподібних грибів;

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Карпенко Ч. О.			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.							33	125
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Литвинов Г. С.						
Затверд.								

III покоління – комбіновані добавки. Містять кілька штамів бактерій. Бактерії, що входять до його складу, можуть належати до одного або різних видів та посилюють дію один одного;

IV покоління – синбіотики – комбінація пробіотичного і пребіотичного компонента;

V покоління – рекомбінантні або генно-інженерні пробіотики створені на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів та метаболітів, мають задані характеристики [13].

Дієтична добавка, що містить ліофільно висушену біомасу клітин *Bifidobacterium longum subsp. infantis* S12 відноситься до I покоління пробіотиків.

Доповнення 5 Державної Фармакопеї України 2.0 містить загальну монографію «Живі біотерапевтичні лікарські засоби для застосування людиною». Ця монографія не зосереджена на дієтичних добавках, проте вона описує методи перевірки та вимоги до лікарських препаратів, що містять живі мікроорганізми, які можна застосовувати і при виробництві дієтичних добавок.

2.2 Схема хімічних перетворень

Основними джерелами карбону у обраному поживному середовищі Біфідум є глюкоза, лактоза та компонент невизначеного складу – екстракт пекарських дріжджів. Точний компонентний склад дріжджового екстракту визначити важко, оскільки існує багато факторів, що впливають на склад та його якість, такі як середовище, на якому культивували дріжджі, час культивування, спосіб та час обробки тощо. У огляді [39] наведено загальний склад екстракту пекарських дріжджів, і його основними компонентами є матеріал клітинної стінки та вміст клітин дріжджів (в основному - *Saccharomyces cerevisiae*). Клітинні стінки дріжджів в основному складаються з олігосахаридів манози та β -глюканів. β -глюкани в свою чергу є полімерами β -D-глюкози. Лактоза (β -D-галактозидо-1,4- α -D-глюкоза) є дисахаридом, що складається із залишків β -галактози та α -глюкози, сполучених 1,4-глікозидним зв'язком.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Як згадувалося у розділі 1, *B. longum* отримує енергію у ході гетероферментативного, або ж фосфокетотазного молочнокислого бродіння (рис. 2.1).

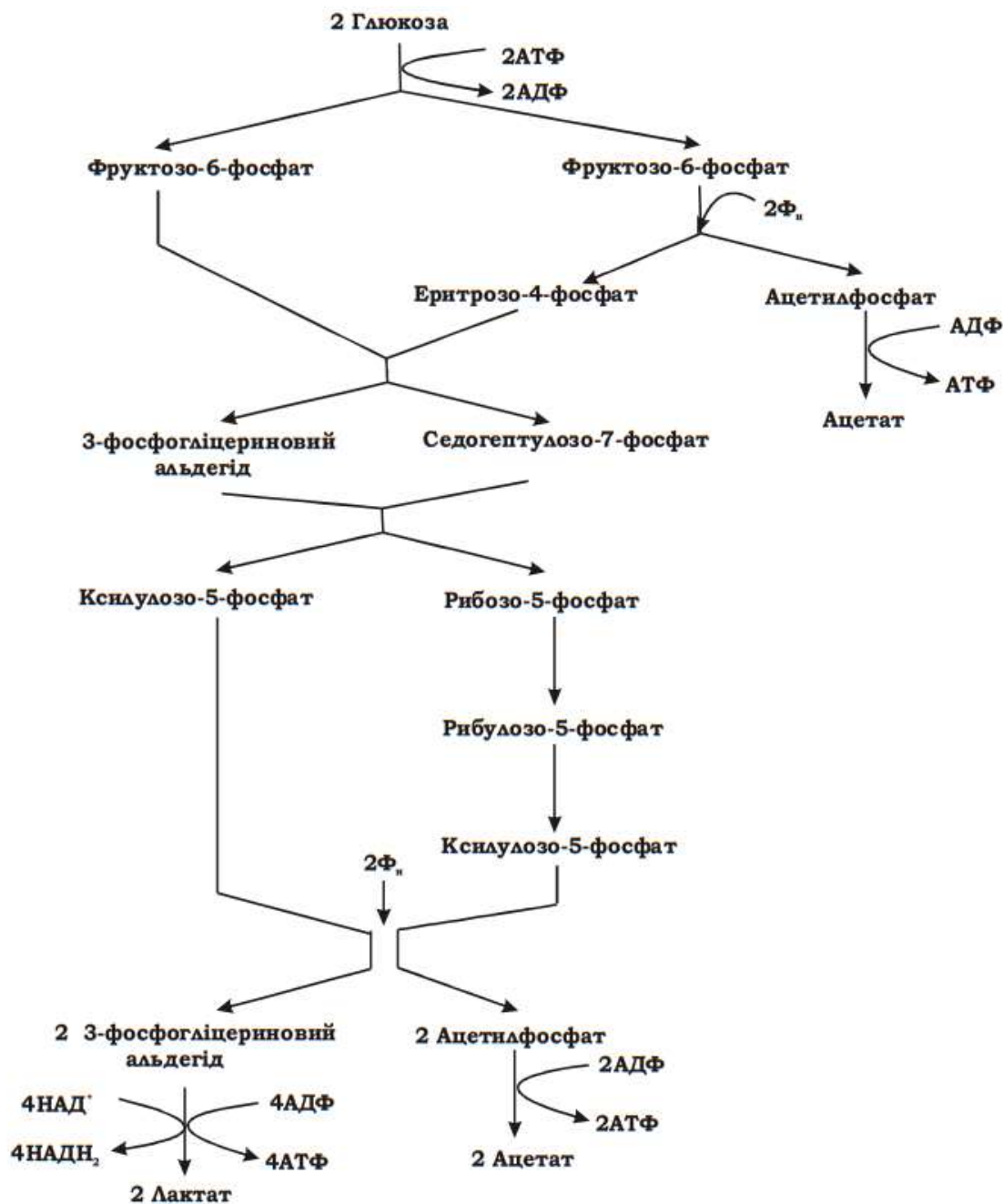


Рисунок - 2.1 Схема біфідоного шунта – гетероферментативного бродіння біфідобактерій [40].

Відсутність ферментів гліколітичного шляху фруктозодифосфатальдолази та тріозофосфатізомерази робить неможливим збродження глюкози шляхом гліколізу. Натомість глюкоза за допомогою гексокінази глюкозо-6-фосфатази

перетворюється на два глюкозо-6-фосфата, які в свою чергу за допомогою ізомерази перетворюються на 2 фруктозо-6-фосфата. Подальше перетворення є характерним саме для біфідобактерій, оскільки у ньому задіяний специфічний ензим фруктозо-6-фосфатфосфокетолаза, який характерний лише для бактерій роду *Bifidobacterium*, але не для інших анаеробних Грам-позитивних бактерій з родів *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, та *Propionibacterium* [29]. Фруктозо-6-фосфатфосфокетолаза каталізує перетворення одного фруктозо-6-фосфату на еритрозо-4-фосфат та ацетилфосфат. Другий у свою чергу перетворюється на ацетат, відновлюючи 1 АДФ до 1 АТФ. Еритрозо-6-фосфат за сприяння трансальдолази вступає у реакцію з позосталим фруктозо-6-фосфатом, утворюючи 3-фосфогліцериновий альдегід та седогептулозо-7-фосфат. На наступних етапах обидва продукти обмінюються C₂-фрагментами, перетворюючись у ксилулозо-5-фосфат та рибозо-5-фосфат, реакцію каталізує транскетолаза.

Рибозо-5-фосфат за участі рибозо-5-Р ізомерази перетворюється на рибулозо-5-фосфат, який за участі рибулозо-5-Р епімерази перетворюється на ксилулозо-5-фосфат. Фруктозо-6-фосфатфосфокетолаза знову бере участь у метаболізмі і перетворює ксилулозо-5-фосфат на дві молекули ацетилфосфату та дві молекули 3-фосфогліцеринового альдегіду. Останні окиснюються до двох молекул пірувату. Піруват відновлюється до лактату з відновленням 4 АТФ, а ацетилфосфат за допомогою ацетаткінази перетворюється в ацетат з виділенням 2 АТФ. Сумарно на 2 молекули глюкози припадає 2 молекули лактату, 3 молекули ацетату та 5 молекул АТФ (біфідний шунт здійснює відновлення 7 молекул АДФ до 7 АТФ, але 2 молекули АТФ витрачаються на перетворення глюкози на фруктозо-6-фосфат) [41], [40].

Лактоза, що зазвичай надходить у травну систему з молочних продуктів, розкладається на моносахариди лактазами людини, або ж β -галактозидазами *B. longum*. Оскільки у поживному середовищі ферментера відсутні людські лактази, вся лактоза, що міститься у середовищі, за допомогою β -галактозидаз

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

розщепляється на глюкозу та галактозу. Глюкоза проходить перетворення безпосередньо у біфідному шунті, а перетворення галактози починається так званим шляхом Лелуара. Перші кроки цього катаболізму справджуються і для біфідобактерій; β -d-галактоза епімеризується, фосфорилується і, нарешті, піддається дії галактозо-1-фосфат-уридилтрансферази з утворенням глюкозо-1-фосфату. Однак у біфідному шунті продукт глюкозо-1-фосфату перенаправляється на утворення фруктозо-6-фосфату, який включається у фруктозо-6-фосфокетотлазний шлях. Отже, із однієї молекули лактози вихід становить припадає 2 молекули лактату, 3 молекули ацетату та 5 молекул АТФ [30].

β -глюкани також утилізуються *B. longum*. Однак *Bifidobacterium longum subsp. infantis* не продукує екзоферменти глюканаз та β -глюкозидази. Натомість метаболізм β -глюканів проходить всередині клітини. Імовірний механізм їх поглинання такий: спочатку відбувається зв'язування молекул β -глюкану на поверхні клітини, потім інтерналізація молекул β -глюкану через клітинну мембрану транспортерами вуглеводів типу АВС-транспортерів (АТФ-зв'язувальні касетні транспортери) або білками фосфотрансферазна система (ФТС), а потім розщеплення полімеру β -глюкану до глюкози або олігосахаридів під дією β -глюкангідролаз. Кінцевим етапом є включення глюкози в центральний шлях ферментації – біфідний шунт. У грампозитивних бактерій транспортери АВС для цукрів складаються з кількох білкових компонентів: білка, що зв'язує субстрат, в клітинній мембрані, що піддається зовнішньому впливу клітини на специфічні для цільових молекул вуглеводів; два інтегральних мембранних білка, відповідальних за формування транспортного каналу; АТФ-зв'язуючий білок як АТФ-гідролізуючий компонент (АТФ-аза) для джерела енергії транслокації. Захоплені молекули β -глюкану переміщуються через канал вузла АВС, який отримує енергію від гідролізу АТФ. ФТС бере участь у транспортуванні та фосфорилуванні великої кількості вуглеводів як у грамнегативних, так і в грампозитивних бактерій. ФТС складається з неспецифічних розчинних білків:

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ферменту I (E I) і гістидинового білка (HPr), а також специфічного для вуглеводів компонента ферменту II (E II). ФТС каталізує фосфорилування вуглеводів у поєднанні з його транслокацією через клітинну мембрану. Згідно з інформацією про геном, *B. longum* має ФТС, специфічний для глюкози та N-ацетилглюкозаміну [42].

Всі вищенаведені процеси проходять за умов, що наближені до умов у яких продуцент знаходиться у природі. Температура 37 ± 1 °C, pH 6,8-7,3, анаеробні умови при відсотковому вмісті N₂ – 99%, CO₂ – 1%.

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Основним компонентом, що відповідає за дію дієтичної добавки є біомаса пробіотичних бактерій *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697, причому концентрація живих клітин має бути не менша ніж $1 \cdot 10^9$ КУО/доза. Крім біомаси бактерій добавка містить складові середовища для культивування (середовище Біфідум), та складові захисного середовища, а саме:

- Молоко знежирене - від 15 до 25% (ДСТУ 2661:2010 та ДСТУ ISO 7208:2002)
- Цукор білий дрібнокристалічний – від 7 до 10 % (ДСТУ 4623:2006)
- Желатин від - 0,7 до 1,0 % (ТУ У 24.6-00418030-002-2007)

Молоко знежирене – це молочний продукт, що утворюється у процесі сепарування, тобто розділення молока на вершки і знежирене молоко за допомогою сепараторів-вершковідокремлювачів. Під час технохімічного контролю перед початком сепарування визначають кількість молока і масову частку жиру, а після закінчення — вміст жиру в середніх пробах вершків і знежиреного молока. За різницею між кількістю сепарованого молока і вершків визначають масу знежиреного молока [43]. У знежирене молоко переходить основна частина білкових речовин, вуглеводи, мінерали, біологічно активні речовини. Масова частка сухих речовин знежиреного молока – близько 9 %, у

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

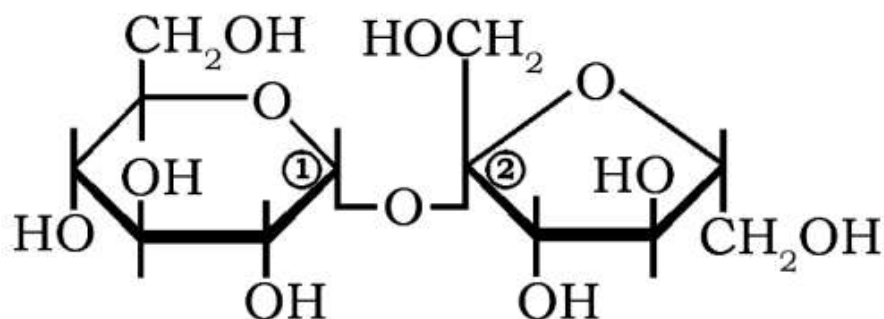
тому числі масова частка жиру не вище 0,05%. У знежиреному молоці близько 3,3% білку та 4,7% вуглеводів [44]. рН молока становить 6,6 – 6,7, густина – 1,0287. Оскільки процес сепарації відділяє лише жир, молоко зберігає більшість водорозчинних вітамінів, білки, вуглеводні компоненти та солі. Молочні білки бувають двох різних типів: сироватковий білок (білки сироватки) і казеїн. Казеїн становить понад 80% від загального білка в молоці, сироватковий білок містить β -лактоглобулін і α -лактальбуміни, протеозопептони (частково отримані в результаті гідролізу β -казеїнів) і невелику кількість білків крові, сироваткового альбуміну та імуноглобулінів. Лактоза є основним вуглеводом у молоці, і її концентрація коливається залежно від надою від 4,2 до 5%. Лактоза є одним із найменш розчинних цукрів, її розчинність у воді становить лише 17,8% при 25 °С [46].

Цукор білий дрібнокристалічний – харчовий продукт, який являє собою очищену і кристалізовану сахарозу у вигляді окремих кристалів. Цукор призначено для реалізації через роздрібну торговельну мережу, використання в системі ресторанного господарства та для промислового перероблення у різних галузях харчової промисловості (кондитерській, хлібопекарській, молочній, харчоконцентратній, біофармацевтичній), для виробництва лікєро-горілочаних і безалкогольних напоїв та продуктів дитячого харчування тощо. Дрібнокристалічний цукор та цукрова пудра – це білий цукор, який пройшов процес помолу. Цукрова пудра містить кристали розмірами не більше ніж 0,2 мм, цукор - від 0,2 мм до 2,5 мм. Основним компонентом цукру є сахароза, вміст якої може варіюватися від 99,5% до 99,7% в залежності від категорії цукру. Вміст редукувальних речовин може становити від 0,065% до 0,04% в залежності від категорії цукру [46].

Сахароза $C_{12}H_{22}O_{11}$ - солодка на смак, добре розчинна у воді й нерозчинна в етанолі, тетрахлорметані, хлороформі та інших вуглеводнях. Розчини сахарози не мутаротують. Молярна маса сахарози становить 342,30 г/моль. Щільність сахарози 1,587 г/см³. Фізичний вигляд сахарози — біла та кристалічна тверда

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

речовина. Температура плавлення сахарози 459 К. Вона кристалізується без води, температура плавлення 185 °С. Для розчину сахарози $[\alpha]^{20}_D = 66,5^\circ$. Під час гідролізу сахароза розщеплюється на монози – глюкозу та фруктозу. Гідролізат сахарози, який є еквімолекулярною сумішшю цих моноз, має кут питомого обертання -20° , оскільки ці гексози мають протилежні кути питомого обертання ($[\alpha]^{20}_D$ глюкози = $+52,5^\circ$, $[\alpha]^{20}_D$ фруктози = $-92,5^\circ$). Сахароза складається з α -D-глюкопіранози й β -D-фруктофуранози, з'єднаних між собою глікозидними гідроксилами (рис. 3.1)[48]. Коли сахароза нагрівається до температури вище 186 °С, сахароза вступає в реакцію розкладання з утворенням карамелі.



α -D(+)-глюкопіранозил-1,2- β -D(-)-фруктофуранозид

Рисунок 2.3 – Структурна формула сахарози [48]

Желатин – біополімер, який отримують шляхом термічної денатуралізації колагену, наявного в шкірі та кістках тварин у присутності розбавлених кислот. Желатин складається з великої кількості залишків гліцину, проліну та 4-гідроксипроліну (рис. 3.2)

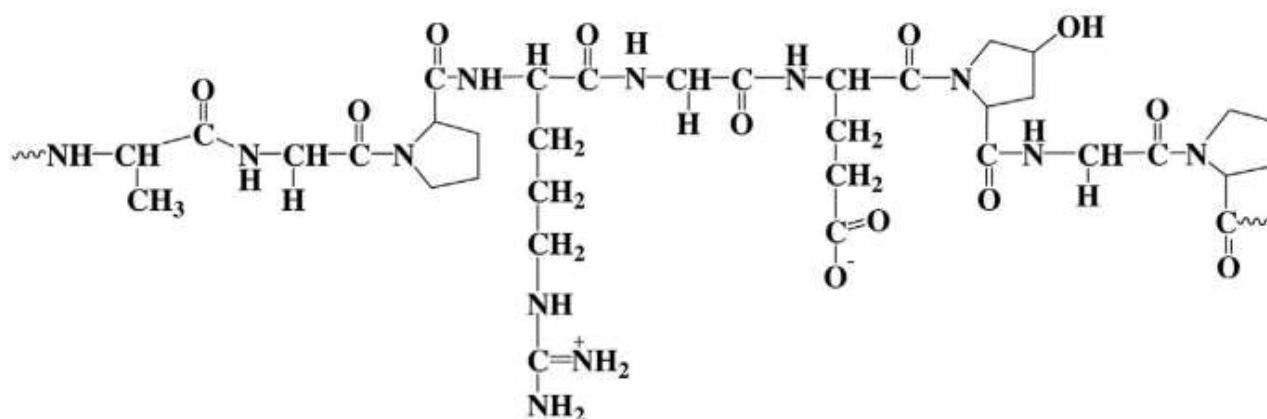


Рисунок 2.4. – Структурна формула желатину [49]

Це напівпрозорі, безбарвні гранули чи порошок, що майже не має смаку. Желатин, отриманий з колагену, може бути кислим або основним залежно від методу екстракції. Він в основному використовується як гелеутворювач у харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості та утворює гель при охолодженні нижче 35°C. Гелі, утворені желатином, є прозорими, еластичними та термооборотними. При температурі вище 35°C желатин існує як єдина молекула, яка не здатна утворювати міжланцюгові водневі зв'язки. При більш низькій температурі желатин існує в конфігурації колагенової складки, яка здатна утворювати водневі зв'язки [49].

2.4 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Bifidobacterium longum позитивно впливає на організм людини декількома способами. Як згадувалося раніше, бактерії цього виду є одними з представників облігатної кишкової та вагінальної мікрофлори. Одним з основних механізмів впливу є виділення продуктів метаболізму - молочної та оцтової кислот. Біфідобактерії населяють кишківник людини, де рН становить від 6 до 8,5. Вони використовують вуглеводи, переважно моно- та олігосахариди для отримання енергії. Органічні кислоти, що є продуктами такого метаболізму, знижують рН у кишківнику, і чинять антибактеріальну дію проти ряду патогенних бактерій, таких як *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* and *S. dysenteriae* [50],

B. longum subsp. infantis ATCC 15697 має повний набір генів, які беруть участь у біосинтетичному шляху декількох вітамінів групи В [51]: фолат В₉ (як з гуанозинтрифосфату, так і з хоризмату), ніацину В₃ та рибофлавіну В₂. Вітаміни групи В – це водорозчинні вітаміни, які є попередниками важливих коферментів, що каталізують різноманітні біологічні реакції. Фолієва кислота В₉ є за хімічною природою похідним птеринів — птероїлглутаміновою кислотою, що містить у складі молекули сполучені з похідним птеридину (птерином) фрагменти п-амінобензойної кислоти (ПАБК) та L-глутамату. Коферментною формою фолієвої кислоти є її гідроване похідне 5,6,7,8-тетрагідрофолієва кислота (ТГФК). Функції

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						41
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТГФК як кофермента полягають у міжмолекулярному переносі одновуглецевих фрагментів (метильного, метиленового, метенільного, оксиметильного, формільного, форміміно), що використовуються в багатьох реакція обміну амінокислот, синтезі нуклеотидів (тимідилату ДНК, пуринових ядер ДНК та РНК), фізіологічно активних сполук [52]. Ніацин В₃ - піридин-3-карбонова кислота) та її амід, які є в організмі взаємно перетворюваними молекулярними формами. Цей вітамін бере участь у ряді важливих реакцій, таких як окислення субстратів ліпідного, вуглеводного та амінокислотного метаболітичних шляхів. Коферментними формами вітаміну РР є коферменти анаеробних дегідрогеназ НАД (нікотинамідаденіндинуклеотид) та НАДФ (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат), до складу яких входить амід нікотинової кислоти [52]. Рибофлавін В₂ - основі молекули лежить структура ізоалоксазину – гетероцикл, який є сполученням бензольного, піразинового та піримідинового кілець. Крім того, до складу вітаміну входить спирт рибіт. Рибофлавін служить структурним елементом флавінмононуклеотиду (ФМН, FMN) і флавінаденіндинуклеотиду (ФАД, FAD), які є простетичними групами численних оксидоредуктаз (дегідрогеназ) [52].

Було виявлено, що *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 здатний до синтезу фітаз – ферментів з класу фосфатаз, які каталізують послідовний гідроліз міоїнозитолгексакісфосфату (InsP₆) або фітату, основної форми накопичення фосфору в рослинах, для зниження похідних міоїнозитолфосфату. Фітази мають потенціал до вивільнення зв'язаного фосфору для засвоєння його людиною [53].

Ще одним важливим механізмом впливу *B. longum* є його природна здатність до адгезії як представника облигатної кишкової мікрофлори. Хороша здатність до адгезії може блокувати адгезію патогенів шляхом конкуренції за сайти зв'язування клітин-господарів. Вони разом з іншими представниками мікробіоти кишечника утворюють біоплівки - структуровані спільноти мікроорганізмів, які прилипають до поверхонь і укладені в саморозвинену полімерну матрицю. Біоплівки часто асоціюються з інфекцією, оскільки

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

утворення цієї структури робить патогени більш стійкими до захисних механізмів господаря та антимікробних сполук. Утворення та розвиток біоплівки пробіотичними бактеріями може бути корисною властивістю, оскільки це може сприяти їх довготривалій стійкості в кишечнику, уникаючи колонізації ентеропатогенами [54].

B. longum subsp. infantis ATCC 15697 також прямо та непрямо виявляє протизапальні властивості. Алергічні та аутоімунні захворювання охоплюють групу запальних розладів, спричинених аномальними імунними реакціями, у яких CD25 + forkhead box P3 (скурфін) –позитивні регуляторні Т-клітини (Treg), які зазвичай пригнічують запальні процеси, часто мають порушені функції. Геномна ДНК *B. longum subsp. infantis* є потужним індуктором Treg [56]. Також ці бактерії здатні запобігати виникненню некротичного ентероколіта у немовлят – серйозного некротичного запалення кишечника. Запропонований механізм захисту полягає у тому, що продуцент метаболізує триптофан з грудного молока, синтезуючи індол-3-молочну кислоту. Індол-3-молочна кислота опосередковує механізм протизапальної дії в незрілих ентероцитах людини (H4). Вона зв'язується з TLR-4 і рецептором AHR, щоб перешкоджати його транскрипції запального цитокіну IL-8, який викликає надмірне запалення в передчасному кишечнику, що призводить до некротичного ентероколіта [56], [57].

Окрім вищеперерахованого, *B. longum* також бере участь у кишковому метаболізмі. Цей організм може метаболізувати ряд сполук: D-арабінозу, D-фруктозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-рибозу, L-фукозу, метилальфа-D-глюкопіранозид, лактозу, мальтозу, мелібіозу, рафінозу, сахарозу, тиранозу, D-глюкуронову кислоту, інулін. Людське молоко та молоко корів, кіз містять комплекс олігосахаридів, відомих як олігосахариди людського молока НМО. Комплекс таких олігосахаридів у раціоні немовляти є потужним стимулятором росту для біфідобактерій, а надто для *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697, який було виділено з калу здорового немовляти та з його кишківника [58] .

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						43
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

B. longum subsp. infantis ATCC 15697 є одним з найстаріших відомих штамів *B. longum*. Його було виділено в 1950-х роках і спочатку було описано як *Lactobacillus bifidus*. Таксономія *B. longum subsp. infantis* було піддано декільком змінам і врешті-решт було описано та прийнято як підвид *Bifidobacterium longum*, для якого типовим штамом є один із штамів, виділених Норрісом та ін. у 1950 році, депонований під номером ATCC 15697 [59].

3.1.1 Особливості геному, наявність плазмід та/або інших генетичних структур. Наявність генетичних карт обраного продуценту або типового представника групи.

Геном *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 було розшифровано повністю. Відомо, що його довжина може несуттєво варіюватися, проте прийнята і усталена довжина – 2832777 нуклеотидів. Геном представляє собою кільцеву молекулу ДНК (рис. 3.1), вміст %C+G – 59,86%. Плазмід *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 не має, має 4 16s рРНК та 4 23s рРНК.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Карпенко Ч. О.					44	125
Конс.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Литвинов Г. С.						
Затверд.								

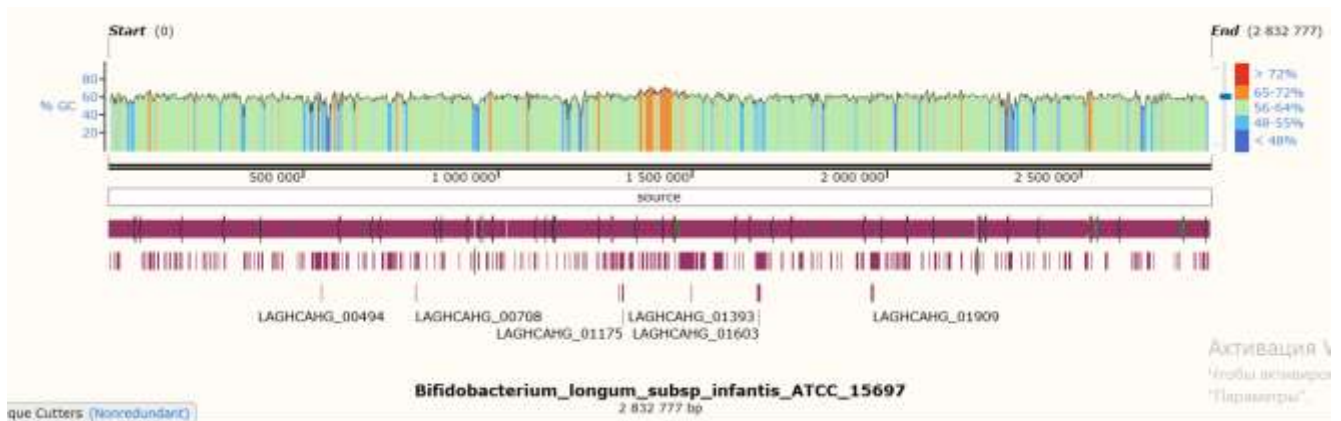


Рисунок 3.1 - Геном *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 (кругова плазміда зображена лінійно) з демонстрацією вмісту %C+G на різних ділянках [60]
Геном містить ген *tetO*, що відповідає за резистентність до тетрацикліну.

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.

Природний відбір — це будь-який процес відбору, який відбувається в результаті здатності організму пристосовуватися до навколишнього середовища. Штучний відбір, з іншого боку, — це вибіркове розведення, яке нав'язується зовнішнім суб'єктом, як правило, людьми, з метою підвищення частоти бажаних ознак. Спосіб життя біфідобактерій робить процес штучного відбору майже неможливим, оскільки немає зручної можливості спостерігати за змінами їх синтезу та пробіотичних якостей і відбирати потрібні штами водночас. Більшість виділених штамів була знайдена випадково, виділена з фекалій немовлят людини, оскільки біфідобактерії – строгі анаероби і у природі зустрічаються лише у кишківнику різних ссавців, таких як людина та свиня, у мікрофлорі жіночих статевих органів, а а також у бджолах. Виділення штаму *B. bifidum* призвело до активізації науковців, що почали виділяти нові і нові штами біфідобактерій. Вони досліджували їх якості на різних поживних середовищах та різних умовах росту. У біфідобактерій доволі стійкий геном (високий вміст Г+Ц пар), тому спонтанні

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

мутації у них зустрічаються рідко. Отже, методи природного та штучного відбору використовувалися переважно на початку відкриття і зараз поширені мало.

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

Оскільки біфідобактерії не дуже піддаються мутаціям, не є суперпродуцентами будь-яких речовин і не є зручним організмом для досліджень через анаеробність, їх рідко досліджують в цих напрямках та піддають дії мутагенів. Біфідобактерії використовують для виробництва пробіотичних добавок, що відносяться до категорії харчових продуктів або лікарських засобів у багатьох країнах, що обмежує використання генетично модифікованих організмів. Проте з метою отримання пробіотичних штамів, що продукують додаткові корисні сполуки, такі як амінокислоти, вітаміни, бактеріоцини, біфідобактерії піддають дії різних мутагенних факторів.

Одним з прикладів є створення мутантів *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697, що здатні до надпродукування вітаміну рибофлавіну [61]. Рибофлавін (тобто вітамін B2) є попередником флавінмононуклеотиду (FMN) і флавінаденіндинуклеотиду (FAD), кофакторів, що діють як важливі переносники електронів в окисно-відновних реакціях клітинного метаболізму. Зокрема, серед біфідобактерій присутність повного шляху біосинтезу рибофлавіну та пов'язаного з ним кластера поки що була зареєстрована лише у *B. longum subsp. infantis*.

Бактерії синтезують ФМН і ФАД починаючи з однієї молекули гуанозин 5'-трифосфату (ГТФ) і двох молекул рибулозо-5'-фосфату. Ферменти біосинтезу рибофлавіну RibAB, RibD, RibE і RibH кодуються *rib* опероном, тоді як гени, що кодують RibCF і RibU, останній з яких є транспортером для поглинання попередньо сформованого рибофлавіну, зазвичай розташовані в інших ділянках хромосоми. Перший етап біосинтезу рибофлавіну каталізується ферментом GTP-циклогідролазою/дигідрокси-2-бутанонфосфатсинтазою (RibAB), який відповідає за утворення форміату та 3, 4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфату (DHBP) з D-

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	4/6
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

рибулозо-5-фосфату та 2,5-діаміно-6-бета-рибозил-4(3Н)-піримідинон-5'-фосфату (DARP) з ГТФ, які є попередниками ароматичного кільця рибофлавіну. Рибозоредуктаза/дезаміназа (RibD) каталізує подальше відновлення бічного ланцюга рибози в DARP з утворенням 5-аміно-6-(5-фосфо-D-рибітиламіно)урацилу. Останні два етапи цього шляху завершуються лумазинсинтетазою (RibH) та рибофлавінсинтетазою (RibE). Утворений рибофлавін потім перетворюється шляхом фосфорилювання на FMN і FAD за допомогою реакції, що каталізується рибофлавінкіназою/ФАД-синтазою. У *Firmicutes* та актинобактерій біосинтез de novo регулюється за допомогою механізму зворотного зв'язку, що включає атенуацію транскрипції через рибозмін мРНК FMN-рецептора. Якщо він присутній, FMN з високою афінністю зв'язується з 5'-нетрансльованою ділянкою (5'-UTR) транскрипту *rib* оперону, який слугує FMN-зв'язуючим аптамером. Зв'язування призводить до переходу транскрипту в анти-анти-термінаторну структуру, що дозволяє сформувати шпильку термінації, тим самим передчасно завершуючи транскрипцію *rib* оперону. Розофлавін є антибактеріальною сполукою та структурним аналогом рибофлавіну, що виробляється *Streptomyces davawensis*. Цей антиметаболіт зв'язується з активним центром FAD-синтетази та флавокінази, утворюючи неактивні комплекси розофлавінмононуклеотиду (RoFMN) і розофлавінаденіндинуклеотиду (RoFAD), тим самим пригнічуючи основні клітинні реакції. Крім того, RoFMN імітує FMN у регулюванні рибо-вимикача та пригнічує вироблення вітаміну de novo. Виділення спонтанних резистентних до розофлавіну мутантів є надійним методом отримання штамів різних видів із надлишковою продукцією рибофлавіну, оскільки підвищена продукція вітаміну протидіє токсичності розофлавіну шляхом конкурентного зв'язування з FAD-синтетазою. Щоб отримати спонтанні мутанти з покращеною продукцією рибофлавіну, *B. infantis* ATCC 15697 піддавали впливу 25 і 50 мкг/мл розеофлавіну на чашках з середовищем mSM7lac та інкубували в анаеробних умовах при 37°C протягом 48 годин. Промотор і 5'UTR-області *rib* оперонів семи оцінених мутантів АФК секвенували, щоб ідентифікувати мутації,

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

які, ймовірно, відповідають за збільшення продукції рибофлавіну. Усі мутанти містили одноточкові мутації в різних положеннях передбачуваного рибо-вимикача FMN. Виявлені точкові мутації були переходами $G \rightarrow A$ або $C \rightarrow T$. Три мутанти отримали мутації в одній із двох анти-антитермінаторних областей. Найбільше виробництво рибофлавіну спостерігалось в мутантному ROS25, який, як було показано, отримав мутацію $G \rightarrow A$ в анти-антитермінаторній області рибо-вимикача [61].

3.2.3 Використання методів генної та клітинної інженерії

Методи генної інженерії рідко використовуються для створення нових штамів біфідобактерій. Однією з причин є відсутність плазмід у більшості видів. Однак такі методи знайшли застосування у визначенні та класифікації біфідобактерій [63]. Для класифікації та створення філогенетичних карт часто застосовують 16S рРНК секвенування. 16S рРНК з'єднується з комплексом із 19 білків, утворюючи субодиницю 30S бактеріальної рибосоми. Він кодується геном 16S рРНК, який присутній і добре захищений у всіх бактеріях завдяки його основній функції у складанні рибосом; однак він також містить змінні області, які можуть служити «відбитками пальців» для певних видів. Ці особливості зробили ген 16S рРНК ідеальним генетичним фрагментом для ідентифікації, порівняння та філогенетичної класифікації бактерій. Секвенування гена 16S рРНК базується на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) з подальшим секвенуванням ДНК. ПЛР — це метод молекулярної біології, який використовується для ампліфікації певних фрагментів ДНК за допомогою серії циклів, які включають:

1. Денатурація матриці дволанцюгової ДНК
2. Відпал праймерів (коротких олігонуклеотидів), комплементарних матриці
3. Розширення праймерів за допомогою ферменту ДНК-полімерази, який синтезує новий ланцюг ДНК [63].

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Загальну схему отримання продуцента зображено на рис. 3.2.



Рисунок - 3.2 Схема отримання *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 зі здатністю до надпродукування рибофлавіну (розроблено на основі [61])

1. Купівля ліофілізованої культури *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697

З метою спрощення процесу виділення та забезпечення чистоти культури у банках культури типу ATCC купують ліофілізований зразок культури. Він упакований у ампули з метою збереження анаеробних умов.

2. Первинне висівання культури

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Біомасу накопичують на чашках Петрі з відповідним середовищем, наприклад, середовище Біфідум, Lactobacilli MRS бульйон з 0,5% цистеїну або будь яке інше середовище, рекомендоване банком культур для відновлення ліофілізованої культури. Для збереження анаеробних умов використовують системи GasPack.

Техніка відновлення культури наступна: відкрити флакон згідно з інструкціями. Анаеробні умови для перенесення можуть бути створені за допомогою анаеробної газової камери або розміщення пробірок під системою канюль для газоутворення, підключених до анаеробного газу. Тримаючи анаеробних умовах регідратувати весь осад приблизно 0,5 мл бульйону.

Асептично перенести весь вміст у пробірку на 5-6 мл з бульйоном. Додаткові пробірки можна засіяти, перенісши 0,5 мл пробірки з первинним бульйоном у ці пробірки з вторинним бульйоном. кілька Використати кілька крапель пробірки з первинним бульйоном для інокуляції чашок Петрі та/або косого агару (шпателем Дригальського або мікробіологічною петлею). Інкубувати в анаеробній атмосфері при 37°C протягом 48-72 годин. Інкубувати одну чашку з агаром в аеробних умовах при 37°C, щоб перевірити наявність контамінації.

3. Перевірка чистоти культури

Паралельно з первинним висіюванням проводять перевірку чистоти культури шляхом інкубування однієї з чашок Петрі у аеробних умовах. Середовища не є селективними, отже на них можна виявити ріст контамінантів.

4. Накопичення біомаси

Після перевірки чистоти культури за відсутності контамінантів шляхом мікроскопіювання мазків культур можна накопичувати біомасу у інокуляторах малого об'єму або колбах чи пробірках з середовищем Lactobacilli MRS бульйон з 0,5% цистеїну за температури 37° протягом 48-72 годин. Накопичення біомаси необхідне для наступних етапів, що можуть призвести до втрати біомаси.

5. Висіювання культури на чашки Петрі з розеофлавіном

Готують чашки зі спеціальним середовищем, що містить розеофлавін. Це середовище – модифікований Lactobacilli MRS бульйон з 0,5% цистеїну mSM7

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

наступного складу: 10 × розчин вуглеводів (стерилізований автоклавуванням при 121°C протягом 20 хвилин); 10 × розчин вітаміну (піридоксин, 2 мг/л ; нікотинова кислота, 2 мг/л ; тіамін, 2 мг /л ; пантотенат кальцію, 1 мг /л ; п-амінобензойна кислота, 0,05 мг/л –1 ; біотин 0,05 мг/л ; аскорбінова кислота 1 мг/л ; аденіну сульфат 20 мг/л ; ксантин 40 мг /л; вітамін В 12 0,7 мг/ л ; фолат, 0,5 мг/ л ; стерилізують фільтрацією); 1,25 × базальний розчин 10 г/ л ; ацетат натрію 10 г/ л ; (NH₄)₂SO₄ , 5 г Л –1 ; сечовина 2 г/ л ; MgSO₄ ·7 H₂O, 0,2 г / л ; FeSO₄ ·7H₂O, 0,01 г/ л ; MnSO₄ ·7H₂O, 0,007 г/ л; NaCl, 0,01 г/ л ; Твін 80, 1 г / л ; цистеїн 0,5 г/ л; розеофлавін, 50 мкг/мл;

Середовище автоклавують протягом 30 хв при 110°C після доведення рН до 7,0. Чашки з розеофлавіновим середовищем інкубують у анаеробних умовах за 37°C протягом 48 годин [61].

6. Відбір та розсіювання мутантів

Після інкубації чашок з колоній, що вирости на чашках, роблять суспензії, і роблять висіви у пробірки з 5 мл рідкого середовища mSM7, але замість розеофлавіну у середовищі глюкоза 1%. Культивують анаеробно при 37°C протягом 48-72 годин.

7. Визначення концентрації рибофлавіну

Після культивування частину середовища перевіряють на вміст рибофлавіну методом флуориметрії. Певну кількість середовища розчиняють у дистильованій воді, розчин порівняння – культуральна рідина з пробірки, у якій за ідентичних умов культивувався немутантна культура. Ті мутанти, культуральна рідина з пробірок яких містила найбільшу кількість рибофлавіну, пересіюють для вторинної перевірки.

8. Повторне культивування мутантів

Для того, щоб впевнитися у стабільності мутантів, їх знову культивують на середовищі mSM7 з 1% глюкози, і повторно перевіряють вміст рибофлавіну. Якщо мутанти показують стабільні результати та незмінний підвищений синтез

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

рибофлавіну, їх упаковують у флакони та ліофілізують з метою створення музейної культури для приготування інокуляту.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт – дієтична добавка на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697.

Форма добавки: ліофілізований порошок.

Склад добавки: біомаса *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 у кількості у кількості не менше ніж $1 \cdot 10^9$ КУО/доза, молоко знежирене - від 15 до 25%, цукор білий дрібнокристалічний від 7 до 10 %, желатин від - 0,7 до 1,0 %.

На цю добавку не існує нормативно-технічної документації, оскільки на ринку не представлено продукту, що містить такий вид та штам біфідобактерій. Однак на ринку представлені подібні добавки, що містять один чи декілька штамів біфідобактерій, зокрема «Біфідумбактерин» від ТОВ «Біофарма» [64], «Біфідумбактерин» від ДП «Ензим» [65], «Біфідумбактерин», що виробляється ТОВ «Віво-Актив» (Офіційний дистриб'ютор – ТОВ «СІСТЕМ ФАРМ») [66] та «БІФІДОБАКТЕРИН ЕНЗИФАРМ®» від ТОВ «ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПАНІЯ «ЕНЗИФАРМ» [67]. Всі вищенаведені дієтичні добавки містять штами *Bifidobacterium bifidum*. За основу технологічної схеми виробництва дієтичної добавки узято схему для лікарського препарату «Біфідобактерин», наведеної у підручнику «Технологія пробіотиків: С.О. 13, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог» [13].

Дієтична добавка призначена для підтримки та відновленню балансу мікрофлори кишечника при його порушенні внаслідок лікування антибіотиками, змін клімату під час подорожей, впливу несприятливих факторів навколишнього середовища, стресів, нерегулярного і неякісного харчування, переїдання і зниженні імунітету, відсутності доброякісної питної води. Також добавка може

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розроб.	Карпенко Ч. О.						
Конс.							
Керівн.	Литвинов Г. С.						
Затверд.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Аркуш	Аркушів
						53	125

бути рекомендована до застосування немовлятам, що були народжені шляхом кесаревого розтину, оскільки їх склад кишкової мікрофлори відрізняється від тої, що формується у немовлят, народжених вагінальним шляхом. Дієтична добавка не є лікарським засобом і не може бути використана для лікування, лише з метою профілактики та підтримки. Перед застосуванням, особливо для немовлят, рекомендовано проконсультуватися з лікарем. Фізико-хімічні характеристик добавки наведено у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 - Фізико-хімічні характеристики дієтичної добавки [13]

Назва характеристики	Встановлені значення
Зовнішній вигляд	Порошок кристалічний або ж пориста масу кольору беж різної інтенсивності, з сіруватим відтінком зі специфічним запахом та смаком.
Автентичність	Грам-позитивні палички, 0,5-1,3·3-8 мкм, що мають потовщення на обох кінцях (форма «гирьки») або на одному кінці, розташовані парами, палісадом по три-чотири клітини, ланцюжками чи хаотично. Облігатні анаероби, нерухомі, за грамом забарвлюються нерівномірно, пентози не розщеплюють. На середовищі МРС з 0,5% цистеїну колонії гладкі, опуклі з цілими краями, від кремового до білого, блискучі, м'якої консистенції.
Розчинність	У разі додавання води Р із розрахунку 1 см ³ на одну дозу добавки протягом 5 хв утворюється гомогенна завись сірувато-бежевого кольору
Прозорість	Завись має бути непрозорою.
Кольоровість	Завись повинна мати бежевий або бежевий із сіруватим відтінком колір.
рН	5,5-6,5

Продовження таблиці 4.1

Втрата у масі під час сушіння	Не більше ніж 3,5 %
Специфічна нешкідливість	Добавка має бути нешкідливою
Мікробіологічна чистота	Добавка не повинна містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів.
Специфічна активність: визначення кількості живих біфідобактерій в одній дозі препарату; визначення активності кислотоутворювання препарату	В одній дозі добавки має міститися не менш як 10^9 живих біфідобактерій Показник активності кислотоутворення дієтичної добавки має бути не нижче ніж 90°T
Герметичність	Флакони з добавкою мають бути герметичними.

Пакування

По 5 або 10 доз у скляні флакони типу ФО-1-10 або ФІ-05 зі скла марки НС-1А чи НС-1 за ТУ 9461-025-00480678-99, або у флакони типу ФЛП-10-А чи ФЛП-5-А зі скла марки УСП-1 за ТУ 00480945-006-98, або у флакони типу ФО-1-10 чи ФІ-1-5 зі скла марки НС-3 за ТУ 9461-010-00480514—99 та обтиснуті алюмінієвими ковпачками типу К-2-20 чи К-2-14 за ТУ У 25206109.001—2001 або за ТУ У 28.7-30883300-005-2002, або за ТУ У 14257180.003-98. По 10 флаконів препарату та інструкцію з його використання вкладають у пачку з картону, паперу чи комбінованих матеріалів за ДСТУ 7276:2012 з перегородками або гофрованою вкладкою, або з полімерною вкладкою з плівки полівінілхлоридної для розміщення та фіксації флаконів.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

На флакони наклеюють етикетку з етикеткового паперу, або з паперу для письма, або етикетку на липкій основі. Упаковки з флаконами кладуть у коробки з гофрованого картону за ДСТУ ГОСТ 9142:2019 [13].

Маркування

Маркування дієтичних добавок має відповідати ДСТУ 4260:2003 «Тара і пакування спожиткові. Маркування. Загальні вимоги». На первинному та на вторинному пакуванні, що має відповідати зазначають:

- 1) назву дієтичної добавки;
- 2) перелік інгредієнтів;
- 3) будь-які інгредієнти або допоміжні матеріали для переробки, які наведені у Додатку № 1 до Закону України від 6 грудня 2018 року № 2639-VIII або походять з речовин чи продуктів, наведених у Додатку № 1 до Закону України від 6 грудня 2018 року № 2639-VIII, які використовуються у виробництві або приготуванні дієтичної добавки і залишаються присутніми у кінцевому продукті, навіть у змінній формі (компоненти поживного середовища, наприклад лактоза);
- 4) кількість або відсотковий вміст інгредієнтів у порядку зменшення маси;
- 5) кількість дієтичної добавки в установлених одиницях вимірювання (грами);
- 6) мінімальний термін придатності або дата "вжити до";
- 7) будь-які особливі умови зберігання та/або умови використання (за потреби);
- 8) найменування та місцезнаходження оператора ринку харчових продуктів, відповідального за інформацію про харчовий продукт, а для імпортованих харчових продуктів - найменування та місцезнаходження імпортера;
- 9) країна походження або місце походження;
- 10) скорочену інструкцію з використання (повний варіант, або ж листівку-вкладку кладуть у вторинне пакування разом з флаконами);
- 13) позначення, що ідентифікує партію (лот), до якої (якого) належить дієтична добавка.

За наявності у добавці генетично модифікованих організмів (ГМО), якщо їх частка перевищує 0,9 відсотка в будь-якому інгредієнті харчового продукту, що

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

містить, складається або вироблений з генетично модифікованих організмів, маркування харчового продукту повинно включати позначку "з ГМО".

ЗОператор ринку харчових продуктів, відповідальний за інформацію про харчовий продукт, за бажанням може включити до маркування позначку "без ГМО". У такому разі відсутність ГМО у дієтичній добавці має бути підтверджена відповідно до вимог законодавства про безпечність та окремі показники якості харчових продуктів. Відсутність даних від постачальників про наявність в інгредієнтах дієтичної добавки ГМО є достатнім підтвердженням для нанесення такої позначки на пакування.

Для первинного пакування обов'язковою для зазначення у маркуванні є лише інформація, передбачена пунктами 1, 3, 5 і 6. Інформація, надання якої вимагається пунктом 2, надається в іншій доступній формі або безпосередньо на запит споживача [68].

Крім вищевказаного, в етикетуванні дієтичної добавки слід зазначають:

- 1) назву харчового продукту - «дієтична добавка»;
- 2) назву категорій окремих поживних або інших речовин, що характеризують продукт або які вказують на походження таких окремих поживних або інших речовин;
- 3) кількість (порцію) дієтичної добавки, рекомендовану для щоденного споживання;
- 4) попередження не перевищувати зазначену рекомендовану кількість (порцію) для щоденного споживання;
- 5) вказівку про те, що дієтичні добавки не слід використовувати як заміну повноцінного раціону харчування;
- 6) застереження про те, що продукт потрібно зберігати в недоступному для дітей місці [69].

Всі додаткові вимоги до оформлення етикетки та маркування пакування наведені у Законі України «Про інформацію для споживачів щодо харчових продуктів».

Транспортування

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Вимоги до транспортних засобів, що здійснюють транспортування дієтичної добавки, викладені у статті 44 Закону України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів». Продукт транспортують у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури 2—8 °С.

Термін придатності

Дату закінчення терміну придатності вказано на упаковці, термін придатності — 24 місяці від дати виробництва. Зберігати в оригінальній упаковці виробника, в сухому, захищеному від світла та недоступному для дітей місці, при температурі від 0 °С до 25 °С та відносній вологості повітря не більше 60%.

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристику сировини, матеріалів та напівпродуктів наведено у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 - Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1. Музейна культура продуцента <i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> ATCC 15697	ДСТУ 7355:2013	Контроль кількості життєздатних бактерій згідно з ДСТУ 7355:2013	Для отримання посівного матеріалу
1.2. Цукор білий	ДСТУ 4623:2006 Цукор білий. Технічні умови	Всі показники згідно ДСТУ 4623:2006	Для підготовки захисного середовища

Продовження таблиці 4.2

1.3. Молоко сухе знежирене	ДСТУ 4273:2015 Молоко та вершки сухі. Загальні технічні умови ДСТУ ISO 7208:2002 Молоко знежирене, сироватка та маслянка. Гравіметричний метод визначання вмісту жиру (Контрольний метод) (ISO 7208:1999, IDT), ДСТУ 2661-94 Молоко коров'яче питне	Органолептичні та фізико-хімічні показники молока згідно з ДСТУ 4273:2015 Контроль мікробіологічних показників згідно з ДСТУ ISO 7208:2002	Для приготування захисного середовища
1.4. Желатин	ГОСТ 11293-89	Всі показники згідно ГОСТ 11293-89	Для приготування захисного середовища
1.5. Середовище Біфідум			Для посівного та виробничого культивування
1.5.1. Панкреатичний гідролізат казеїну	ДСТУ 6031:2008 Казеїн харчовий. Технічні умови. З поправкою (ТУ 9385-002-00479327-98)	Всі показники згідно з ДСТУ 6031:2008 та ТУ 9385-002-00479327-98	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.2. Екстракт пекарських дріжджів	ДСТУ 4812:2007 Дріжджі хлібопекарські пресовані. Технічні умови (ТУ 9385-18-00479327-2000)	Всі показники згідно з ДСТУ 4812:2007 та ТУ 9385-18-00479327-2000	Для приготування поживного середовища Біфідум

Продовження таблиці 4.2

1.5.3. Глюкоза моногідрат	ДСТУ 4464:2005. Глюкоза кристалічна гідратна (33891) ДФУ 2.0, Т. 2, с. 173	Показники згідно з ДСТУ 4464:2005 або ДФУ	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.4. Лактоза безводна	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 385	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.5. Цистеїн	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 717	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.6. NaCl	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 490	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.7. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 422	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.8. Кислота аскорбінова	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 61	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.9. Натрію ацетат тригідрат	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 470	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування поживного середовища Біфідум
1.5.10. Агар мікробіологіч ний	(ГОСТ 17206-96)	Усі показники згідно з (ГОСТ 17206-96)	Для приготування поживного середовища Біфідум

Продовження таблиці 4.2

1.5.11. Вода очищена «in bulk»	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 129. С. 385-393 СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013	Усі показники згідно з ДФУ Методи застосування згідно з СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013	Для приготування поживного середовища Біфідум та стабілізаційних розчинів, промивки обладнання та тари, приготування води для ін'єкцій та мийних та дезінфікуючих розчинів.
1.6. Розчин аміаку 25%	ДФУ 2.0, Т. 2, с. 28	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування розчину аміаку 10% для коригування рН поживного середовища.
2. Допоміжна сировина			
2.1. МПА з 5% глюкози	ДФУ 2.0, доп. 2.6	Метод приготування та компоненти згідно з ДФУ	Для перевірки мікробіологічної чистоти поживного середовища Біфідум, стабілізаційного середовища та проведення мікробіологічного контролю посівних культур

Продовження таблиці 4.2

2.2. Середовище Сабуро	ДФУ 2.0, доп. 2.6	Метод приготування та компоненти згідно з ДФУ	Для перевірки мікробіологічної чистоти поживного середовища Біфідум, стабілізаційного середовища та проведення мікробіологічног о контролю посівних культур
2.3. Вода питна	ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості	Усі показники згідно з ДСТУ 7525:2014 Методи застосування згідно з СТ-Н МОЗУ 42- 3.7:2013	Для промивки обладнання, приготування мийних та дезинфікуючих розчинів, для приготування води очищеної.
2.4. Азот газоподібний	ДСТУ ГОСТ 9293:2009 Азот газоподібний і рідкий. Технічні умови (ISO 2435- 73)	Усі показники згідно з ДСТУ ГОСТ 9293:2009	Для створення повітряного тиску у виробничому та посівному ферментерах.
2.5. Спирт етилловий 96%	ДФУ 2.0 Т. 2, с. 233 ДСТУ 4221:2003. Спирт етиловий ректифікований. Технічні умови	Усі показники згідно з ДФУ	Для приготування розчину спирту етилового 76% для обробки рук персоналу.
2.6. Розчин дегміну 1%	СТ-Н МОЗУ 42- 4.6:2015	Метод приготування та компоненти згідно з СТ-Н МОЗУ 42- 4.6:2015	Для обробки рук персоналу

2.7. Розчин «Мікробак форте»	СТ-Н МОЗУ 42- 4.6:2015	Метод приготування та компоненти згідно з СТ-Н МОЗУ 42- 4.6:2015	Для приготування дезинфікуючого розчину для приміщень та обладнання
------------------------------------	---------------------------	---	--

Продовження таблиці 4.2

2.8. Розчин H ₂ O ₂ 30%	СТ-Н МОЗУ 42- 4.6:2015, ДФУ 2.0, Т. 2, с. 133	Усі показники згідно з ДФУ Метод приготування та компоненти розчинів згідно з СТ-Н МОЗУ 42- 4.6:2015	Для приготування 6% дезинфікуючого розчину H ₂ O ₂
2.9. Мийний засіб для СІР мийок лужний PROFI СІР 653	ТУ У 20.2- 44376088- 005:2021	Усі показники мають відповідати технічним умовам	Для приготування мийних розчинів та СІР-миття обладнання та комунікацій
2.10. Синтетичний мийний засіб для миття приміщень	Згідно з ТУ виробника та ДСТУ 2207.1-93	Показники та допустимий вміст речовин має відповідати вказаним нормативним документам	Для приготування миючих розчинів та миття приміщень
1. Матеріали			
1.1. Флакон №10	ДФУ 2.0, доп. 2.6, с. 101 ДСТУ EN ISO 8362-4:2019	Усі показники згідно з ДФУ	Первинне пакування
1.2. Пробки гумові	ДФУ 2.0, доп. 2.6, с. 109	Усі показники згідно з ДФУ	Первинне пакування

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Кінець таблиці 4.2

1.3. Ковпачки алюмінієві	ДСТУ EN ISO 8362-6:2019	Усі показники згідно з ДСТУ EN ISO 8362-6:2019	Первинне пакування
1.4. Пачки з картону, паперу або комбінованих матеріалів	ДСТУ 7276:2012	Усі показники згідно з ДСТУ 7276:2012	Вторинне пакування для флаконів
1.5. Плівка полівінілхлоридна	-	-	Вторинне пакування для флаконів
1.6. Етикетка на липкій основі	-	-	Маркування готового продукту

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу до роботи

Навчання кожного працівника має охоплювати наступне:

- конкретні завдання, що стосуються конкретної ролі працівника;
- загальна належна виробнича практика;
- важливість особистої гігієни та її фактори.

Кожен новий співробітник повинен пройти навчання при прийомі на роботу. Цей тренінг слід повторювати, змінювати або розширювати за потреби. Слід враховувати будь-які проблеми з розумінням мови або здатністю читати, а також методи оцінки розуміння працівником отриманого навчання. Якщо виявлено недотримання гігієнічних норм, важливо пройти курси підвищення кваліфікації щодо GMP і особистої гігієни зокрема. Відповідне навчання щодо GMP та особистої гігієни слід додатково пройти для будь-яких працівників, які можуть контактувати з виробничими приміщеннями або діяльністю, наприклад, офісного

персоналу, персоналу з обслуговування та прибирання. Відповідне навчання має бути сплановано та зафіксовано для кожного працівника.

Положення про гігієну харчових продуктів вимагає від харчових підприємств забезпечити нагляд за особами, які займаються обробкою харчових добавок, їх інструктаж та/або навчання з питань гігієни відповідно до їхньої роботи. Підприємства з виробництва харчових добавок несуть відповідальність за визначення детальних заходів, необхідних для їх власної діяльності. Ці заходи повинні гарантувати, що всі потенційні особи, які працюють з харчовими добавками, включаючи керівників і менеджерів, мають знання, необхідні для того, щоб відігравати свою роль у гігієнічному поводженні з продуктом, щоб належним чином захистити здоров'я споживача.

Персонал повинен утримувати в чистоті, наскільки це можливо, всі частини свого тіла, одяг або верхній одяг які можуть контактувати з продуктом;

Персонал з будь-яким відкритим порізом або саднами на будь-якій відкритій частині тіла не повинен працювати з відкритим продуктом, але якщо їм дозволено продовжувати роботу у виробничій зоні, вони повинні закрити рану пластирем. Всі пластирі повинні бути офіційно видані, а їх застосування повинно бути перевірено в кінці виробництва. Втрата будь-якого пластиру під час виробництва необхідно негайно повідомити відповідного керівника та слід дотримуватися процедур контролю забруднення сторонніми предметами;

Персонал не повинен плювати, палити, використовувати нюхальний тютюн або жувальну гумку в будь-якій виробничій зоні, особливо в зонах "відкритого продукту". Їжу та напої не можна проносити або вживати у виробничих приміщеннях;

Персонал повинен уникати чхання або кашлю над сировиною, проміжним продуктом або готовою продукцією продуктом, проміжним продуктом або готовим продуктом;

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Персонал повинен носити достатню кількість чистого, придатного для прання або одноразового спецодягу (включаючи головні убори і, де це доречно, головний убір, що закриває шию та/або снуд для бороди);

Особи, у яких підтверджено, що вони страждають або є носіями певних видів інфекцій (черевний тиф, паратиф, будь-які інші сальмонельозні інфекції, амебна або бацилярна дизентерія або будь-яка стафілококова інфекція, що може включати інфікований зріз), які можуть спричинити отруєння споживача, не повинні допускатися в будь-які виробничі зони, де вони можуть контактувати з сировиною, проміжним продуктом або готовим продуктом; персонал, який страждає від будь-якої такої інфекції, повинен повідомити про це виробника, який повинен негайно повідомити відповідний орган охорони здоров'я [86].

ДР 1.2. Підготовка технологічного одягу.

Згідно з СТ-Н МОЗУ 42-3.4:2020 Лікарські засоби. Настанова з виробництва готових лікарських засобів [70]:

Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації.

Опис необхідного одягу для кожного класу наведено нижче.

- Клас D: волосся і борода (при наявності) мають бути закриті. Слід носити звичайний захисний костюм і відповідне взуття або бахіли. Мають бути вжиті відповідні заходи для запобігання будь-якій контамінації чистої зони ззовні.
- Клас C: волосся, а також борода і вуса (при їх наявності) мають бути закриті. Необхідно носити комбінезон або брючний костюм, що щільно прилягає на зап'ястях і має високий комір, а також відповідне взуття або бахіли. Від них практично не мають відокремлюватися волокна або часточки.
- Клас A/B: головний убір має повністю закривати волосся, а також бороду і вуса (при їх наявності); він має бути вставлений у комір костюма; необхідно на обличчі носити маску для запобігання поширенню крапельок. Слід носити відповідним чином простерилізовані та ненапудрені гумові або пластикові рукавички і простерилізовані або продезінфіковані бахіли. Нижні краї штанів мають бути

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						66
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

вставлені в бахіли, а рукави одягу – у рукавички. Захисний одяг практично не має виділяти волокна або часточки і має затримувати часточки, що відокремлюються від тіла. Повсякденний одяг забороняється вносити в кімнати для переодягання, що ведуть у приміщення класів В і С. Кожен робітник у зоні класу А/В повинен бути забезпечений чистим стерильним (простерилізованим або таким, що пройшов відповідну санітарну обробку) захисним одягом для кожної зміни або принаймні на один день, якщо це виправдано результатами контролю. Рукавички під час роботи потрібно регулярно дезінфікувати. Маски і рукавички необхідно змінювати принаймні кожну зміну.

З метою уникнення контамінації середовищ, апаратів та готового продукту використовують захисний одяг з таких тканин:

Дакрон – синтетичний матеріал, з якого роблять тканину, що є водночас дешевою і довговічною; неткані полотна типу спанбонду та спанбондованого поліоефіну, який добре утримує вологу, не утворює частинок пил або ворсинок; одяг з комбінованих матеріалів. Одяг з бавовни у чистих приміщеннях не використовують через його здатність до пиління [71]. Технологічний одяг перуть у промислових машинках за температури 60°C (іноді потрібно попереднє прання за температури 40°C) з використанням неіонного миючого засобу, що має рН від 6,5 до 7,5. Вода для прання виробничого одягу використовується лише очищена. Після прання речі сушать у сушильних машинах, складають та пакують в індивідуальні пакети або у пакети по декілька комплектів [72]. Якщо одяг потребує стерилізації, його автоклавують за температури 120°C, тиску 0,11 МПа протягом 45 хв.

ДР 1.3 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

Санітарна обробка зон на харчових та фармацевтичних виробництвах є надзвичайно важливою. Її здійснюють за допомогою декількох видів дезінфікуючих засобів, щоб запобігти розвитку стійких штамів. Миючі та дезінфікуючі засоби контролюють мікробіологічно, засоби для використання у

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

зонах класів А та В мають бути стерильними. Для обробки важкодоступних місць приміщення рекомендовано застосовувати фумігацію.

ДР 1.3.1 Підготовка миючих розчинів

Готують миючий засіб згідно з інструкцією виробника. Миючі засоби мають бути схвалені для використання у харчовій або фармацевтичній промисловості. Прикладом такого засобу може бути Миючий засіб для СІР мийок лужний PROFI СІР 653, який готують розведенням 50-1000 мл концентрату миючого засобу у 10 л води. Кінцева концентрація засобу має становити 0,5-10%. [73]

ДР 1.3.2 Підготовка дезінфікуючих розчинів

ДР 1.3.2.1. Приготування розчину H_2O_2 6% з миючим засобом

Для виготовлення розчину використовують воду питну, пергідроль (розчин H_2O_2 з вмістом пероксиду 30-35%) та мийний засіб безфосфатний. Вміст H_2O_2 у кінцевому розчині становить 6%, миючого засобу 0,5%. На 10 літрів розчину беруть 2400 мл пергідролу (30%), 50 г мийного засобу та 7550 мл води питної. Розчином обробляють обладнання, комунікації, інвентар та виробничі поверхні у приміщенні. На тару наклеюють етикетку, на якій зазначають: найменування, дату виготовлення, заходи безпеки, прізвище посадової особи, відповідальної за виготовлення розчину [74].

ДР 1.3.2.2. Приготування розчину етанолу 76%

Розчин етанолу 76% використовують для дезінфекції обладнання та антисептичної обробки рук персоналу. Для виготовлення 1 кг етанолу 76% змішують 0,735 кг етанолу 96% і 0,264 кг води очищеної. Густина отриманого розчину становить 870,2 кг/м³. На ємність з дезінфекційним розчином наклеюють етикетку з зазначенням найменування розчину, дати виготовлення, попередження про небезпеку застосування, прізвища відповідальної особи [74].

ДР 1.3.2.3. Приготування розчину дегміну 1%

Використовується для антисептичної обробки рук персоналу. Метод виготовлення: У скляний балон з притертою пробкою наливають 1 л води очищеної та додають 100 мл дегміну. Перемішують. Після повного розчинення

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

дегміну доливають 9 л води очищеної при одночасному перемішуванні. Готовий розчин фільтрують через мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. На тару наклеюють етикетку з зазначенням найменування дезінфекційного розчину, дати виготовлення, попередження про небезпеку застосування, прізвища відповідальної особи. Термін придатності робочого розчину — 1 міс. Руки необхідно обробляти протягом 2-3 хв шляхом втирання [74].

ДР 1.3.2.4. Приготування розчину «Мікробак форте»

Розчин містить бензалконію хлорид та додецилвіспропілентрисамін. Виготовляють розчин шляхом розведення концентрату холодною проточною водою. 0,25% розчин — 20 мл концентрату на 8 л води. 0,50% розчин — 40 мл концентрату на 8 л води. Використовують для дезінфекції та миття будь-яких поверхонь в одній процедурі. Дворазове протирання тканиною, змоченою робочим розчином: 0,25% розчин — експозиція 4 год; 0,50% розчин — експозиція 1 год. Для виготовлення дезінфекційного розчину одягають гумові рукавички і готують 0,25-3,0% розчин у тарі з будь-яких матеріалів шляхом розчинення у воді при періодичному перемішуванні концентрату. Розчин використовують для дезінфекції одноразово. Термін придатності розчину — 30 днів, концентрату — 3 роки. На тару з виготовленим розчином наклеюють етикетку, на якій зазначають найменування, дату виготовлення, заходи безпеки, прізвище посадової особи [74].

ДР 1.4 Підготовка виробничих приміщень

Навколишнє середовище приміщень, з огляду на всі заходи для захисту виробництва, має становити мінімальний ризик у плані контамінації матеріалів або продукції. Приміщення слід бережно експлуатувати й обслуговувати, гарантуючи, що ремонт і експлуатація не будуть становити ніякої небезпеки для якості продукції. Приміщення слід прибирати і дезінфікувати відповідно до докладних письмових методик. Освітлення, температура, вологість і вентиляція мають бути відповідними і не мають чинити несприятливого впливу (прямого або непрямого) ні на лікарські засоби під час їхнього виробництва і зберігання, ні на точність функціонування обладнання. Приміщення мають бути спроектовані й

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

оснащені таким чином, щоб забезпечувати максимальний захист від проникнення в них комах або тварин. Необхідно вжити заходи, що запобігають входу у приміщення сторонніх осіб. Зони виробництва, зберігання і контролю якості не слід використовувати як прохідні для персоналу, який у них не працює.

ДР 1.4.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання асептичного блоку проводять не рідше одного разу на зміну (орієнтовно 3 рази на день при безперервній роботі підприємства 24/7/365). Обладнання, яке можна легко демонтувати та встановити, а також матеріали виносять. Прибирання проводять у такому порядку: миють стіни та двері від стелі до підлоги, потім проводять миття та дезинфекцію стаціонарного обладнання, і наостанок прибирають підлогу. Витрата розчину для дезинфекції становить 200 мл на 1 м². Завершують прибирання ультрафіолетовим опроміненням приміщення.

Обробку приміщень класів В та С проводять 3% розчином Н₂О₂ розведеним із миючим засобом. При систематичному використанні розчину і досягненні стабільного стану необхідного класу чистоти можна зменшити кількість пероксиду водню до 1%. У разі виявлення в повітрі приміщення грибів масову частку пероксиду водню в робочому розчині необхідно збільшити до 4%, а за наявності спороутворювальної мікрофлори — до 6%. Обробку виробничих приміщень D класу чистоти проводять розчином пероксиду водню (масова частка— 1%) з мийним засобом. Стіни, двері, вікна та інші поверхні протирають поролоновою мочалкою чи серветкою, добре змоченими робочими розчинами з розрахунку 100-150 мл/м², а потім цим же розчином миють підлогу [74].

ДР 1.4.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання асептичного блоку проводять не рідше 1 разу на тиждень. Генеральне прибирання виробничих приміщень В і С класів чистоти проводять розчином пероксиду водню (масова частка — 6%) з мийним засобом (відмінним від того, що використовується для СІР-миття обладнання). Якщо протягом місяця в повітрі приміщення не виявлено спороутворювальної мікрофлори і грибів, то

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

масову частку пероксиду водню в робочому розчині слід зменшити до 3% . Усі поверхні у приміщенні зрошують з гідропульта. Витрата розчину 150-200 мл/м². Витримують розчин протягом 30-40 хв у закритому приміщенні, після чого видаляють його за допомогою ганчірок та серветок, що не лишають ворсу. Приміщення класу D прибирають за такою ж методикою, що описана для щоденного прибирання приміщень класу В та С у ДР. Контролюють чистоту приміщень проводячи мікробіологічний контроль різних видів. Відбирають пробу повітря, проводять експозицію чашок з поживними середовищами та роблять проби змивів. Методи відбору та перевірки не мають порушувати чистоту приміщення [74].

ДР 1.5 Підготовка обладнання та інвентарю.

Підготовку обладнання проводять у захисному одязі та засобах індивідуального захисту органів дихання та зору. Використовують одноразові серветки та губки, які дезінфікують перед та знешкоджують після очистки. Перед миттям обладнання його обов'язково знеструмлюють [74].

ДР 1.5.1. Мийка обладнання

Проводять миття нерозбірного або громіздкого обладнання та комунікацій за допомогою технології СІР-миття з розчином миючого засобу для СІР-миття за температури 20-80°C протягом 5-40 хв. Після миття засобом його змивають водою очищеною. Знімні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо стикаються з продуктами чи напівпродуктами, слід зняти, розібрати і ретельно вимити або вимочити в розчині мийного засобу (масова частка — 0,5%) при температурі 20-80 °C протягом 10—60 хв, а потім кілька разів сполоснути водою очищеною. Води від промивки уважно візуально оцінюють на наявність механічних включень [74].

ДР 1.5.2. Перевірка на герметичність

Обладнання перевіряють на герметичність шляхом створення в апаратах тиску 0,2 МПа протягом 30 хв. Контроль процесу проводять за допомогою манометрів. Сталі показники манометрів свідчать про герметичність обладнання.

ДР 1.5.3. Стерилізація обладнання

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						71
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Апаратуру та комунікації промивають водою $t=100^{\circ}\text{C}$. Після цього запускають у обладнання та комунікації гостру пару тиску 0,2-0,3 МПа при температурі 140°C протягом 20-40 хв. Умови стерилізації можуть бути різними для певних апаратів, якщо так вкаже виробник. Вузли технологічного обладнання, встановлені у В і С класах чистоти загортають у два шари пергаментного паперу і стерилізують в автоклаві при надлишковому тиску 0,11 МПа ($1,1 \text{ кгс/см}^2$) і температурі 120°C протягом 45 хв з подальшим підсушуванням при залишковому тиску 0,07 МПа ($0,7 \text{ кгс/см}^2$) не менше 10 хв. Наостанок продувають стерильним повітрям під тиском [74].

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря

Підготовку повітря для чистих приміщень проводять згідно з рекомендаціями, наведеними у СТ-Н МОЗУ 42-4.6:2015 [74].

Повітря, циркулює у приміщеннях не має містити сторонніх мікроорганізмів, спор, пилу або інших контамінантів, які можуть перешкодити процесу культивування. Щоб забезпечити чистоту повітря, його очищують у декілька етапів з використанням фільтрів різного класу.

ДР 2.1. Забір повітря

Забір повітря здійснюється за допомогою конструкції з труб з висоти не менше 10 м. Повітря у місці забору повітря має бути незапиленим та незагазованим. Забір здійснюється повітрозабірником.

ДР 2.2. Первинна очистка повітря

Первинну очистку повітря від механічних часток здійснюють за допомогою фільтрів класу G4. Їх установлюють перед вентилятором, щоб попередити її забруднення часточками пилу. Фільтри призначені для фільтрування часточок розміром 5-10 мкм. Ефективність фільтрації для таких часточок – 85-98%. Контроль ефективності роботи фільтру встановлюють за допомогою двох манометрів, що розташовані на вході та на виході з фільтра.

ДР 2.3. Регуляція температури повітря

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Повітря нагнітається вентилятором та проходить крізь нагрівальну колонку, у яку подається насичена водяна пара 0,2 МПа. Повітря нагрівається/охолоджується до 20°C.

ДР 2.4. Очищення повітря на фільтрі тонкого очищення

Повітря проходить через фільтр класу F7 тонкої очистки. Ефективність очистки 85-95%, призначені для фільтрації часточок до 1 мкм. Перед та після фільтру встановлені манометри для виявлення перепадів тиску.

ДР 2.5. Очищення повітря на фільтрі ультратонкого очищення

Повітря проходить через фільтр ультра тонкого очищення класу H-12 (HEPA). Ефективність очистки <95% для часточок до 0,3 мкм. Перед та після фільтру встановлені манометри для виявлення перепадів тиску. Стерильне повітря, що є результатом цієї операції, подається на ДР 4, та ТП11, а також ДР 1 [74], [75], [76].

ДР 3. Підготовка води

ДР 3.1. Забір води

Використовують воду питну з мережі централізованого водопостачання або будь-яку іншу воду, що відповідає вимогам ДСТУ 7525:2014 «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості».

ДР 3.2. Фільтрування води

Воду пропускають через сітчастий фільтр з рівнем фільтрації 100 мкм для очищення від механічних домішок типу іржі, кристалів солей та сторонніх часточок.

ДР 3.3. Пом'якшення води

Пом'якшення води здійснюють за допомогою йонного обміну. Вода проходить через катіонітовий фільтр, який зв'язує всі йони кальцію та магнію, обмінюючи їх на йони натрію та водню.

ДР 3.4. Знесолювання води

Знесолювання води проводять методом зворотнього осмосу. Тиск води створюється за допомогою насосу, і вода проходить через фільтр з напівпроникної

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

мембрани, при цьому солі залишаються з іншого боку, бо вони не можуть дифундувати через мембрану. Вода знесолена подається на ДР 3.5 для отримання води очищеної, оскільки солі звичайної питної води з часом осядуть у дистиляторі та заважатимуть процесові дистиляції.

ДР 3.5. Отримання води очищеної

Відбувається шляхом дистиляції. Для найвищої ефективності використовується чотириступеневий колонний апарат для дистиляції. Кожна колона складається з випарника та нагрівника. У нагрівник першої колони подається насичена водяна пара (технічна), а у випарник всіх 4 колон – вода знесолена від ДР 3.4. Вода випаровується, і надходить у нагрівник другої колони, де нагріває воду, після чого конденсується і стікає у збірник води очищеної. Вторинна пара з другої колони надходить у третю і процес повторюється. Таким чином, технічна насичена водяна пара нагріває лише одну з колон, а воду очищену отримують з другої, третьої та четвертої колон. Продуктивність подібної установки може варіюватися в залежності від тиску пари, що подають в першу колону, діаметру колон тощо.

ДР 4. Підготовка пакувальної тари

Пакувальна тара складається з флаконів №10, що закриваються гумовими пробками та додатково герметизуються ковпачками з алюмінію.

ДР 4.1. Підготовка стерильних флаконів

ДР 4.1.1. Мийка флаконів

Отриману нестерильну тару оглядають на предмет пошкоджень, і, за їх відсутності, флакони відправляються на мийку. Зовні флакони миють методом душування у обладнанні для миття, внутрішню поверхню обробляють вакуумним способом. Миття відбувається водою очищеною за температури 70°C, у мийці вакуумного типу за тиску 0,1 МПа .

ДР 4.1.2. Стерилізація флаконів

Промиті флакони завантажують на лінію для пакування, що включає в себе блок стерилізації флаконів. Флакони стерилізують гарячим повітрям за температури 165 - 170°C протягом 2 годин [77], [78].

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						74
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 4.1.3. Охолодження флаконів

Простерилізовані флакони поступово охолоджуються протягом 1 год до температури 20-25°C. Далі вже простерилізовані флакони надходять на ТП 10. Цілісність флаконів перевіряють у автоматичному режимі за допомогою датчиків. Також вибірково проводять контроль мікробіологічний на стерильність та технічний, на наявність пошкоджень після процесу стерилізації.

ДР 4.2. Підготовка стерильних пробок

ДР 4.2.1. Візуальна інспекція пробок

Отриману нестерильні пакети з пробками оглядають на предмет пошкоджень, і, за їх відсутності, пакети зовні обробляють антисептиком. Пробки розфасовують у пакети для стерилізації по 50-100 шт, контроль проводять за допомогою індикатора ІС-120.

ДР 4.2.2. Стерилізація пробок

Пробки стерилізують у паровому стерилізаторі за температури $120 \pm 2^\circ\text{C}$ за тиску 0,1 МПа протягом 45 ± 3 хв насиченою водяною парою за надлишкового тиску.

ДР 4.2.3. Сушка пробок

Сушка пробок проводиться гарячим повітрям при температурі не вище $90 \pm 5^\circ\text{C}$ протягом не менше 2 год і не більше 3 год.

ДР 4.2.4. Охолодження пробок

Пробки, що були простерилізовані у паровому стерилізаторі, охолоджуються у пристрої для охолодження протягом 30 хв. Також перевіряють вміст води у пробках, він має зменшитися не більше ніж на 0,2%. Проводять автоматичний контроль цілісності пробок, та вибірковий мікробіологічний та технічний контролю. Пакети з пробками маркують і подають на ТП 10 для передзакупорення флаконів.

ДР 4.3. Підготовка стерильних ковпачків

Ковпачки на виробництво надходять вже стерильними. Проводять мікробіологічний та технічний контроль та відправляють ковпачки на стадію пакування.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 5. Приготування робочих розчинів та стабілізаційного середовища

ДР 5.1. Приготування розчину аміаку 10%

Для приготування розчину використовують аміак з вмістом NH_4OH 25%. У реактор додають воду очищену та гідроксид амонію. Перемішують, стерилізують глухою парою 0,2 МПа за температури 125°C. При нагріванні гідроксид аміаку розпадається на воду та аміак.

ДР 5.2. Приготування сахарозо-молочного середовища [13]

ДР 5.2.1. Стерилізація молока

Молоко фільтрують, вносять у реактор через об'ємний дозатор, коригують рН до 7,4-7,6 за допомогою розчину аміаку 10%. У сорочку реактора подають глуху пару 0,2 МПа і стерилізують молоко протягом 45 хв за температури 121°C, перемішуючи. Потім подають холодну воду 15°C та охолоджують молоко до 35-40°C.

ДР 5.2.2. Додавання цукру та стерилізація

У реактор до молока додають цукор білий до концентрації сахарози у розчині 30-32%, повторюють стерилізацію за описаних вище умов. Проводять мікробіологічний контроль висіюванням проб на МПА та середовище Сабуро. Готове сахарозо-молочне середовище подають на ТП 9.

ДР 5.3 Приготування розчину желатози [13]

У реактор подають воду очищену та сухий желатин у співвідношенні 1 дм^3 на 100 г. Перемішують розчин мішалкою протягом 10 хв, вимикають мішалку та чекають 3 год доки гранули желатину повністю набухнуть. Після цього нагрівають розчин до температури 50-60°C глухою парою 0,2 МПа і чекають на розчинення желатину. Стерилізують протягом 45 хв за температури 121°C, перемішуючи. Готовий розчин желатози подають на ТП 9.

ДР 6. Приготування поживних середовищ

Для виробничого культивування *Bifidobacterium longum* запропоновано використання середовища Біфідум [13], склад якого представлений у таблиці 4.3.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 4.3 - Склад середовища Біфідум на 1 дм³ [13]

Складник	Кількість	Одиниця вимірювання кількості
Аміновмісні компоненти		
Цистеїн	0,5	г
Екстракт пекарських дріжджів	5,0	г
Панкреатичний гідролізат казеїну	30,0	г
Цукровмісні компоненти		
Агар мікробіологічний	0,75	г
Глюкоза	7,5	г
Лактоза	2,5	г
Солі та термостабільні компоненти		
NaCl	2,5	г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	г
Кислота аскорбінова	0,5	г
CH ₃ COONa	0,3	г
Інші		
Вода	До 1,0	дм ³

ДР 6.1. Приготування розчину солей**ДР 6.1.1. Дозування та розчинення солей**

У реактор подають воду очищену і нагрівають її, пропускаючи пару насичену 0,2 МПа через сорочку реактора до 60°C. Через об'ємно-ваговий дозатор у нагріту воду в реактор вносять солі, що перераховані у таблиці, та лимонну кислоту, у необхідній кількості. Перемішують мішалкою до повного розчинення компонентів.

ДР 6.1.2. Стерилізація розчину солей

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розчин солей стерилізують у реакторі за допомогою подачі насиченої водяної пари 0,2 МПа у сорочку реактора. Нагрівають до температури 140°C. Стерилізують протягом 1 години. Потім охолоджують до 50°C.

ДР 6.2. Приготування термолабільних компонентів поживного середовища

ДР 6.2.1. Дозування та розчинення аміновмісних компонентів

До реактора подають воду очищену і у сорочку реактора подається насичена водяна пара 0,2 МПа, яка нагріває розчин до температури 50-60°C. Через дозатор об'ємно-ваговий додають аміновмісні компоненти, що наведені у таблиці у потрібній кількості. Перемішування мішалкою відбувається до повного розчинення всіх компонентів. Після цього розчин проходить через фільтр для того, щоб забезпечити очищення від можливих грудочок та нерозчинених речовин.

ДР 6.2.2. Стерилізація розчину аміновмісних компонентів

Розчин аміновмісних компонентів надходить в установку безперервної стерилізації. Він нагнітається насосом у колонку швидкісного нагріву, де прогрівається насиченою водяною парою 0,2 МПа до 125°C протягом 5 хв.

Після стерилізації розчин надходить у витримувач.

ДР 6.2.3. Витримка поживного середовища

Розчин витримують у витримувачі протягом 15-20 хв за температури 120-125°C.

Після цього він надходить у теплообмінник-рекуператор пластинчатого типу.

ДР 6.2.4. Охолодження поживного середовища

У теплообмінник пластинчатого типу середовище надходить для охолодження.

Температуру середовища доводять до 50-60°C. Після охолодження розчин подається у реактор з готовим розчином солей для змішування та гомогенізації.

ДР 6.3. Приготування розчину цукровмісних компонентів

ДР 6.3.1. Дозування та розчинення цукровмісних компонентів

До реактора подають воду очищену і у сорочку реактора подається насичена водяна пара 0,2 МПа, яка нагріває розчин до температури 50-60°C. Через дозатор об'ємно-ваговий додають цукровмісні компоненти, що наведені у таблиці у

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

потрібній кількості. Перемішування мішалкою відбувається до повного розчинення всіх компонентів. Після цього розчин проходить через фільтр для того, щоб забезпечити очищення від можливих грудочок та нерозчинених речовин.

ДР 6.3.2. Стерилізація розчину цукровмісних компонентів

Розчин цукровмісних компонентів надходить в установку безперервної стерилізації. Він нагнітається насосом у колонку швидкісного нагріву, де прогрівається насиченою водяною парою 0,2 МПа до 125°C протягом 5 хв.

Після стерилізації розчин надходить у витримувач.

ДР 6.3.3. Витримка поживного середовища

Розчин витримують у витримувачі протягом 15-20 хв за температури 120-125°C. Після цього він надходить у теплообмінник-рекуператор пластинчатого типу.

ДР 6.3.4. Охолодження поживного середовища

У теплообмінник пластинчатого типу середовище надходить для охолодження. Температуру середовища доводять до 50-60°C. Після охолодження розчин подається у реактор з готовим розчином солей для змішування та гомогенізації.

ДР 7. Отримання інокуляту біфідобактерій

ДР 7.1 Отримання культури I генерації

Використовуються ампули чи флакони з ліофілізованою робочою культурою *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 з вмістом клітин 10^8 - 10^9 КУО/см³. У ампулу вносять теплий (30°C) фізіологічний розчин NaCl у кількості 1 см³ на 1 ампулу, перемішують. Розчин з культурою вносять у колби з поживним середовищем Біфідум. Вирощування культури проводять у термостаті за температури $38 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 70-72 годин. Після вирощування проводять мікробіологічний контроль. Його проводять трьома методами: мікроскопіювання, висівом на середовище Сабуро та висівом на середовище МПА з 5% глюкози. Витримують посіви у термостаті за температури $22 \pm 1^\circ\text{C}$ та $38 \pm 1^\circ\text{C}$ відповідно, протягом 72 годин. У разі відсутності росту сторонньої мікрофлори культуру I генерації відправляють на ДР 7.2 [13].

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 7.2 Отримання культури II генерації

Культуру I генерації висівають у посівний ферментер із середовищем Біфідум об'ємом у 10 разів більше, ніж для початкового вирощування культури I. Проводять культивування за температури $38 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 70-72 годин. Після цього проводять мікробіологічний контроль так, як описано у ДР 7.1, а також визначають кількість живих клітин за методом Коха на рідкому середовищі Біфідум. Планована кількість клітин має становити не менше 10^9 КУО/см³ [13].

ТП 8. Виробниче культивування

Культуру II генерації вносять у ферментер зі стерильним середовищем Біфідум. Кількість посівного матеріалу становить 20% від об'єму середовища. У ферментер, який засіяно культурою додають стерильний піногасник – рослинне масло. Вміст ферментера перемішують, культивування проводять протягом 16-17 годин при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$ при надлишковому тиску 0,03-0,04 МПа. Тиск створюється за допомогою насиченого азотом повітря або стисненого азоту, що на підприємство надходить у балонах. Допускається вміст CO₂ 1%, оскільки у середовищі з виключно азотом колонієутворююча здатність продуцента дуже низька. Повітря подається у ферментер після заповнення його поживним середовищем для створення всередині надлишкового тиску та витиснення повітря, насиченого киснем, з ферментера. Перемішувальний пристрій (70 об/хв) вмикають перед відбором проб на рН та після подачі 10% розчину аміаку на 5-10 хвилин. Після 16-17 год культивування проводять першу перевірку рН. Зазвичай на цьому етапі рН становить 3,7-4,5, що сповільнює активність накопичення біомаси. Для пришвидшення росту біомаси рН доводять до значення $6,7 \pm 0,2$ 10% розчином аміаку. Коли рН досягне оптимального для *B. longum* значення, культивування продовжують ще протягом 48-72 год з періодичними перевірками та коригуванням рН до оптимума (3-4 рази на добу). Культивують допоки вміст бактерій у культуральній рідині не досягне принаймні $1 \cdot 10^9$ КУО/см³. Також індикатором буде стабілізація рН на рівні $6,7 \pm 0,5$, на закінчення росту біфідобактерій та виснаження поживних речовин середовища [11], [13].

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 9. Стабілізація культуральної рідини

До культуральної рідини, одержаної у процесі виробничого біосинтезу, додають захисне сахарозо-молочне середовище та гідролізований розчин желатину у сумарній кількості 15% від загальної кількості культуральної рідини. Вони призначені для збереження цілісності клітин бактерій у процесі ліофільного замороження, і діють як кріо- та ліпопротектори. Їх дія полягає у тому, що вони здатні пригнічувати швидкість появи льодяних кристалів та збільшувати в'язкість розчину, а також стабілізувати ліпідний бішар мембран бактерій за відсутності води. рН корегують 10% розчином аміаку до показників $6,7 \pm 0,5$. Здійснюють мікробіологічний контроль так, як було описано у ДР 7.1. Визначають кислотоутворення, кількість живих бактерій та проводять мікроскопіювання забарвленого за Грамом зразка [11].

ТП 10. Розлив у флакони

Стабілізоване середовище з ТП 9 подають на лінію, що включає в себе блок стерилізації флаконів та розлив середовища у флакони, блок ліофільного сушіння, блок закупорювання та контролю якості флаконів. Апарат, що наповнює флакони стабілізованим середовищем, працює за принципом шприца або помпи. Механізм наповнення може використовувати поршневі або сильфонні насоси, що закачують потрібний об'єм рідини та дозують його у флакони, або ж мікродозуючі насоси з витратомірами, що визначають кількість рідини, яку закачали у флакон, після чого наповнення припиняється. Одразу після розливу флакон передзакупорюють – конструкція гумових пробок дозволяє частково закрити флакон, при цьому залишаючи отвір, через який волога виходитиме з флакона. Апарат автоматично визначає, чи наповнений флакон, чи є пробка на флаконі. Передзакупорені флакони рядами завантажуються на піддони у сублимаційну сушарку на ТП 11. Обсяг повного завантаження сушарки залежить від виробника та моделі сушарки. Після повного завантаження сублимаційна сушарка закривається і починає трьохстадійний процес сушіння [78].

ТП 11. Отримання ліофільно висушеної біомаси

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						81
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 11.1 Заморожування

Заморожування проводиться протягом тривалого часу з повільним зниженням температури. Повільне заморожування до -60°C упродовж 18-24 годин попереджає формування кристалів льоду у клітинах продуцента, що призведуть до зниження вмісту життєздатних клітин у добавці. На цьому етапі контролюють температуру полицок з піддонами, флаконів та температуру конденсатора [11], [79].

ТП 11.2 Сублімація у вакуумі

Після досягнення температури -60°C та повного замерзання рідини у ампулах тиск у сублімаційній сушарці повільно опускають до 26,6 Па. Тиск контролюють за допомогою вакуумметра Пірані [79]. Щойно він досягне регламентованого значення, починають підвищувати температуру на $1-2^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до 0°C . Нагрівні елементи розміщені під полицями з флаконами. На даній стадії контролюють тиск у сушарці, температуру полицок, флаконів та конденсатора. На цій стадії вміст води у добавці становитиме близько 5-10% [11], [13].

ТП 11.3 Досушування та витримування

Після досягнення температури 0°C підігрівання інтенсифікують до $2-3^{\circ}\text{C}/\text{год}$ і температуру у сушарці доводять до $32-34^{\circ}\text{C}$. Коли температура встановлюється на такому показникові, її підвищення припиняють. Натомість флакони з ліофілізованим порошком витримують ще 6 годин за заданої температури. Важливо досягти вмісту води 2-3%, надмірне видалення води з бактеріальних клітин суттєво знизить їх життєздатність [11], [13]. На даній стадії контролюють тиск у сушарці, температуру полицок, флаконів та конденсатора.

ТП 11.4 Герметизація гумовими пробками

Після витримки у сублімаційну сушарку починають поступово запускати азот для відновлення атмосферного тиску. Після того, як тиск зовнішнього середовища та тиск у сушарці врівноважаться, спеціальний механізм притискає всі пробки до упора, закриваючи отвір, що дозволяв волозі виходити з флакона. Флакони з сушарки відправляють на лінію закупорювання ТП 12.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 12. Закупорювання флаконів

Лінія автоматично закупорює флакони, накриваючи горлечка алюмінієвими ковпачками та вальцюючи їх. Закупорені флакони надходять на ПМВ 14. Проводиться автоматичний контроль заповнення та цілісності флакона, наявності ковпачка та пробки. Відбраковані флакони надходять на ЗВ 15. Частину флаконів випадковим чином направляють у лабораторію для проведення контролю якості.

ПМВ 13. Етикетування, маркування та пакування флаконів

Лінія пакування та маркування наклеює на флакони етикетки з необхідною інформацією та відбиває номер партії та серію продукта. Етикетки надходять на підприємство вже надруковані, їх контролюють на відповідність вимогам та якістю друку. Флакони з етикетками проходять автоматичний контроль на вагу, наявність етикетки, ковпачка та пробки і упаковуються у коробки з картону по 10 штук. Коробки з картону пакують у транспортну тару – коробки з гофрованого картону, які перевіряють і відправляють на реалізацію товару.

ПВ 14. Переробка відходів

На цю стадію подають відходи, що можуть бути перероблені та використані у виробничому процесі. Воду з усіх операцій, що включають автоклавування, стерилізацію парою, нагрівання та охолодження пропускають через пісочні та або/катіонітові фільтри і направляють на повторне використання у якості холодного та гарячого теплоносіїв. Пару після стерилізації сконденсовують і поведуться з нею так само, як і з водою. Воду, що не підлягає/не потребує переробки, але не є біологічним відходом, зливають у мережу міської каналізації. Повітря зі стадій та приміщень проходить через систему фільтрів, що включає фільтри класу G7, рукавні/тканинні фільтри. Виробничий одяг, що підлягає пранню відправляють на стадію підготовки виробничого одягу. Фільтри для повітря промивають по мірі їх забруднення та регламентовано – двічі на рік з використанням миючих та дезинфікуючих засобів, за можливості – автоклавують. Фільтр з ДР 3.2 очищують, катіонітові фільтри з ДР 3.3 регенерують, пропускаючи через них розчини кислот або вивареної солі NaCl.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						83
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ЗВ 15. Знешкодження відходів, що не підлягають переробці

Миючі розчини, стоки та воду, що не підлягає повторному використанню, але не є біологічним відходом, зливають у міську каналізацію. Флакони, пробки, етикетки, ковпачки, що не пройшли контроль якості на певному етапі виробництва в залежності від цього етапу а) повертають виробникові б) утилізують як звичайні тверді відходи в) стерилізують будь-яким підходящим способом, після чого утилізують як звичайні тверді відходи. Ампули від музейної культури стерилізують та знешкоджують як ТПВ. Залишки поживних середовищ, культуральної рідини, середовищ з чашок Петрі та пробірок знешкоджують, стерилізуючи їх гострою або глухою парою у автоклавах. Можуть використовувати методи стерилізації гарячим повітрям. Усі матеріали, що не були в безпосередньому контакті з біологічним матеріалом, знешкоджують як ТПВ.

4.4 Матеріальний баланс

За один цикл виробничого процесу за умови втрат, що не перевищують 3-5%, можна отримати 1235 літрів культуральної рідини, що еквівалентно 532000 флаконам №10 з ліофілізованим порошком *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697, що містять не менше, ніж $1 \cdot 10^9$ КУО/см³ кожен (з урахуванням втрат).

Таблиця 4.4 – Матеріальний баланс виробничої серії

Використано					Отримано			
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л		кг	шт	л
ТП 8. Виробниче культивування	Поживне середовище Біфідум			1032	Культуральна рідина			1235
	Посівний матеріал			258				
	Розчин аміаку 10%			10	Втрати			65
Всього:	1300				Всього:	1300		

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ				Арк.
									84
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					

Продовження таблиці 4.4

ТП 9. Стабілізація культуральної рідини	Культуральна рідина			1235	Стабілізоване середовище			1389,62 2
	Захисне середовище			185,25				
	Розчин аміаку 10%			12,35	Втрати			42,978
Всього:	1432,6				Всього:	1432,6		
ТП 10. Розлив у флакони	Стабілізована культуральна рідина			1389,6	Флакони з напівпродукто м		270914	
	Флакони		138962					
	Пробки		138962		Втрати		00	
Всього:	279313,622				Всього	279313,622		
ТП 11. Отримання ліофільно висушеної біомаси	Флакони з напівпродукт ом		270914		Флакони з ліофільно висушеним порошком		262787	
					Втрати		8127	
Всього:			270914		Всього:			270914
ТП 12. Закупорюванн я флаконів	Флакони з ліофільно висушеним порошком		262787		Закупорені флакони з дієтичною добавкою		523394	
	Ковпачки алюмінієві		262787		Втрати		2180	
Всього:	525574				Всього:	525574		

Продовження таблиці 4.4

ПМВ 13. Етикетування, маркування та пакування флаконів	Закупорені флакони з дієтичною добавкою		523394		Транспортне пакування		523	
	Етикетки		523394				104658 8	
	Коробки з паперу або картону		52339				52139	
	Коробки з гофрованого картону		523				52329	
	Інструкції		52339		Втрати		410	
Всього:	1151990				Всього:	1151990		

4.5 Контроль виробництва

Таблиця 4.5 - Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольно ї точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичніс ть перевірки	Нормативна характеристи ка показника
ДР 1.1 Підготовка персоналу до роботи Кт 1.1.1	Якість підготовки персоналу до роботи та ведення журналу техніки безпеки	Ведення записів у журнал інструктажу з техніки безпеки	Кожен місяць	Має відповідати вимогам

Продовження таблиці 4.5

ДР 1.2 Підготовка технологічного одягу Кт 1.2.1 Кмб 1.2.2	Мікробіологічна та фізична чистота одягу, температура у пральній машині	Культивування мазків з одягу, Хімічні індикатори якості стерилізації	Кожну операцію	Індикатор має підтверджувати якість стерилізації, на чашках з культурами мазків не має бути росту
ДР 1.3 Підготовка миючих та дезинфікуючих розчинів Кмб 1.3	Концентрація діючої речовини у кожному засобі	Ваги, мірний посуд, спиртометр	Кожну операцію	Миючий засіб 0,5-10% H ₂ O ₂ 6% Етанолу 76% Дегмін 1%
ДР 1.4 Підготовка виробничих приміщень Кмб 1.4	Мікробіологічна та фізична чистота приміщень	Змиви з поверхонь, чашки Петрі, що ставлять для експозиції	Кожного дня	На чашках зі змивами не має бути росту мікрофлори
ДР 1.5 Підготовка обладнання та інвентарю. Кт 1.5.1 Кмб 1.5.1	Мікробіологічна та фізична чистота обладнання	Змиви з обладнання	Кожен цикл використання	На чашках зі змивами не має бути росту мікрофлори
ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря Кт 2.1 Кмб 2.2	Тиск повітря, температура повітря, мікробіологічна чистота повітря, розмір часток	Вимірювач температури (термометр, тремопари), лічильники часток, чашки Петрі з МПА та середовищем Сабуро	Заміри мікробіологічної чистоти проводять раз на день, тиску – постійно у автоматичному режимі. Незалежні лічильники часток працюють у автоматичному режимі.	Температура повітря 21-23°C, вміст часточок на 1м ³ <0,1 мкм = 10,000 <0,2 мкм = 2,370 <0,3 мкм = 1,020 Вміст КУО/м ³ менше 1

			Тиск та температура вимірюються у автоматичному режимі	
ДР 3. Підготовка води Кт 3.1 Кх 3.2 Кмб 3.3	Хімічна, мікробіологічна та фізична чистота води, відповідність води стандартам ДФУ 2.0 на «Воду очищену»	Реактиви та лабораторний посуд, поживні середовища для визначення вмісту мікроорганізмів, рН метр, датчики для вимірювання фізико-хімічного складу води	У автоматичному режимі постійно, випробування на чистоту – раз на квартал, випробування на вміст мікроорганізмів – кожного місяця.	Сухий залишок < 0,001 рН 5,0-7,0 <100 за відсутності бактерій родини <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Бактеріальні ендотоксини. Менше 0,25 МО/мл Вміст загального органічного вуглецю: не більше 0,5 мг/л Нітрати не більше 0.00002 % Важкі метали не більше 0,00001 %

Продовження таблиці 4.5

ДР 4. Підготовка пакувально ї тари Кт 4.1 Кмб 4.2	Тиск, температура, Якість стерилізації, цілісність тари	Термопари, манометри, візуальне визначення, індикатор якості стерилізації	Кожну операцію, тиск та температуру у автоматично му режимі	Температура 165-170°C, для автоклаву 120±2°C, тиск 0,1 МПа
ДР 5.1. Приготуван ня розчину аміаку 10% Кх 5.1.1 Кмб 5.1.2	Концентрація аміаку, мікробіологіч на чистота	Фолоелектроколор иметр, чашки Петрі з середовищами МПА та Сабуро	Кожну операцію	С _{аміаку} = 10% Стороння мікрофлора відсутня
ДР 5.2. Приготуван ня сахарозо- молочного середовища Кмб 5.2.1 Кх 5.2.2 Кт 5.2.3	Мікробіологі чна чистота, вміст цукру та молока, режим стерилізації	Термометр, манометр чашки Петрі з середовищами МПА та Сабуро, ваги	Кожну операцію	Стороння мікрофлора відсутня, кількість цукру 30-32% Температура 121°C, охолодженог о середовища 35-40°C, тиск 0,1 МПа
ДР 5.3 Приготуван ня розчину желатози Кмб 5.3.1 Кх 5.3.2 Кт 5.3.3	Вміст желатину, мікробіологіч на частота, режим стерилізації	Термометр, манометр чашки Петрі з середовищами МПА та Сабуро	Кожну операцію	Стороння мікрофлора відсутня, Температура 121°C, охолодженог о середовища 35-40°C, тиск 0,1 МПа

Продовження таблиці 4.5

ДР 6. Приготування поживного середовища Кт 6.1 Кмб 6.2 Кх 6.3	Мікробіологічна чистота, густина, рН, температура, тиск	Термопара, витратомір сталого перепаду, чашки Петрі з середовищами Сабуро та МПА, вимірювачі в'язкості та рН-метри	Кожну операцію	Ріст сторонньої мікрофлори на середовищах відсутній, тиск у сорочці 0,2 МПа, температура у реакторі для: Азотовмісних та цукровмісних компонентів 125°C, витримки 120-125°C, охолодженого 50-60°C; Розчину солей 140°C, охолодженого 50°C.
ДР 7.1 Отримання культури I генерації Кт 7.1.1 Кмб 7.1.2	Температура, вміст КУО у середовищі, мікробіологічна чистота	Термопара, чашки Петрі з середовищем Біфідум, сабуро та МПА, мікроскоп та камера Горяєва	Кожну операцію	38±1°C, стороння мікрофлора відсутня, 10 ⁸ -10 ⁹ КУО/см ³
ДР 7.2 Отримання культури II генерації Кт 7.2.1 Кмб 7.2.2	Температура, вміст КУО у середовищі, мікробіологічна чистота	Термопара, чашки Петрі з середовищем Біфідум, сабуро та МПА, мікроскоп та камера Горяєва	Кожну операцію	38±1°C, стороння мікрофлора відсутня, 10 ⁸ -10 ⁹ КУО/см ³

Продовження таблиці 4.5

ТП 8. Виробниче культивува ння Кт 8.1 Кмб 8.2 Кх 8.3	Температура, вміст КУО у середовищі, мікробіологіч на чистота, рівень заповнення ферментера, тиск, рН, вміст кисню, частота обертання мішалки.	Термопара, чашки Петрі з середовищем Біфідум, сабуро та МПА, мікроскоп та камера Горяєва, манометр та витратомір сталого тиску, рН метр, датчик вимірювання кількості кисню, рівнемір	Кожну операцію	$38 \pm 1^\circ\text{C}$, стороння мікрофлора відсутня, не менше 10^9 КУО/см ³ Рівень заповнення 0,65, тиск надлишковий 0,03-0,04 МПа рН = $6,7 \pm 0,2$, частота обертання 70 об/хв, вміст кисню – 0%,
ТП 9. Стабілізаці я культураль ної рідини Кх 9.1 Кмб 9.2	рН, кількість захисного середовища, мікробіологіч на чистота, кислотоутвор ення	Чашки Петрі з середовищами Сабуро та МПА, рН метр, ваги, реактиви та лабораторний посуд	Кожну операцію	рН = $6,7 \pm 0,5$, сторонньої мікрофлори не виявлено, кислотоутвор ення не менше 90°T вміст захисного середовища – 15%
ТП 10. Розлив у флакони Кт 10	Цілісність флаконів, заповнення флаконів, наявність пробки	Визначається автоматично за допомогою системи датчиків	Кожен флакон	Має відповідати нормі

Продовження таблиці 4.5

ТП 11. Отримання ліофільно висушеної біомаси Кт 11	Температура, тиск, вміст вологи	Термопари, вакуумметр Пірані	Кожна операція	Температура: від -60°C до 0°C та до 32- 34°C, тиск 26,6 Па, вологість біомаси 2-3%
ТП 11.4 Герметизац ія гумовими пробками	Герметичніст ь пакування, цілісність флакона	Автоматично	Кожну партію	Має бути герметичним та не мати пошкоджень
ТП 12. Закупорюва ння флаконів Кт 12	Цілісність флаконів, пробок, ковпачків, вага флаконів	Автоматично	Кожний флакон	Пакування має бути герметичне, всередині – наявний ліофілізат
ПМВ 13. Етикетуван ня, маркування та пакування флаконів Кт 13	Правильність друку етикетки, видимість номера партії та серії, правильність друку упаковки, форма та цілісність вторинного пакування	Автоматично за допомогою датчиків, етикетки та упаковка – вручну з допомогою атоматизації	Кожен флакон/кож на упаковка/ко жна етикетка	Етикетка має бути добре продрукована , не вицвіла, добре клеїтися, не мати заломів чи складок, фарба не має розмазуватис я, етикетка має містити всю необхідну інформацію. Номер партії та серія мають відповідати дійсним значенням і бути добре видимі на флаконі.

Продовження таблиці 4.5

				Упаковка має відповідати всьому зазначеному вище і має містити 10 флаконів та листок-вкладку. Шрифт Брайля має бути не нижче ніж 0,5 мм.
--	--	--	--	--

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Ферментери для виробничого культивування використовують для отримання біомаси або продуктів культивування бактерій та грибів. Вони мають різні конструкційні варіанти, що застосовуються залежно від умов росту продуцента, вимог до чистоти процесу, теплофізичних властивостей середовища тощо. Ферментери, або ж біореактори, умовно поділяють за двома ознаками: за будовою конструкції та за принципом перемішування культуральної рідини. За принципом перемішування виділяють дві групи: перемішування виключно шляхом аерації та перемішування за допомогою мішалки. До ферментерів з пневматичним перемішування відносять ферментери змішування (рис. 5.1) та колонні ферментери (рис. 5.2). Ферментери змішування для перемішування середовища використовують газорозподільний пристрій – барботер, а колонні – циркуляційні контури, що можуть представляти собою тарілки, насадки, мішалки, перегородки та циркуляційні труби.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ		
					РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Карпенко Ч. О.						
Конс.	Шидецький В. Ю.						
Керівн.	Литвинов Г. С.						
Затверд.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Аркцш	Аркцшів
						94	125

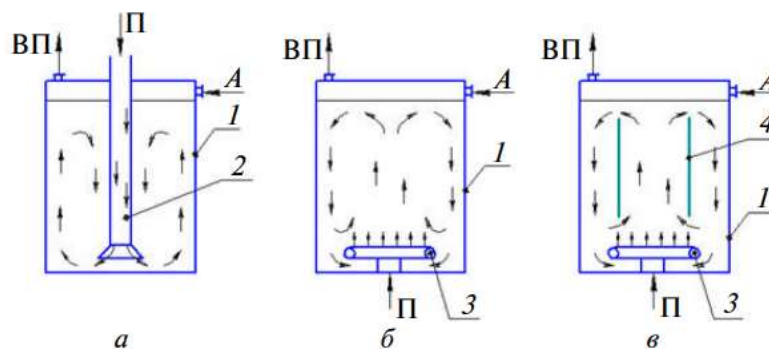


Рисунок 5.1 - Схема руху газорідинної дисперсії в різних конструкціях ферментерів змішування: а — ферментер із введенням повітря через вертикальний повітровід; б — ферментер із введенням повітря за допомогою барботера; в — ферментер з використанням циркуляційної труби; 1 — корпус, 2 — повітровід, 3 — барботер, 4 — циркуляційна труба, А — вхід рідини, П — повітря, ВП — відпрацьоване повітря [80]

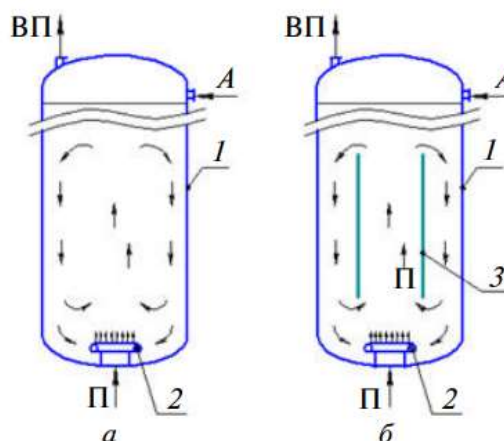


Рисунок 5.2 - Схема руху газорідинної дисперсії: а — колонний барботаажний ферментер; б — колонний циркуляційний (барботаажно-ерліфтний) ферментер; 1 — корпус, 2 — барботер, 3 — циркуляційна труба, А — вхід рідини, П — повітря, ВП — відпрацьоване повітря [80]

Іншим конструктивним типом ферментерів є ферментери з електроперемішувальними пристроями (рис. 5.3). Такі апарати відносять до ферментерів з комбінованим введенням енергії, оскільки основну перемішуючу дію виконує вал з насадженою на нього мішалкою, що може бути представлена різними конструкціями. Для аерації у таких ферментерах використовують барботери.

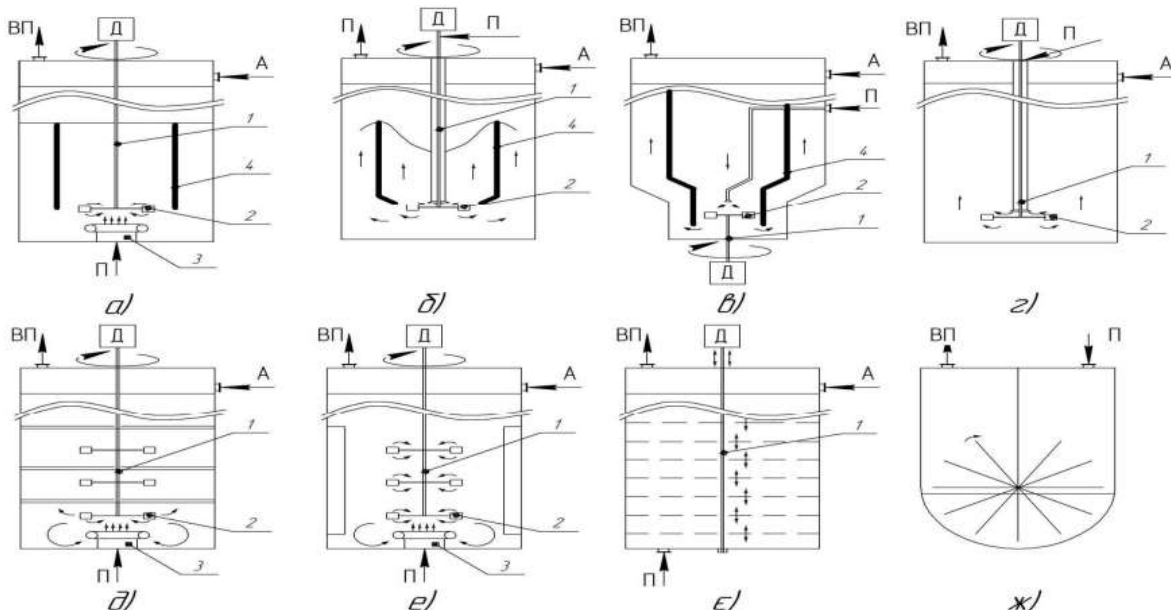


Рисунок 5.3 - Реактори з механічно рухомими конструкціями. 1 – вал мішалки; 2 – мішалка; 3 – аератор; 4 – дифузор; А – вхід рідини; П – повітря; ВП – відпрацьоване повітря [81]

Оскільки *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 строгий анаероб, варто обирати ферментер з механічним способом перемішування, оскільки барботування для проходження процесу не потрібне. Потрапляння кисню у біореактор спричинить порушення біосинтетичних процесів і знизить якість і кількість продукції, а також може стати причиною контамінації середовища, обираємо ферментер з торцевим ущільненням Т1 (ТТ) - подвійне з термічним затвором. Ущільнення знаходиться у місці приєднання валу, оскільки саме там потрапляння кисню найбільш ймовірне.

Перемішуючі пристрої для ферментера представлені декількома варіантами: лопатеві, якірні, рамні, турбінні та пропелерні. Їх форма суттєво залежить від властивостей середовища, яке використовується для культивування. Враховуючи характеристики обраного середовища Біфідум та культуральної рідини, що буде результатом ферментації, було обрано лопатеву мішалку. Такі мішалки призначені для роботи в середовищах в'язкістю до 3 Па·с, і виконують функції перемішування рідин та емульгування, можуть змулювати легкі осад та переводити часточки у завислий стан при їх концентрації до 90%, а також

повільно розчиняти речовини. У число переваг лопатевої мішалки входять її порівняно невелика вартість, простота в установці та обслуговуванні та ефективність.

Технологічний процес передбачає проведення виробничого біосинтезу протягом 72 годин, за температури 38°C та надлишкового тиску 0,03-0,04 МПа, рН 6,7±0,2. Перемішування здійснюється 3-4 рази на добу протягом 2-3 хвилин та з інтенсивністю 70 об/хв після коригування рН розчином аміаку 10% та відбору проб для контролю. Обрано лопатеву мішалку з 3 перемішувачами на валу, оскільки вона проста у виконанні і є доволі ефективною. Азот у ферментер подається через штуцер у верхній кришці.

З огляду на необхідні умови проведення біосинтезу пропонується використання ферментера промислового масштабу номінального об'єму 2 м³ (2000 л) від виробника SYSBIOTECH [82]. Компанія SYSBIOTECH виконує біореактори та ферментери на замовлення, відповідно у конструкцію ферментера можна вносити свої правки та побажання. Загальні характеристики апарату наведені у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1 – Характеристики ферментера 2 м³ від компанії SYSBIOTECH [82]

Розмір(висота : діаметр = 1,5:1 або 2:1):	
Матеріали	AISI 316L для деталей, що контактують з вологою
	AISI 304 для незмочуваних частин
Максимально допустимий тиск	3,0 кг/см ³ (середина ферментера)
	4,0 кг/см ³ (сорочка)
Максимальна допустима температура	143°C (всередині)
	151°C (сорочка)

Продовження таблиці 5.1

Обробка поверхні	Внутрішнє полірування 0,4 мкм (електрополірування)
	Зовнішнє полірування 1,2 мкм
	Клапан EPDM / PTFE та схвалений FDA силікон для прокладки та ущільнювальних кілець
Зварювання	Орбітальний зварений 20% усіх орбітальних зварних швів, що контактують із продуктом, перевіряються та реєструються за допомогою бороскопа 100% ручного зварювання перевіряється та записується бороскопом Усі зварні шви марковані
Тегування	Табличка з нержавіючої сталі з вигравіруваним ярликом або номером обладнання для кожного компонента.
Ізоляція	Усі труби з температурою вище 60°C (за винятком трубопроводу перед паровою уловлювачем) і нижчою за точку роси мають захисну ізоляційну оболонку
Елементи конструкції	
Верхня кришка	Мембранний манометр
	Мембранний датчик тиску
	Розривний диск
	Відведення газів з конденсатором
	Датчик рівня
	Датчик піни
	Можливість SIP-миття

Продовження таблиці 5.1

	Оглядове скло+світло
	Подача азоту
Верхні бічні стінки	Оглядове скло
Нижні бічні стінки	Температурний сенсор
	датчик рН
	датчик рО ₂
	датчик ОD
	Порт відбору проб
	Запасні порти
Сорочка	Система контролю температури
	Система контролю температури із замкнутим контуром
Днище	Загальний дренаж і дренаж біовідходів через стерилізований нижній клапан (самодренажний)
Перемішуючий пристрій	
	Механічне перемішування
	Ручне/автоматичне регулювання швидкості
	Діапазон обертів 10–600 об/хв.
	Лопатева мішалка
Трубопроводи	
Матеріал	Сталь санітарного класу
Призначення	Подача азоту
	Паропостачання установки
	Подача чистої пари

Продовження таблиці 5.1

	Подача охолоджувальної води
	Зворот охолоджуючої води
	Загальний злив
	Дренаж для біовідходів
	Вихлопні газы

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Розрахунки виконані згідно розрахунку, наведеного у [83].

Вихідні дані

Об'єм апарата: $V = 2 \text{ м}^3$;

Коефіцієнт заповнення: $\varphi = 0,65$;

Температура в апараті: $t_c = 38 \text{ }^\circ\text{C}$;

Тривалість культивування: $\tau_k = 72 \text{ год} = 259200 \text{ с}$;

Інтенсивність аерації: відсутня

Перемішування: $70 \text{ об/хв} = 1,17 \text{ об/с}$

Холодний теплоносіє: вода.

Густина поживного середовища (ПС) $\rho = 1060 \text{ кг/м}^3$

Коефіцієнт динамічної в'язкості ПС $\mu = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості ПС $0,00000142 = \nu = 1,42 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$

Теплоємність ПС $C = 3700 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$

Коефіцієнт теплопровідності ПС $\lambda = 0,6 \text{ Вт/м} \cdot \text{K}$

Критерій Прандтля

$$Pr_c = \frac{c_c \cdot \mu_c}{\lambda_c} = \frac{3700 \cdot 1,5 \cdot 10^{-3}}{0,6} = 9,25$$

Конструктивний розрахунок

Робочий об'єм апарата:

$$V_p = V \cdot \varphi = 2 \cdot 0,65 = 1,3 \text{ м}^3$$

Для визначення параметрів ферментера скористаємося ГОСТ 20680-75:

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						100
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Внутрішній діаметр апарата $D = 1,4$ м

Висота корпусу апарата $H = 1,550$ м

Для визначення габаритів днища скористаємося ГОСТ 6533-78

Висота борта $h_1 = 0,04$ м

Висота еліптичної частини днища $h_v = 0,35$ м

Товщина стінки днища $S_{ст} = 0,03$ м

Внутрішня поверхня днища $F = 2,39$ м²

Об'єм днища $V_{дн} = 0,4499$ м³

Маса днища $m = 590,2$ кг

Повна висота днища дорівнює сумі висоти борта та еліптичної частини днища:

$$h_{дн} = h_1 + h_v = 0,04 + 0,35 = 0,39 \text{ м}$$

Обчислюємо об'єм циліндричної частини апарата:

$$V_{ц} = V - 2V_{дн} = 2 - 2 \cdot 0,4499 = 1,1 \text{ м}^3$$

Обчислюємо площу основи циліндричної частини:

$$F_{ос.ц.} = \frac{\pi D^2}{4} = \frac{\pi \cdot 1,4^2}{4} = 1,539 \text{ м}^2$$

Знаходимо висоту циліндричної частини:

$$h_{ц} = \frac{V_{ц}}{F_{ос.м}} = \frac{1,002}{1,539} = 0,715 \text{ м}$$

Розраховуємо висоту апарата:

$$h_{п.ап} = h_{ц} + 2h_{дн.} = 0,715 + 2 \cdot 0,39 = 1,495 \text{ м}$$

Розраховуємо висоту рівня рідини в апараті:

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{дн})}{\pi D^2} + h_{дн} = \frac{4 \cdot (1,3 - 0,4499)}{\pi \cdot 1,4^2} = 0,94224 \text{ м}$$

Розрахунок мішалки

Згідно з ГОСТ 20680-75, для лопатевої мішалки діаметр має відповідати співвідношенню

$$d_m = \frac{D}{1,4 \div 1,7} = \frac{1,4}{1,4 \div 1,7} = 0,823 \div 1 \text{ м}$$

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						101
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Обираємо стандартний діаметр мішалки: $d_m = 0,9$ м

Зі співвідношень, наведених у [83] визначаємо інші характеристики мішалки:

Висота:

$$h_m = 0,1 \cdot d_m = 0,1 \cdot 0,9 = 0,09 \text{ м}$$

Відстань від мішалки до днища:

$$h = (0,4 \div 1) \cdot d_m = (0,4 \div 1) \cdot 0,9 = 0,036 \div 0,09 \text{ м}$$

Обираємо відстань 0,04 м

Довжина лопаті мішалки:

$$l = 0,25 d_m = 0,25 \cdot 0,9 = 0,225 \text{ м}$$

Товщина відбивної перегородки:

$$b = 0,1 d_m = 0,1 \cdot 0,9 = 0,09 \text{ м}$$

Коеф. гідравлічного опору лопатевої мішалки: $\xi_m = 0,86$

Кількість мішалок

$$z_m = 1$$

Стандартний діаметр вала: $d_v = 0,05$ м

Розрахунок глибини воронки

У типовій технології сказано, що частота обертання 70 об/хв, що в свою чергу дорівнює:

$$n = 1,17 \text{ с}^{-1}$$

Округлюємо до найближчого табличного значення

$$n = 1,05 \text{ с}^{-1}$$

Параметр висоти завантаження апарата:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \frac{0,922}{1,4} + 1 = 6,384$$

Обчислюємо відцентровий критерій Рейнольдса за формулою:

$$Re_u = \frac{\rho_c n d_m^2}{\mu_c} = \frac{1060 \cdot 1,05 \cdot 0,9^2}{0,0015} = 601020$$

Знаходимо параметр гідравлічного опору мішалки:

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_z Re_u^{0,25}} = \frac{6,384}{0,86 \cdot 1 \cdot 601020^{0,25}} = 0,267$$

За допомогою графіка на рис. 5.4 визначаємо параметр розподілення швидкості ψ

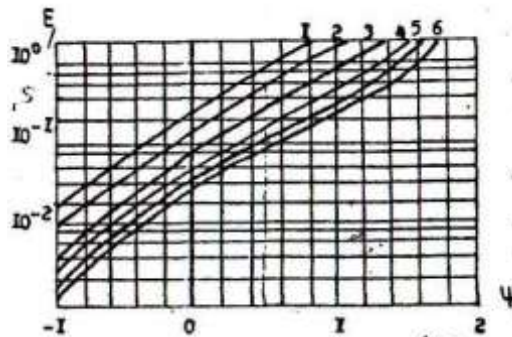


Рисунок 5.4 - Параметр розподілення швидкості $\psi=f(E)$ для мішалок: трьохлопастної (01), турбінна відкритої (03), шестилопастної (05), лопастної (07), емальований лопастних, фрезерної та пропелерної при $z_D \geq 1,5$

$$\psi = -0,8$$

За параметром розподілення швидкості та рис. 5.5 знаходимо параметр глибини воронки В:

$$B = 16$$

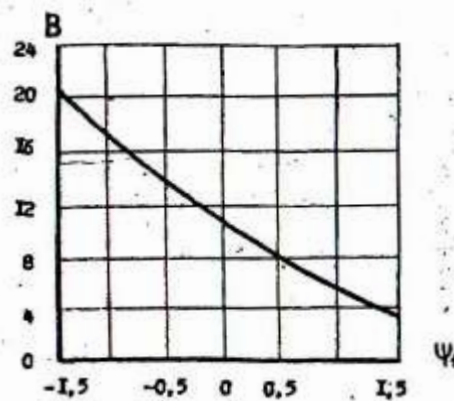


Рисунок 5.5 - Параметр глибини воронки $B=f(\psi_1)$

Глибина воронки:

$$h_B = \frac{B n^2 d^2}{2} = \frac{16 \cdot 1,05^2 \cdot 0,9^2}{2} = 0,729 \text{ м}$$

Гранично допустима глибина воронки:

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						103
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$h_{гр} = H_p - h = 0,9422 - 0,04 = 0,902м$$

Оскільки нерівність $h_B > h_{гр}$ не виконується, відбивні перегородки встановлювати не потрібно.

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

За графіком (рис. 5.6) знаходимо коефіцієнт потужності, який залежить від $Re_{ц.}$

$$K_N = 0,7$$

Обчислюємо потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 0,7 \cdot 1060 \cdot 1,05^3 \cdot 0,9^5 = 507,206 Bm$$

Розрахунок потужності привода мішалки

Розраховуємо потужність, що витрачається на тертя в подвійному торцевому ущільненні:

$$N_{ущ} = 10440 d_s^{1,3} = 10440 \cdot 0,05^{1,3} = 212,501 Bm$$

Коефіцієнт, що враховує рівень рідини в апараті:

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{0,9422}{1,4}} = 0,82$$

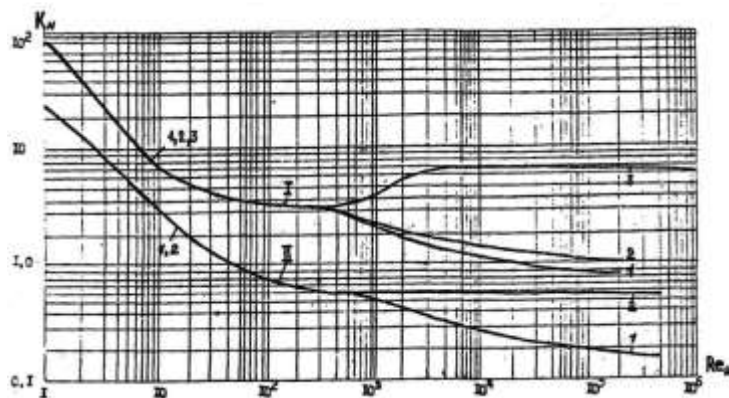


Рисунок 5.6 - Число $K_N = f(Re_{ц.})$:

- I – турбінна мішалка при $\xi_M=8,4$; 1- апарат без перегородки, $z_D=3$; 2 – без перегородки, $z_D=4$; 3 – апарат з перегородкою, $z_D=3-4$.
 II – лопаті мішалки при $\xi=0,88$; 1 – без перегородки при $z_D=1,5$; 2 – з перегородкою при $z_D=1,5$.

Розраховуємо потужність привода мішалки за формулою:

$$N_{ел} = \frac{(K_n K_H \cdot \sum K_i \cdot N + N_{уц})}{\eta} = \frac{(1,25 \cdot 0,820 \cdot 4,4 \cdot 507,206 + 212,501)}{0,85} = 2942,427 \text{ Вт} = 2,942 \text{ кВт}$$

де $K_n = 1,25$ для апаратів без перегородок; K_i – коефіцієнти, які враховують витрати потужності на подолання опору внутрішніх пристроїв ферментера. Значення $K_i=1,1 \div 1,2$ приймають за наявності в апараті гільзи термометра, труби передавлювання, пристрою для вимірювання рівня рідини, $K_i=2$ приймають за наявності змішувача, що розміщений вздовж стінки реактора. $\eta = 0,85 \div 0,9$ – коефіцієнт корисної дії привода. Оскільки обраний ферментер містить гільзу термометра, рівнемір, рН-метр та пробовідбірник, $\sum K_i$ буде дорівнювати 4,4 (1,1·4)

Тепловий розрахунок

Для зручності, а також тому, що для інокуляції та для виробничого синтезу використовується однакове середовище, прийmemo, що теплофізичні властивості посівного матеріалу (ПМ), поживного середовища (ПС) та культуральної рідини (КР) однакові.

Розраховуємо об'єми поживного середовища та посівного матеріалу

$$V_{пс} = 0,8 \cdot V_p = 0,8 \cdot 1,3 = 1,04 \text{ м}^3$$

$$V_{пм} = 0,2 \cdot V_p = 0,2 \cdot 1,3 = 0,26 \text{ м}^3$$

Маси ПС, ПМ та КР:

$$m_{пс} = V \cdot \rho = 1,04 \cdot 1060 = 1102,4 \text{ кг}$$

$$m_{пм} = V \cdot \rho = 0,26 \cdot 1060 = 275,6 \text{ кг}$$

$$m_{кр} = V \cdot \rho = 1,3 \cdot 1060 = 1378 \text{ кг}$$

Енергія, що надходить у ферментер

1) З поживним середовищем

$$E_{пс} = m_{пс} c_c t_c = 1102,4 \cdot 3700 \cdot 38 = 154997440 \text{ Дж} = 154,99 \text{ МДж}$$

2) З посівним матеріалом

$$E_{пм} = m_{пм} c_c t_c = 275,6 \cdot 3700 \cdot 38 = 38749360 \text{ Дж} = 38,749 \text{ МДж}$$

3) З повітрям (азотом)

$$E_{нов.над} = \rho_{нов} \cdot W_z \cdot c_{нов} \cdot t_{нов} \cdot \tau_k = 1,087 \cdot (2 - 1,3) \cdot 1000 \cdot 259200 = 7494560640 \text{ Дж} = 7494,5606 \text{ МДж}$$

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						105
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

де $\rho_{\text{пов.}}$ – густина азоту при температурі 38 °C ($\rho_{\text{пов.}} = 1,087 \text{ кг/м}^3$); $c_{\text{пов.}}$ – питома теплоємність азоту ($c_{\text{пов.}} = 1000 \text{ Дж/(кг·K)}$).

- 4) теплота, яка виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв

$$E_{\text{дис}} = N \cdot \tau_k = 507,206 \cdot 259200 = 131467785,3 \text{ Дж} = 131,468 \text{ МДж}$$

- 5) теплота, яка виділяється у процесі біохімічних перетворень

$$E_{\text{цук}} = m_{\text{цук}} \cdot q_{\text{цук}} = q_{\text{цук}} \cdot m_{\text{нс}} \cdot (C_{\text{гл}} + C_{\text{др}} \cdot C_{\text{цук.др}}) = 16,7 \cdot 10^6 \cdot 1102,4 \cdot (0,07 + 0,05 \cdot 0,1) = 1380756000 \text{ Дж} = 1380,756 \text{ МДж}$$

Визначаємо сумарне надходження енергії до ферментера:

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{нс}} + E_{\text{пов.над}} + E_{\text{дис}} + E_{\text{цук}} + E_{\text{нм}} = 154,9974 + 38,7493 + 7494,5606 + 131,4677 + 1380,7560 = 9200,531 \text{ МДж}$$

Обчислюємо втрати теплової енергії:

- 1) із культуральною рідиною

$$E_{\text{кр}} = m_{\text{кр}} c_c t_c = 1378 \cdot 3700 \cdot 38 = 193746800 \text{ Дж} = 193,747 \text{ МДж}$$

- 2) З повітрям (азотом)

$$E_{\text{пов.над}} = \rho_{\text{пов.}} \cdot W_z \cdot c_{\text{пов.}} \cdot t_{\text{пов.}} \cdot \tau_k = 1,087 \cdot (2 - 1,3) \cdot 1000 \cdot 259200 = 7494560640 \text{ Дж} = 7494,561 \text{ МДж}$$

- 3) Втрати теплоти у навколишнє середовище (приймаємо 2%)

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_{\text{кр}} + E_{\text{пов.втр}}) = 0,02 \cdot (193,7468 + 7494,5606) = 153,7661 \text{ Дж} = 1,537 \cdot 10^{-4} \text{ МДж}$$

Визначаємо сумарні витрати теплоти:

$$\sum E_{\text{втр}} = E_{\text{кр}} + E_{\text{пов.втр}} + E_{\text{втр}} = 193,747 + 1,537 \cdot 10^{-4} + 7494,561 = 7688,308 \text{ МДж}$$

Теплове навантаження у ферментері:

$$E_m = \sum E_{\text{надх}} + \sum E_{\text{втр}} = 9200,531 - 7688,308 = 1512,224 \text{ МДж}$$

Оскільки $E > 0$, то для підтримання заданої температури культивування необхідно проводити охолодження.

Приймаємо початкову температуру носія

$$t_1 = 15^\circ\text{C}$$

$$t_2 = 30^\circ\text{C}$$

Різниця температур:

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						106
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$\Delta t = t_2 - t_1 = 30 - 15 = 15^\circ\text{C}$$

Середня температура води:

$$t_{cp} = \frac{t_1 + t_2}{2} = \frac{15 + 30}{2} = 22,5^\circ\text{C}$$

За таблицею теплофізичних параметрів визначаємо значення для води за температури $22,5^\circ\text{C}$

$$\rho_B = 997,575 \text{ кг/м}^3$$

$$\nu_B = 9,558 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$$

$$c_B = 4,181 \text{ кДж/(кг} \cdot \text{К)}$$

$$\lambda_B = 0,601 \text{ Вт/(м} \cdot \text{К)}$$

$$\text{Pr}_B = 7,085$$

Тепловий потік

$$Q = \frac{E_m}{\tau_k} = \frac{1512,224}{259200} \cdot 10^6 = 5834,196 \text{ Вт}$$

Обчислюємо витрату води для відведення тепла:

$$G_g = \frac{Q}{c_g \cdot \Delta t} = \frac{5834,196}{4180 \cdot 15} = 0,093 \text{ кг/с}$$

Розраховуємо більшу та меншу різниці температур:

$$\Delta t_M = t_c - t_2 = 38 - 30 = 8^\circ\text{C}$$

$$\Delta t_6 = t_c - t_1 = 38 - 15 = 23^\circ\text{C}$$

$\Delta t_6 / \Delta t_M = 2,875 > 2$, тоді середня різниця температур теплоносіїв розраховується за формулою:

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_6 - \Delta t_M}{\ln \frac{\Delta t_6}{\Delta t_M}} = \frac{23 - 8}{\ln \frac{23}{8}} = 2,875^\circ\text{C}$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі середовища в реакторі

Розраховуємо критерій Нуссельта

$$Nu_1 = C \cdot \text{Re}_y^\alpha \cdot \text{Pr}_c^{0,33} = 0,360 \cdot 601020^{0,67} \cdot 9,25^{0,33} = 5584,507$$

де C і α – коефіцієнти критеріального рівняння (для апарата з лопатевою мішалкою та без відбивних перегородок беремо $C = 0,360$; $\alpha = 0,670$).

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						107
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_1 = \frac{Nu_1 \cdot \lambda_c}{D} = \frac{5584,507 \cdot 0,6}{1,4} = 2393,360 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К})$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі води в сорочці

Розраховуємо площу перетину сорочки:

$$f = 0,785(D_1^2 - (D + 2s)^2) = 0,785(1,6^2 - (1,4 + 2 \cdot 0,03)^2) = 0,336 \text{ м}^2$$

де D_1 – внутрішній діаметр сорочки ферментера $D_1 = D + (0,1 \div 0,3) = 1,6 \text{ м}$

Розраховуємо швидкість води у сорочці

$$w_g = \frac{G_g}{\rho_g f} = \frac{0,093}{997,575 \cdot 0,336} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ м} / \text{с}$$

Розраховуємо критерій Рейнольдса

$$Re_2 = \frac{w_g \cdot (D_1 - (D + 2s))}{\nu_g} = \frac{3 \cdot 10^{-3} \cdot (1,6 - (1,4 + 2 \cdot 0,03))}{9,56 \cdot 10^{-7}} = 40,621$$

$Re_2 < 2300$, відповідно, режим руху води – ламінарний.

Приймаємо, що температура стінки ферментера середня між температурою середовища та охолоджувальної води:

$$t_{cm} = \frac{t_c + t_{cp}}{2} = \frac{38 + 22,5}{2} = 30,25^\circ \text{C}$$

Розраховуємо критерій Нуссельта:

$$Nu_2 = C \cdot (Gr \cdot Pr)^a = 0,15 \cdot (1,191 \cdot 10^{11})^{0,33} = 677,912$$

Де C та a – коефіцієнти, значення яких залежить від $(Gr \cdot Pr)$

$$Gr \cdot Pr = H_c^3 (t_{cm} - t_{cp}) \cdot B = 0,942^3 \cdot (30,25 - 18,375) = 1,191 \cdot 10^{11}$$

Де H_c – висота стінки сорочки ($H_c = H_p = 0,9422 \text{ м}$); $B = 18,375$ (для $t_{ct} = 30,25^\circ \text{C}$)
($Gr \cdot Pr$) $> 10^9$, тоді коефіцієнти: $C = 0,15$, $a = 0,33$.

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі від води до стінки апарата:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_g}{H_c} = \frac{677,912 \cdot 0,601}{0,942} = 432,223 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К})$$

Визначення коефіцієнта теплопередачі

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						108
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розраховуємо коефіцієнт теплопередачі від середовища до охолоджуючої води:

$$K_m = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_2} + \frac{\delta_{cm}}{\lambda_{cm}} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{2393,360} + \frac{0,03}{17,5} + \frac{1}{432,223}} = 224,935 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К})$$

де $\delta_{ст} = S_{ст} = 0,03$; $\lambda_{ст}$ – коефіцієнт теплопровідності стінки (приймаємо 17,5 Вт/(м·К)).

З урахуванням забруднень на стінках:

$$K = 0,95 K_T = 0,95 \cdot 224,935 = 213,688 \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К})$$

Розраховуємо необхідну площу поверхні охолодження ферментера:

$$F_n = \frac{Q}{K \Delta t_{cp} \tau_k} = \frac{5834,196}{213,688 \cdot 14,203 \cdot 259200} = 7,42 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2$$

Розраховуємо дійсну площу поверхні теплообміну:

$$F_o = \pi D H_{роб.с} = \pi \cdot 1,4 \cdot 0,552 = 2,429 \text{ м}^2$$

Де $H_{роб.с.}$ – висота робочої частини сорочки:

$$H_{роб} = H_c - h_{дн.} = 0,9422 - 0,39 = 0,552 \text{ м}$$

$F_d > F_n$, тоді поверхні теплообміну сорочки апарата вистачить для забезпечення підтримання температурного режиму культивування.

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Після подачі холодного теплоносія, а саме води, у сорочку реактора потрібен насос. Для того, щоб обрати насос, потрібно виконати наступні розрахунки:

Потужність, що витрачається на перекачування води:

$$N_n = G_{вод} \cdot H \cdot g$$

де $G_{вод}$ – витрати води для відводу тепла, кг/с, H – напір, м (приймаємо за 15), g – прискорення вільного падіння, м/с².

$$N_n = 0,093 \cdot 15 \cdot 9,81 = 13,685 \text{ Вт.}$$

Потужність електродвигуна:

$$N_e = N_n / \eta \cdot \eta_{пер},$$

де η – ККД насоса (0,8), $\eta_{пер}$ – коефіцієнт корисної дії передачі

$$N_e = 13,685 / 0,3 \cdot 1 = 4,105 \text{ Вт.}$$

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						109
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

За даними розрахунків було обрано відцентровий насос ЦГ 6,3/20. Він переганяє 1,75 л/с води, має напір 20 м, ККД – 0,3.

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Протягом усього терміну експлуатації ферментера необхідно дотримуватися вимог безпеки. Обладнання повинно бути безпечним у застосуванні під час всіх етапів, таких як виготовлення, монтаж, експлуатація, ремонт, транспортування та зберігання, незалежно від того, чи воно використовується автономно, чи у складі технологічних ліній.

В технічних документах, які затверджені у встановленому порядку, повинен бути вказаний призначений термін служби обладнання. Для ферментерів, які планується встановлювати на відкритих майданчиках або в неопалюваних приміщеннях, необхідно враховувати середню температуру найхолоднішого тижня у році. Мінімальну (негативну) та максимальну (позитивну) температуру допустимої до роботи встановлюють нормативні документи, такі як ISO, стандарти OHSAS, GMP.

Конструкція ферментера повинна передбачати ефективні методи відведення тепла, наявність пристроїв для автоматичного контролю, регулювання процесів протиаварійного захисту та сигналізації.

Усі комплектуючі, що використовуються, повинні відповідати вимогам технічних документів на ці вироби та мати сертифікати або паспорти, що оформлені у відповідному порядку.

Ферментер повинен мати достатню міцність та герметичність щодо зовнішнього середовища. Ступінь герметичності, а також методи та способи перевірки на герметичність повинні визначатися нормативними документами.

Ф повинно відповідати вимогам щодо пожежної та вибухобезпеки, встановленим у відповідних стандартах та документах експлуатації. Його слід використовувати виключно відповідно до його прямого призначення та режимів, визначених експлуатаційними документами. Виробничі приміщення повинні бути оснащені відповідною пожежною технікою згідно з вимогами стандарту.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						110
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Устаткування має бути обладнане спеціальними пристроями, які захищають навколишнє середовище від шкідливих викидів у повітря. Для цього використовується система очищення води, яка налічує декілька етапів. Викиди мікроорганізмів та продуктів мікробіологічного синтезу в повітря та воду необхідно ретельно очищати, наприклад, з використанням НЕРА-фільтрів.

У виробничому приміщенні потрібно постійно контролювати стан повітря, справність ущільнювальних пристроїв обладнання, комунікацій, вентиляційних та аспіраційних систем, щоб не допускати перевищення ГДК (гранично допустимих концентрацій) шкідливих речовин (наприклад, аміаку).

Обладнання, що працює під тиском (ферментер) повинно бути оснащено запобіжними пристроями, що запобігають перевищенню допустимого тиску та вибуху, а також автоматичною сигналізацією про аварійні ситуації.

Скидання технологічних продуктів після спрацювання запобіжного пристрою повинно відбуватись відповідно до вимог відповідних нормативних документів.

Температура поверхонь обладнання та трубопроводів на робочих місцях не має перевищувати 45 °С. Поверхні, які мають температуру вище 45 °С, повинні бути ізольовані. Після теплоізоляції на обладнанні слід нанести сигнальні кольори та знаки безпеки відповідно до встановлених вимог.

Електроустаткування повинно відповідати вимогам, встановленим відповідними стандартами.

Устаткування має бути належно заземлене, що забезпечує захист персоналу від ураження електричним струмом та статичної електрики/

Рухомі частини обладнання повинні бути огорожені відповідно до вимог відповідного стандарту або забезпечені іншими засобами захисту.

Огородження та інші пристрої безпеки повинні бути добре видимі.

Припустимі рівні звукового тиску та рівні шуму не має перевищувати встановлених норм.

Освітленість на робочих місцях повинна відповідати встановленим нормам.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						111
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розміщення обладнання та його загальна компоновка повинні забезпечувати можливість безпечного монтажу, демонтажу, обслуговування та ремонту, відповідно до встановлених вимог.

Для внутрішнього огляду, чищення та ремонту в обладнанні необхідно передбачити відповідні люки та люки відповідно до нормативних документів. Розбір обладнання для внутрішнього огляду, чищення та ремонту повинні проводитися тільки після зупинки та дезінфекції (стерилізації) обладнання та відключення електроенергії.

Ферментер має бути укомплектований системами вентиляції, які повністю забезпечують видалення азоту, що подається для створення тиску, з робочих приміщень до атмосфери. Після стерилізації ферментера, комунікацій та арматури, пара має відводитися з будівель у зовнішнє середовище. Ферментер має бути оснащений пристроями для контролю та вимірювання рівня кислотності, температури, рівня рідини та інших показників згідно з технологічною схемою процесу. Відбір проб з ферментера повинен проводитись таким чином, щоб виключити контакт обслуговуючого персоналу з культуральними рідинами [85].

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						112
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. У вступі до дипломного проєкту визначено актуальність виробництва пробіотичних дієтичних добавок та стан ринку в Україні.
2. У дипломному проєкті із розробки технології виробництва дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum* було обрано штам *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697.
3. Описано характеристики обраного продуценту, особливості умов його росту, а саме: анаеробне середовище (N_2 -99%), температура 38 ± 1 °C, pH $6,7 \pm 0,2$, перемішування 70 об/хв, культивування протягом 72 год, надлишковий тиск 0,03- 0,04 МПа. Для виробничого культивування обрано середовище Біфідум на основі панкреатичного гідролізату казеїну, екстракту пекарських дріжджів, глюкози та лактози.
4. Охарактеризовано кінцевий продукт – дієтичну добавку у формі ліофільного порошку біомаси *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697, та проаналізовано її вплив на організм людини.
5. Описано технологічну схему отримання пробіотичної дієтичної добавки, сировину, матеріали та методи контролю, що використовуються у процесі виготовлення дієтичної добавки.
6. Розраховано та сконструйовано ферментер номінальним об'ємом 2 м³, що за один цикл роботи продукує 1235 літрів культуральної рідини, що еквівалентно 523000 флаконам з дієтичною добавкою (з урахуванням втрат).
7. Було розроблено технологічну та апаратурну схеми технології виробництва дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму *Bifidobacterium longum*, у формі ліофільного порошка, упакованого у флакони №10.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Карпенко У. О.			ВИСНОВКИ	Стадія	Аркш
Конс.							113
							125
Керівн.		Литвинов Г. С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затверд.							

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Safety assessment of probiotics for human use / М. Е. Sanders та ін. *Gut microbes*. 2010. Т. 1, № 3. С. 164–185.
URL: <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127> (дата звернення: 18.06.2023).
2. World gastroenterology organisation global guidelines. Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Organisation (WGO)*.
URL: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english> (дата звернення: 18.06.2023).
3. Benefaction of probiotics for human health: a review / R. George Kerry та ін. *Journal of food and drug analysis*. 2018. Т. 26, № 3. С. 927–939.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002> (дата звернення: 18.06.2023).
4. IPA Europe - Market data. Ipa Europe. URL: <https://www.ipaeurope.org/legal-framework/market-data/> (дата звернення: 18.06.2023).
5. Немченко, А. С., Міщенко, В. І., Мищенко, В. І., Винник, О. В., Винник, Е. В., & Тув, А. Д. (2019). Аналіз особливостей розвитку ринку пробіотиків в світі та Україні.
6. Немченко, А. С., Міщенко, В. І., Винник, О. В., & Ляшенко, В. В. (2022). АНАЛІЗ ТЕНДЕНЦІЙ СУЧАСНОГО РОЗВИТКУ РИНКУ ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК В УКРАЇНІ. Редакційна колегія: проф. Котвицька АА, проф. Владимірова ІМ, проф. Рубан ОА, проф. Ярних ТГ, проф. Сагайдак-Нікітюк РВ, доц. Ковалевська ІВ, д оц. Ковальов ВВ, ас. Пономаренко ТО, 284.
7. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases / E. Rinninella та ін. *Microorganisms*. 2019. Т. 7, № 1. С. 14. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014> (дата звернення: 18.06.2023).

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Карпенко Ч. О.			ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	Стадія	Аркцш
Конс.							114
							125
Керівн.		Литвинов Г. С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затверд.							

8. Microbiological aspects of probiotic preparations / A. V. Krysenko та ін. *Biosystems diversity*. 2010. Т. 18, № 2. С. 19–24.
URL: <https://doi.org/10.15421/011021> (дата звернення: 18.06.2023).
9. Hoque, M. Z., et al. Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurts. *World J Dairy Food Sci*, 2010, 5.1: 39-46.
10. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*. 2014. Т. 11, № 5. С. 4745–4767.
URL: <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745> (дата звернення: 18.06.2023).
11. Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с. : іл. 4, табл. 21, бібліогр. 130 назв. ISBN 978-617-7845-80-4
12. The genus enterococcus: between probiotic potential and safety concerns—an update / Н. Nanchi та ін. *Frontiers in microbiology*. 2018. Т. 9.
URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791> (дата звернення: 18.06.2023).
13. Технологія пробіотиків: підручник / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2012. - 318 с.
14. Evaluation of safety and probiotic properties of a strain of *Enterococcus faecium* isolated from chicken bile / Y. Shi та ін. *Journal of food science and technology*. 2019. Т. 57, № 2. С. 578–587. URL: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04089-7> (дата звернення: 18.06.2023).
15. Whitman W. B. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Wiley & Sons, Limited, John, 2015.
16. Czerucka D., Piche T., Rampal P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007. Т. 26,

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						115
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- № 6. С. 767–778. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x> (дата звернення: 18.06.2023).
17. Streptococcus - medical microbiology - NCBI bookshelf. *National Center for Biotechnology Information*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/> (дата звернення: 18.06.2023).
18. STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS: overview, uses, side effects, precautions, interactions, dosing and reviews. *WebMD - Better information. Better health*. URL: <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-1621/streptococcus-thermophilus> (дата звернення: 18.06.2023).
19. Streptococcus thermophilus: from yogurt starter to a new promising probiotic candidate? / O. Uriot та ін. *Journal of functional foods*. 2017. Т. 37. С. 74–89. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.038> (дата звернення: 18.06.2023).
20. Taxonomy browser (Bifidobacterium longum subsp. longum JDM301). *National Center for Biotechnology Information*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=759350> (дата звернення: 18.06.2023).
21. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 1: Пер. с англ./Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. — М.: Мир, 1997. — 432 с., ил.
22. Sgorbati B., Biavati B., Palenzona D. The genus Bifidobacterium. *The genera of lactic acid bacteria*. Boston, MA, 1995. С. 279–306. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_8 (дата звернення: 18.06.2023).
23. URL: https://mcoddb.bcrc.firdi.org.tw/detail.jsp?bcrc_id=14634 (дата звернення: 18.06.2023).
24. JCM catalogue. *Microbe Division (JCM) (RIKEN BRC)*. URL: <https://www.jcm.riken.jp/cgi->

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						116
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

bin/jcm/jcm_keyword?AN=Bifidobacterium&BN=longum&CN=&am p;DN= (дата звернення: 18.06.2023).

25. Bifidobacterium longum rosell-175 - C.F.M. co. farmaceutica milanese. *C.F.M. Co.* *Farmaceutica* *Milanese.*

URL: <https://www.cofamispa.it/en/prodotti/bifidobacterium-longum-rosell-175-2/> (дата звернення: 18.06.2023).

26. Probiotic properties of bifidobacteria isolated from feces of infants / С.-Н. Kang та ін. *Journal of milk science and biotechnology*. 2019. Т. 37, № 1. С. 40–48.

URL: <https://doi.org/10.22424/jmsb.2019.37.1.40> (дата звернення: 18.06.2023).

27. Про погодження методик визначення біологічних речовин : Постанова; Держсанепідемслужба (з 2003р.) від 28.01.2004 № 4 // База даних «Законодавство України» / Верховна Рада України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/go/v0004541-04> (дата звернення: 18.06.2023)

28. Safety Evaluations of Bifidobacterium bifidum BGN4 and Bifidobacterium longum BORI / М. Kim та ін. *International journal of molecular sciences*. 2018. Т. 19, № 5. С. 1422. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms19051422> (дата звернення: 18.06.2023).

29. Bergey's manual® of systematic bacteriology / ред.: М. Goodfellow та ін. New York, NY : Springer New York, 2012. URL: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4> (дата звернення: 18.06.2023).

30. The bifidobacteria and related organisms. Elsevier, 2018. URL: <https://doi.org/10.1016/c2015-0-02462-5> (дата звернення: 18.06.2023).

31. Identifying the essential nutritional requirements of the probiotic bacteria Bifidobacterium animalis and Bifidobacterium longum through genome-scale modeling / М. Schöpping та ін. *Npj systems biology and applications*. 2021. Т. 7, № 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41540-021-00207-4> (дата звернення: 18.06.2023).

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						117
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

32. Effect of CO₂ on colony development by bifidobacterium species / S. Kawasaki та ін. *Applied and environmental microbiology*. 2007. Т. 73, № 23. С. 7796–7798. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.01163-07> (дата звернення: 18.06.2023).
33. Shah N. P. BACTERIA, BENEFICIAL | bifidobacterium spp.: morphology and physiology. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2011. С. 381–387. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00043-1> (дата звернення: 18.06.2023).
34. Otieno, D.O. (2011). Biology of Prokaryotic Probiotics. In: Liong, MT. (eds) Probiotics. Microbiology Monographs, vol 21. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20838-6_1
35. Javvadi, Sree Gowrinadh, et al. A novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium longum subsp. infantis* has dual antimicrobial and immunomodulatory activity. *bioRxiv*, 2022, 2022.01. 27.477972.
36. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum / B. Del Re та ін. *Letters in applied microbiology*. 2000. Т. 31, № 6. С. 438–442. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x> (дата звернення: 18.06.2023).
37. ATLAS, Ronald M. *Handbook of microbiological media*. CRC press, 2010.
38. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. — Т. 3. — 732 с. — ISBN 978-966-96478-9-4
39. Yeast extract: characteristics, production, applications and future perspectives / Z. Tao та ін. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2022. URL: <https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057> (дата звернення: 18.06.2023) .

40. Мікробіологія : підручник / М.Г. Сергійчук, В.К. Позур, Т.М. Фурзікова та ін. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2008. – 541 с.
41. Crystal structures of phosphoketolase / R. Suzuki та ін. *Journal of biological chemistry*. 2010. Т. 285, № 44. С. 34279–34287. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.156281> (дата звернення: 18.06.2023).
42. Zhao J., Cheung P. C. K. Comparative Proteome Analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Grown on β -Glucans from Different Sources and a Model for Their Utilization. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013. Т. 61, № 18. С. 4360–4370. URL: <https://doi.org/10.1021/jf400792j> (дата звернення: 18.06.2023).
43. Машкін М. І., Париш Н. М. Технологія молока і молочних продуктів: Навчальне видання. — К.: Вища освіта, 2006. — 351 с.: іл. ISBN 966-8081-53-6
44. Савченко О.А., Грек О.В., Красуля О.О. Сучасні технології молочних продуктів: Підручник. – К.; ЦП «Компринт», 2018.– 218 с.
45. Kailasapathy K. Chemical composition, physical, and functional properties of milk and milk ingredients. *Dairy processing and quality assurance*. Chichester, UK, 2015. С. 77–105. URL: <https://doi.org/10.1002/9781118810279.ch04> (дата звернення: 18.06.2023).
46. ДСТУ 4623:2006 Цукор білий. Технічні умови. Із Поправками та Зміною №1
47. Біохімія: практикум: Навч. посібник для студ. біол. спец. вищ. навч. закладів, які вивчають дисципліну "Біохімія" / М. Є. Кучеренко [и др.]. - К. : Либідь, 1995. - 151 с. - ISBN 5-325-00502-2
48. Біохімія. /М.Є.Кучеренко, Ю.Д.Бабенюк, О.М.Васильєв та ін./ К.:ВГЦ Київський університет, 2002, 480 с.
49. Biopolymer composites with high dielectric performance: interface engineering / K. Deshmukh та ін. *Biopolymer composites in electronics*. 2017. С. 27–128.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						119
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809261-3.00003-6> (дата звернення: 18.06.2023).

50. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against shigella species / Y.-W. In та ін. *Journal of food safety*. 2013. Т. 33, № 1. С. 79–85. URL: <https://doi.org/10.1111/jfs.12025> (дата звернення: 18.06.2023).

51. Evolutionary architecture of the infant-adapted group of Bifidobacterium species associated with the probiotic function / M.-J. Kwak та ін. *Systematic and applied microbiology*. 2016. Т. 39, № 7. С. 429–439. URL: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.07.004> (дата звернення: 18.06.2023).

52. Біологічна хімія. / Губський Ю.І. – Київ-Вінниця: Нова Книга, 2011. – 656 с

53. Novel phytases from bifidobacterium pseudocatenulatum ATCC 27919 and bifidobacterium longum subsp.infantisatcc 15697 / J. A. Tamayo-Ramos та ін. *Applied and environmental microbiology*. 2012. Т. 78, № 14. С. 5013–5015. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.00782-12> (дата звернення: 18.06.2023).

54. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health / A. Monteagudo-Mera та ін. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019. Т. 103, № 16. С. 6463–6472. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7> (дата звернення: 18.06.2023).

55. Treg-inducing capacity of genomic DNA of bifidobacterium longum subsp. infantis / D. Li та ін. *Allergy and asthma proceedings*. 2020. Т. 41, № 5. С. 372–385. URL: <https://doi.org/10.2500/aap.2020.41.200064> (дата звернення: 18.06.2023).

56. Indole-3-lactic acid, a metabolite of tryptophan, secreted by Bifidobacterium longum subspecies infantis is anti-inflammatory in the immature intestine / D. Meng та ін. *Pediatric research*. 2020. Т. 88, № 2. С. 209–217.

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						120
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

URL: <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0740-x> (дата звернення: 18.06.2023).

57. Anti-inflammatory effects of Bifidobacterium longum subsp infantis secretions on fetal human enterocytes are mediated by TLR-4 receptors / D. Meng та ін. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology*. 2016. Т. 311, № 4. С. G744–G753.

URL: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00090.2016> (дата звернення: 18.06.2023).

58. Bifidobacterium longum subsp. infantis S12. *BacDive | The Bacterial Diversity Metadatabase*. URL: <https://bacdive.dsmz.de/strain/1743> (дата звернення: 18.06.2023).

59. Phylogenetic, functional and safety features of 1950s B. infantis strains / S. Duboux та ін. *Microorganisms*. 2022. Т. 10, № 2. С. 203. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020203> (дата звернення: 18.06.2023).

60. ATCC® 15697™ | bifidobacterium longum subsp. infantis | ATCC genome portal. *ATCC Genome Portal*. URL: <https://genomes.atcc.org/genomes/35cfc86b47c94e86> (дата звернення: 18.06.2023).

61. Riboflavin Biosynthesis and Overproduction by a Derivative of the Human Gut Commensal Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 / A. Solopova та ін. *Frontiers in microbiology*. 2020. Т. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573335> (дата звернення: 18.06.2023).

62. Characterization of the genus bifidobacterium by automated ribotyping and 16S rrna gene sequences / S. Sakata та ін. *Microbiology and immunology*. 2006. Т. 50, № 1. С. 1–10. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03762.x> (дата звернення: 18.06.2023).

63. JoVE Science Education Database. Microbiology. 16S rRNA Sequencing: A PCR-based Technique to Identify Bacterial Species. JoVE, Cambridge, MA, (2023).

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						121
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

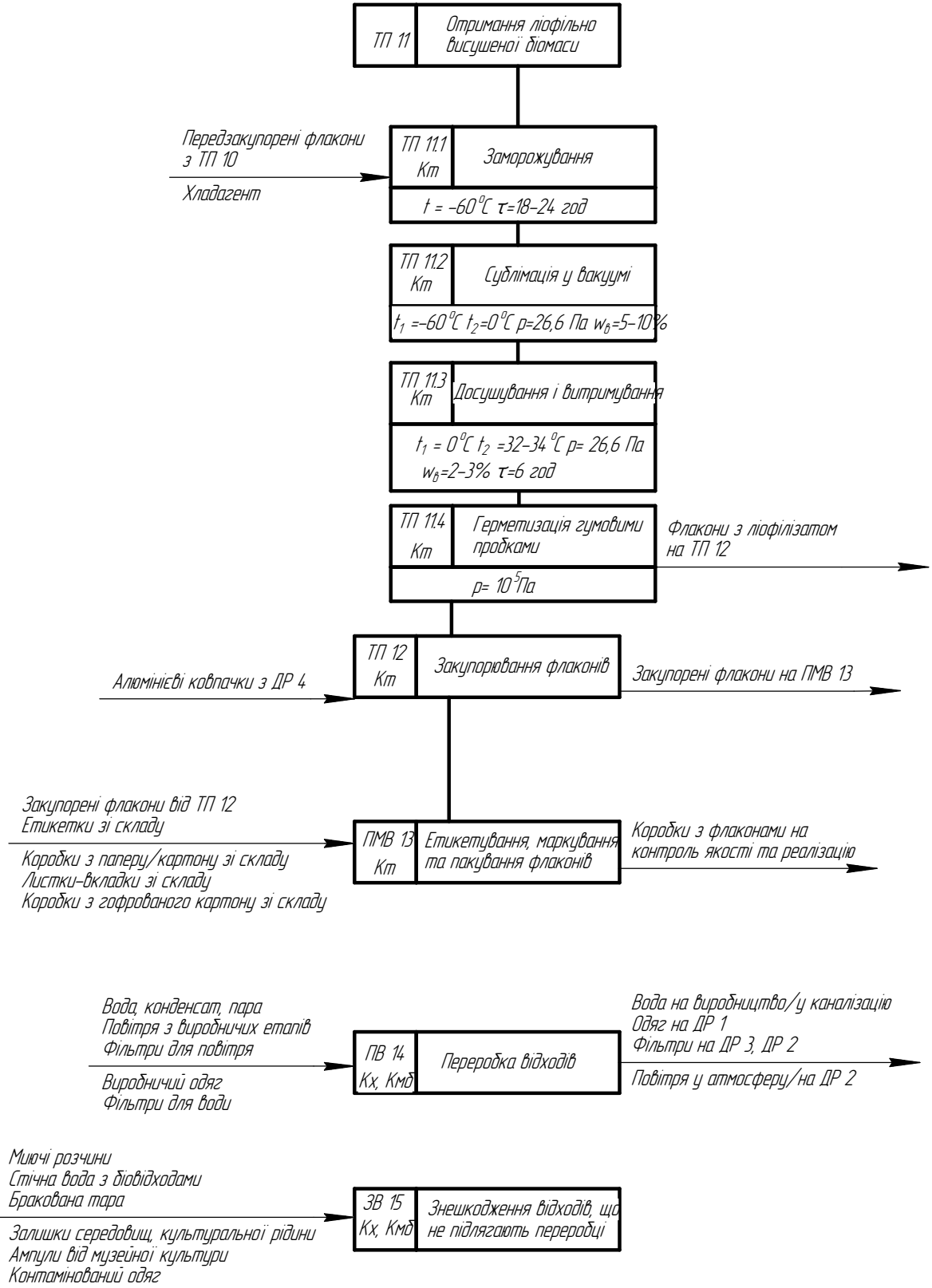
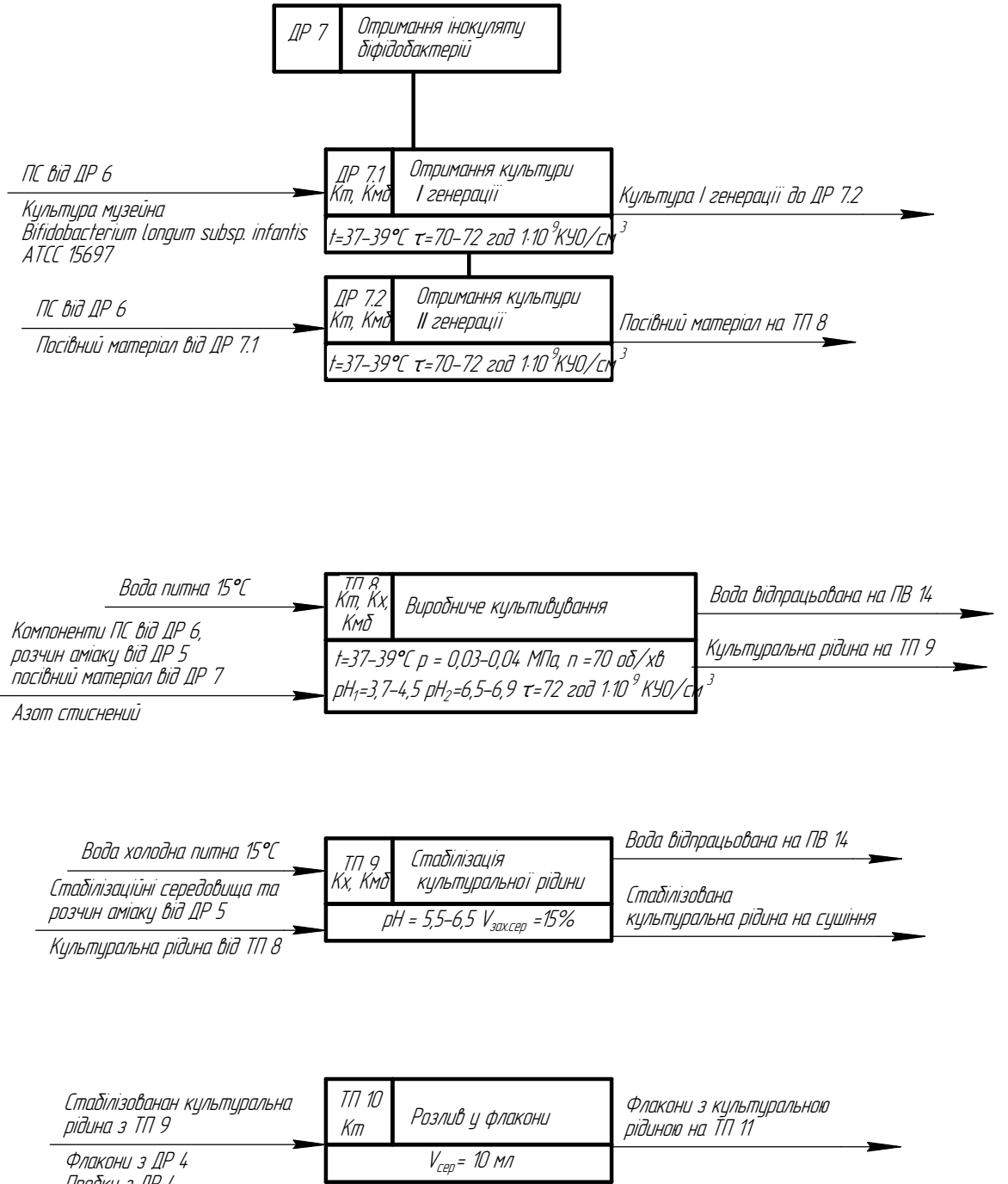
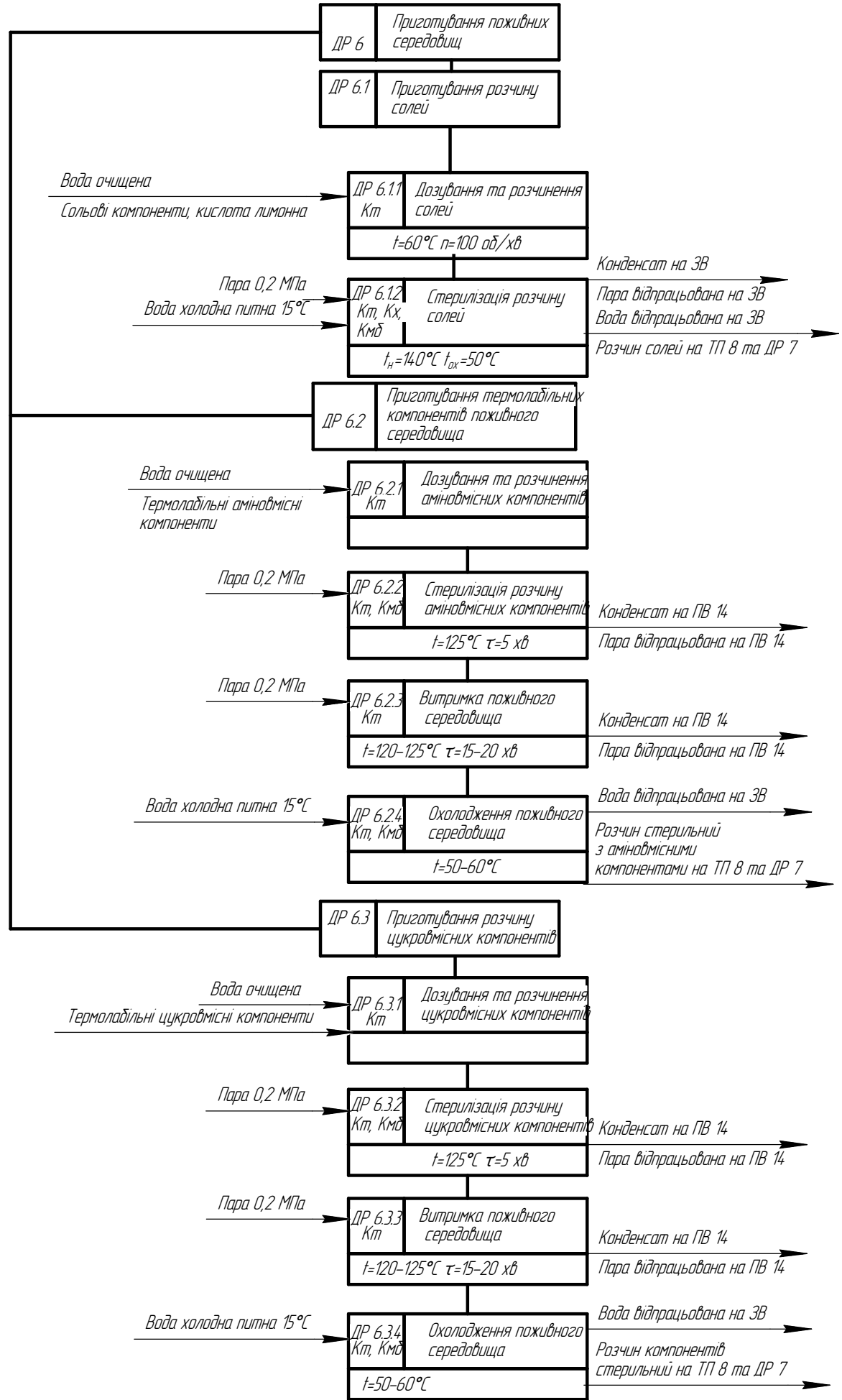
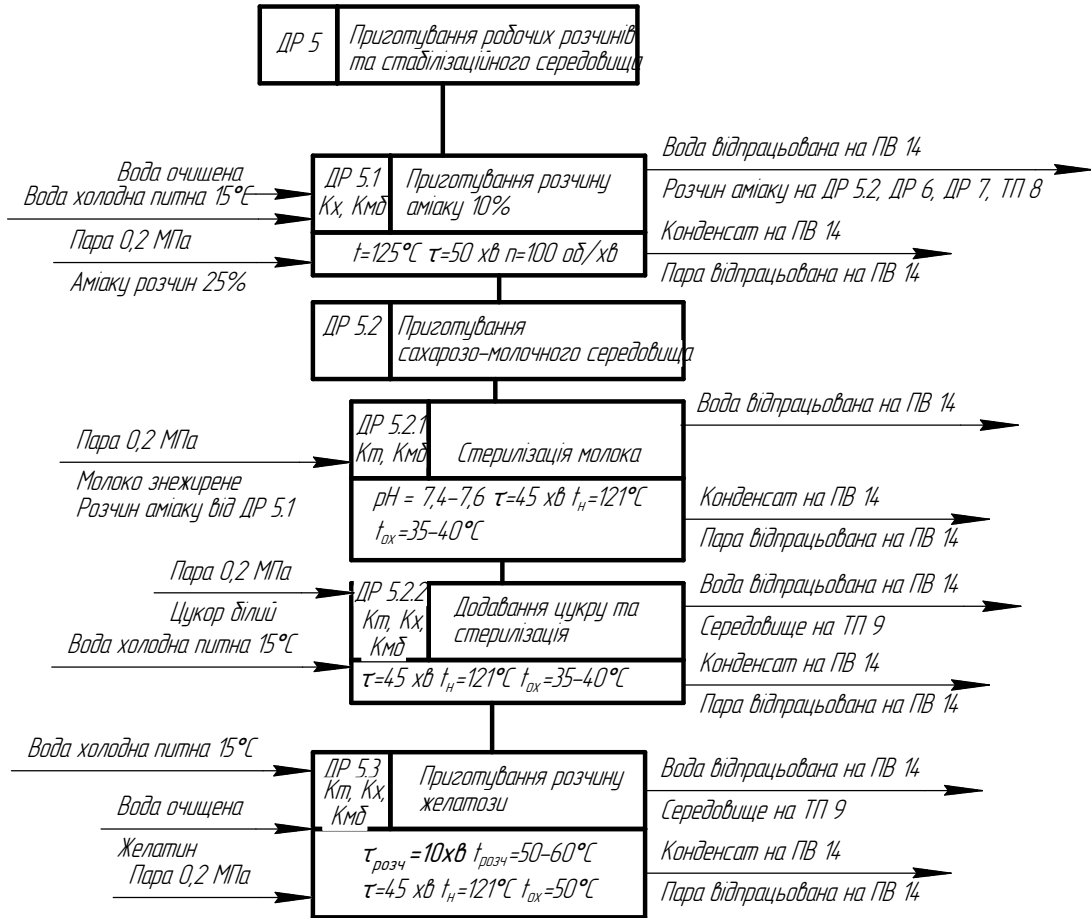
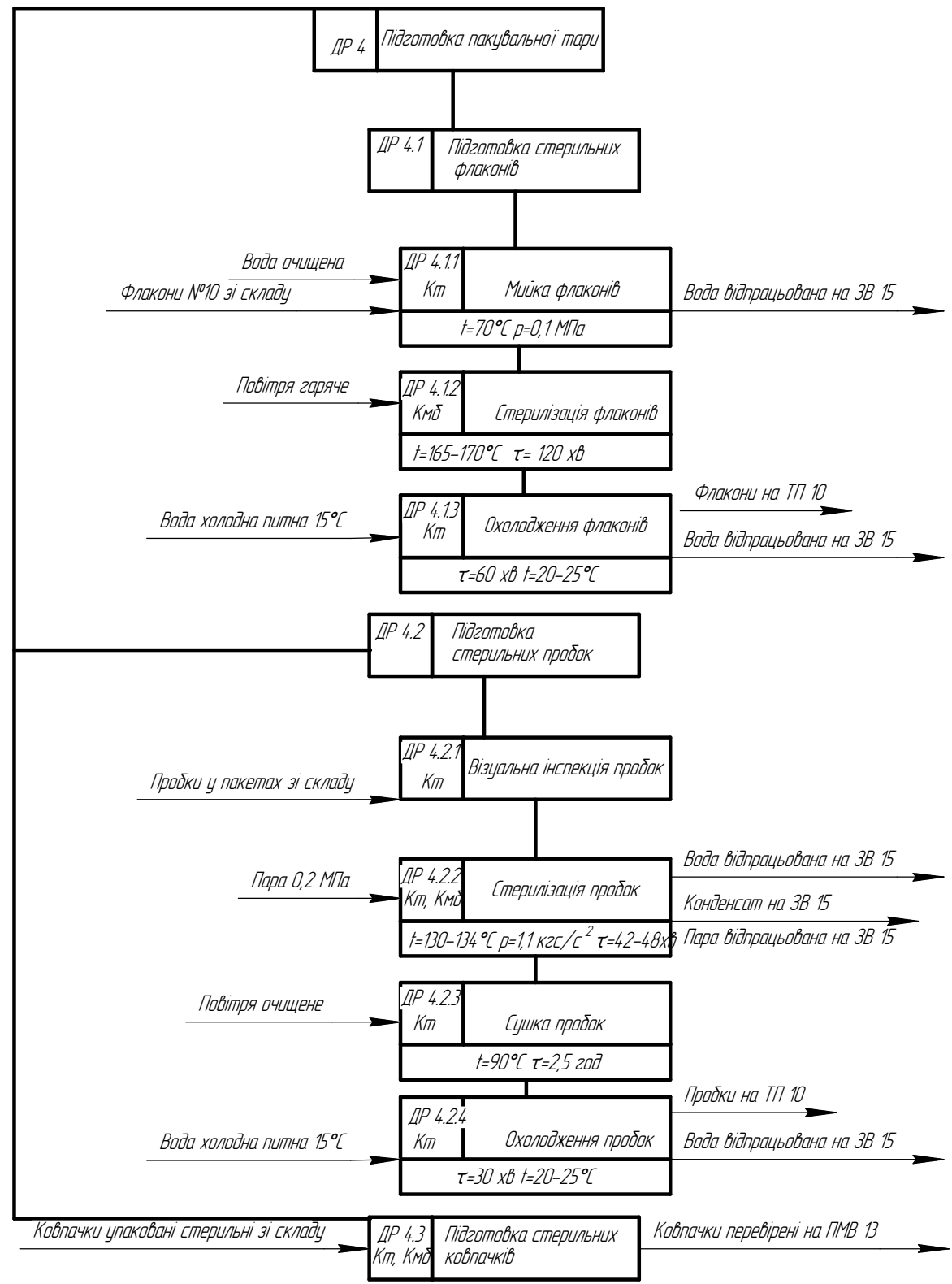
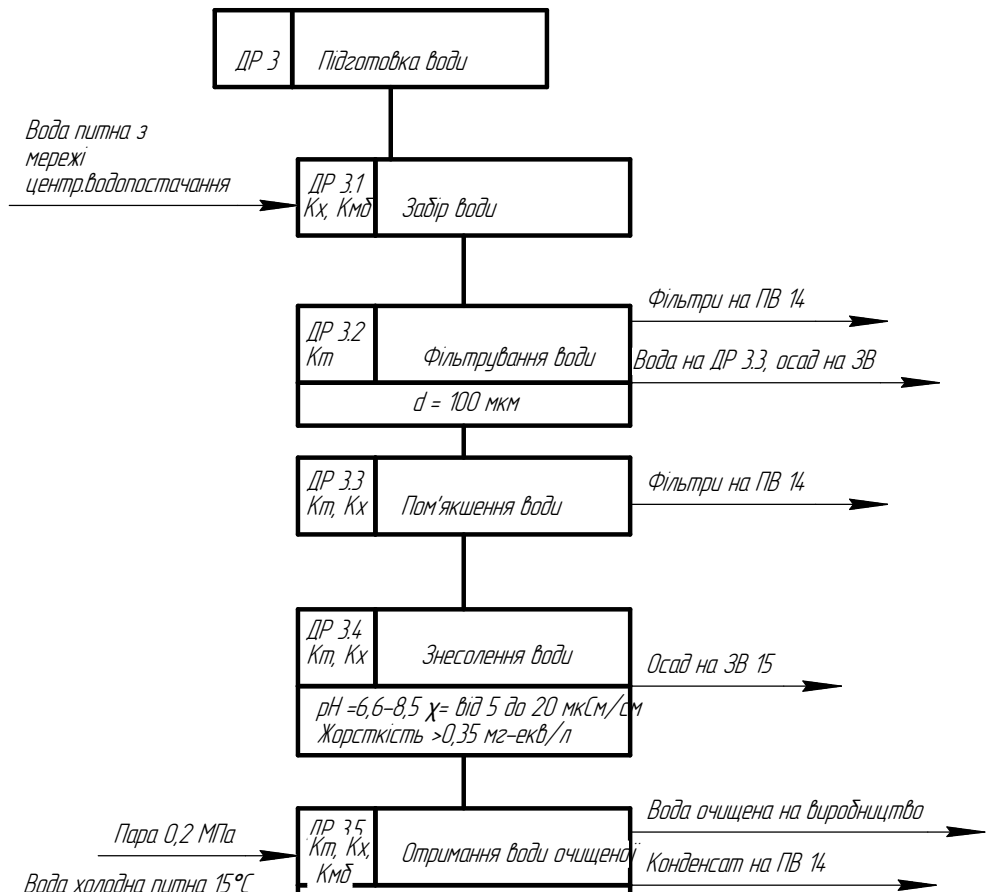
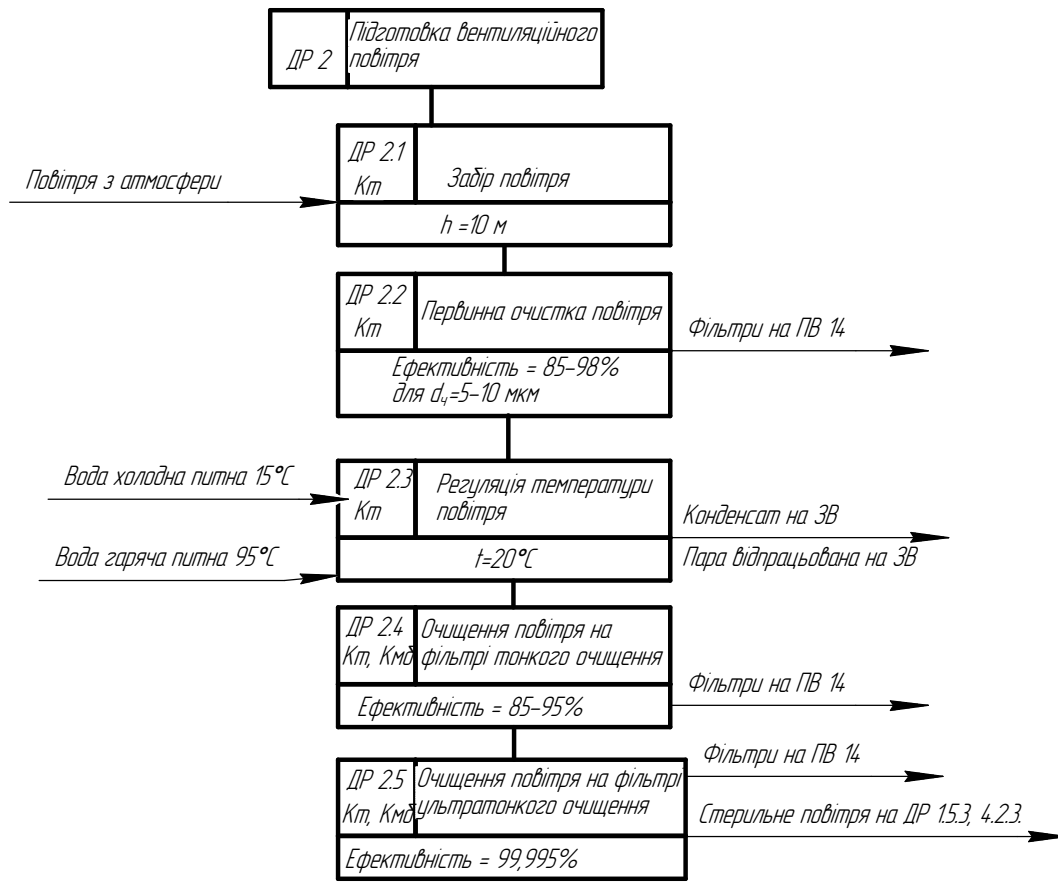
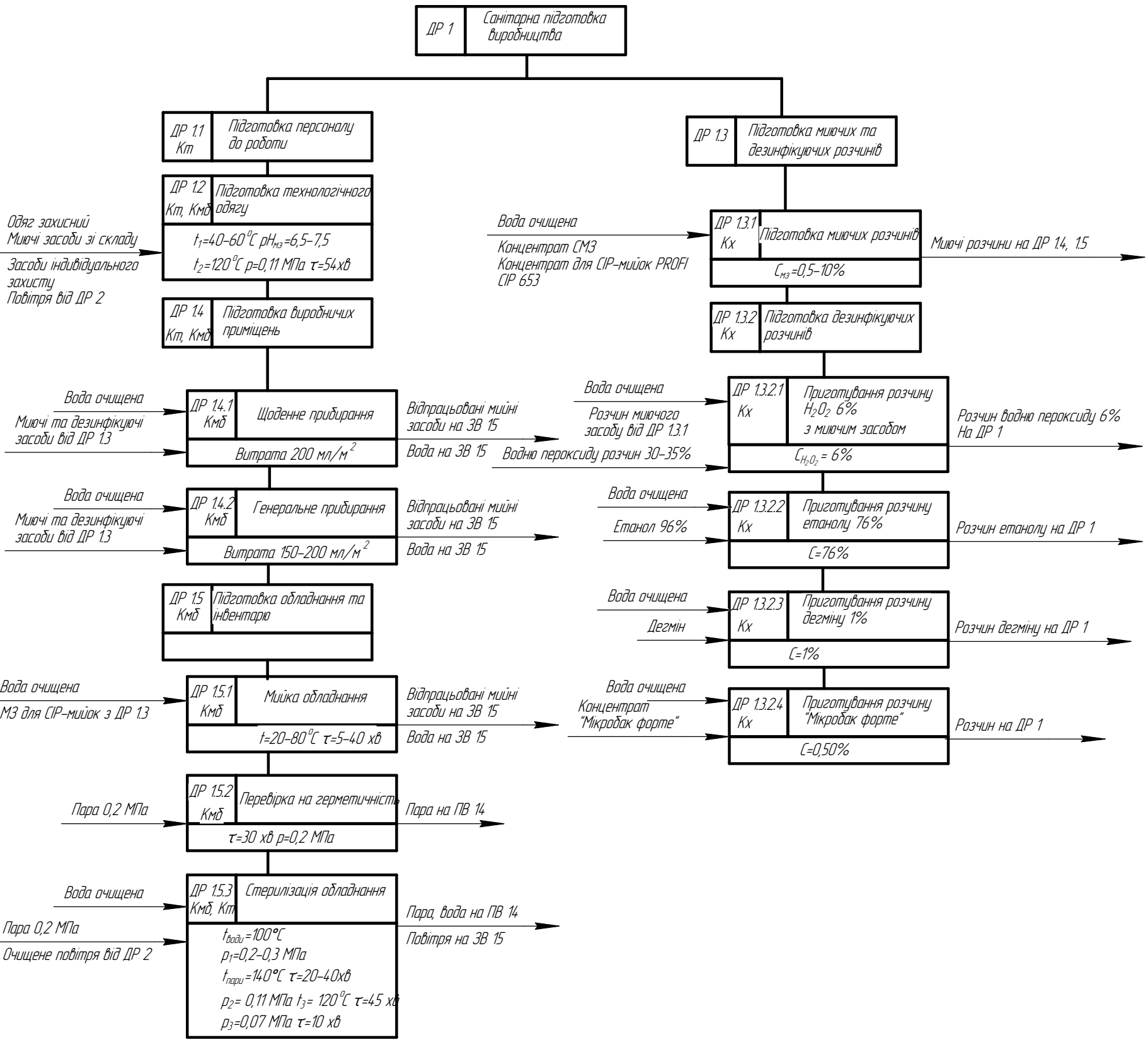
64. Біфідумбактерин порошок д/приг. р-ну по 5 доз №10 у флак. *tabletki.ua*.
65. Ензим | фармацевтика | біфідумбактерин. *Ензим - Завод мікробіологічного синтезу*. URL: <https://enzim.ua/index.php?page=bifidum&lng=uk> (дата звернення: 18.06.2023).
66. Біфідумбактерин порошок по 0,5 г №10. *tabletki.ua*.
67. Біфідобактерин ензифарм®. <https://enzipharm.com/>. URL: <https://enzipharm.com/bifidobakterin-enzifarm/> (дата звернення: 18.06.2023).
68. Про інформацію для споживачів щодо харчових продуктів : Закон України; Перелік, Вимоги від 06.12.2018 № 2639-VIII // База даних «Законодавство України» / Верховна Рада України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/go/2639-19> (дата звернення: 18.06.2023)
69. Про затвердження Гігієнічних вимог до дієтичних добавок : Наказ; МОЗ України від 19.12.2013 № 1114 // База даних «Законодавство України» / Верховна Рада України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/go/z2231-13> (дата звернення: 18.06.2023)
70. СТ-Н МОЗУ 42-3.4:2020 Лікарські засоби. Настанова з виробництва готових лікарських засобів
71. Cleanroom clothing: all you need to know. *Vietnamcleanroom - Thiết bị phòng sạch VCR*. URL: <https://vietnamcleanroom.com/en/post/cleanroom-clothing-all-you-need-to-know-890.htm> (дата звернення: 18.06.2023).
72. Laundering for cleanrooms - ECJ. *European Cleaning Journal – The Industrial Cleaning Magazine* - ECJ. URL: <http://www.europeancleaningjournal.com/magazine/articles/case-studies/laundry-for-cleanrooms> (дата звернення: 18.06.2023).
73. Купити Миючий засіб для СІР мийок лужний PROFI СІР 653 - 10L за ціною 1 165 грн. від виробника. *BioGreen*. URL: <https://biogreen.com.ua/proficlean-ua/mijuchij-zasib-dlja-cip-mijok-luzhnij-profi-cip-653-10l-r000039-ua> (дата звернення: 18.06.2023).

					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						122
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

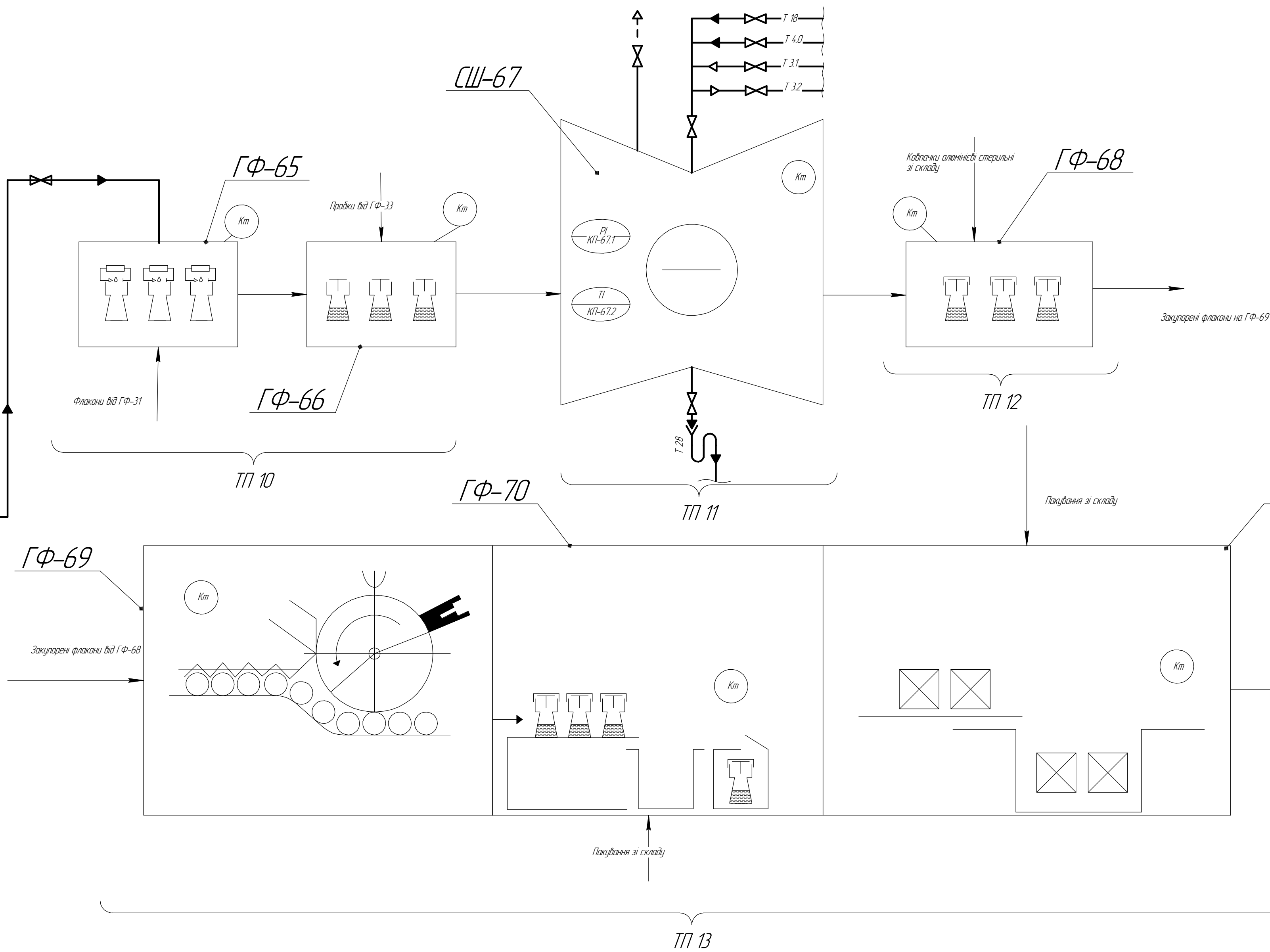
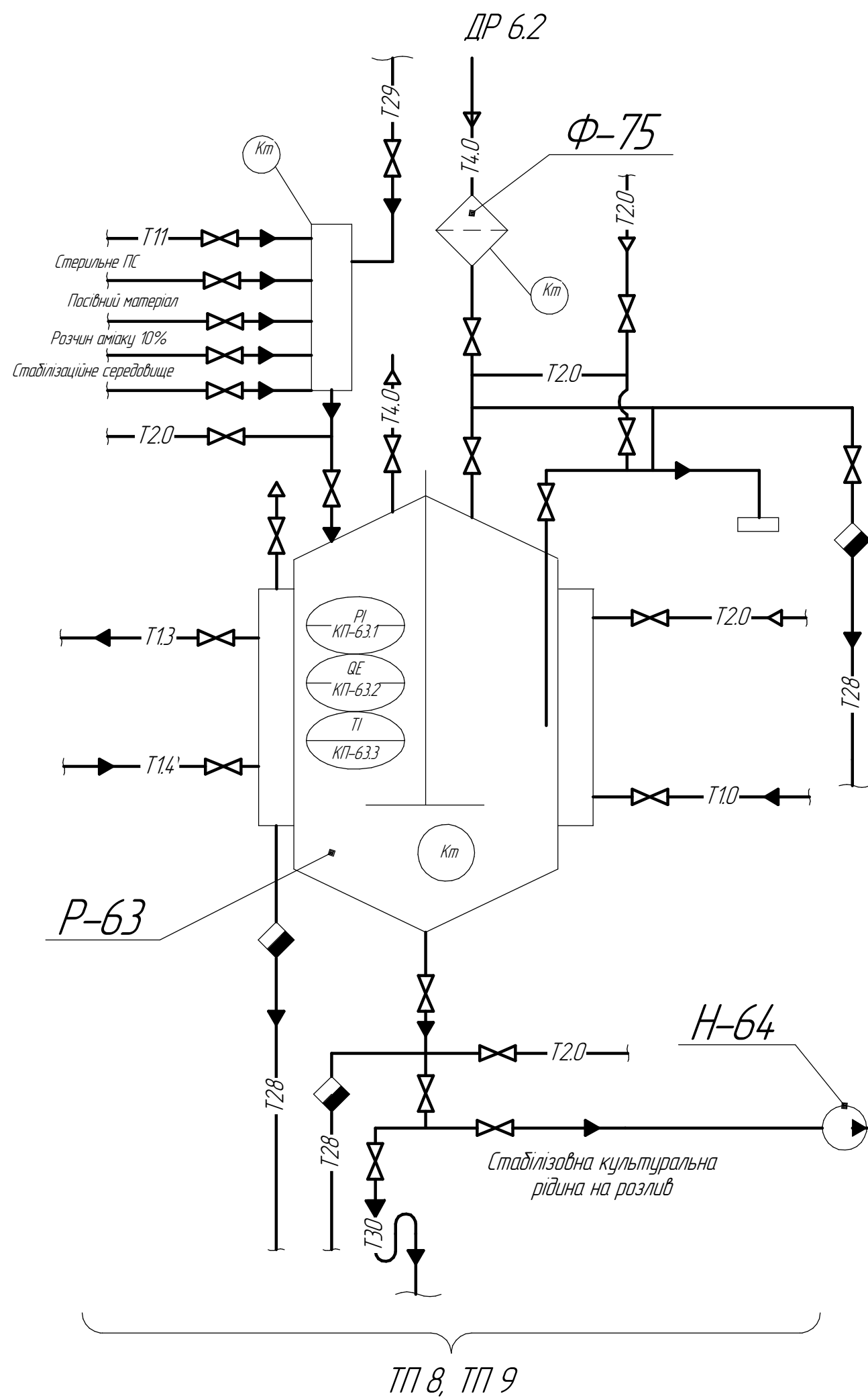
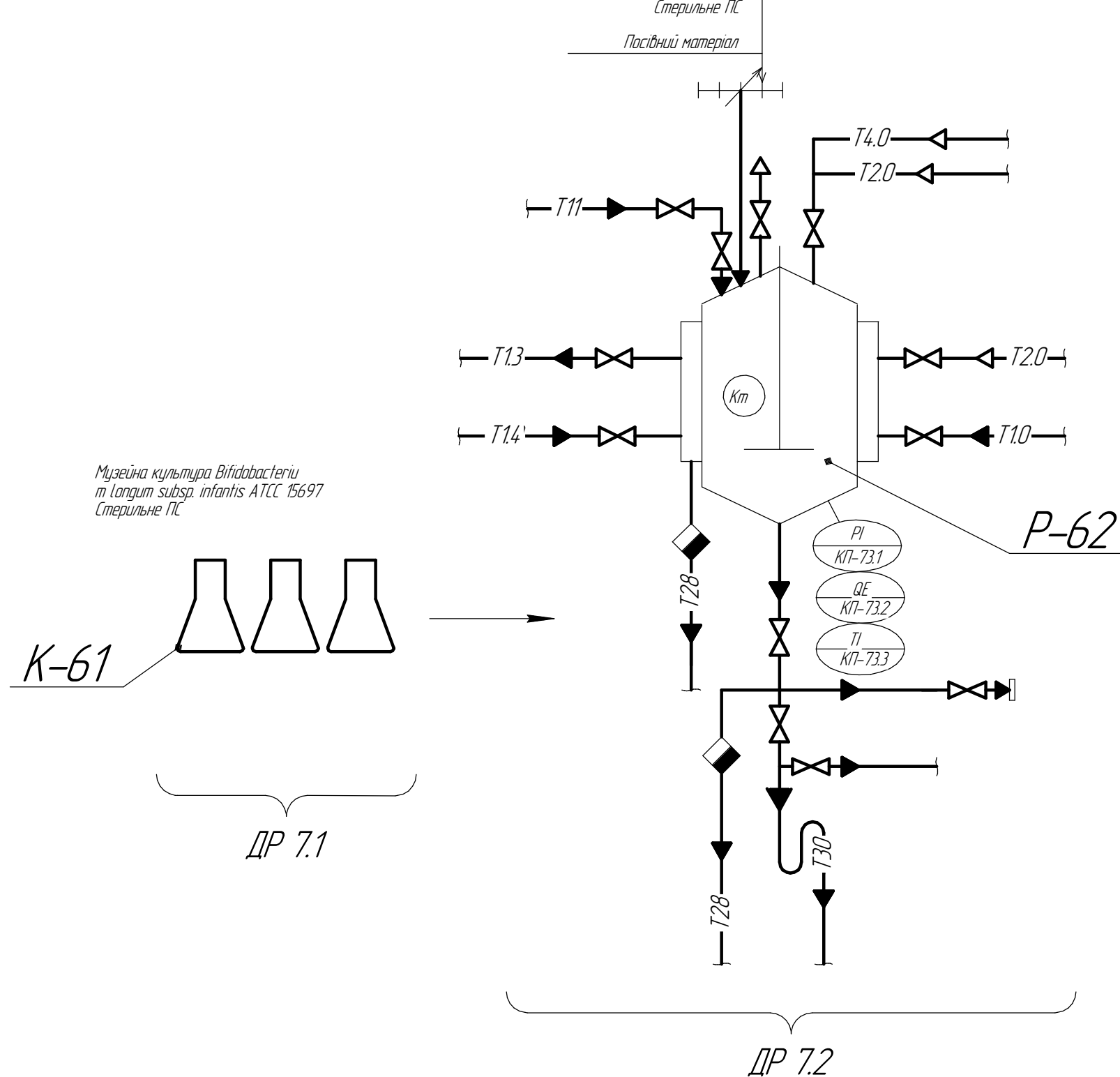
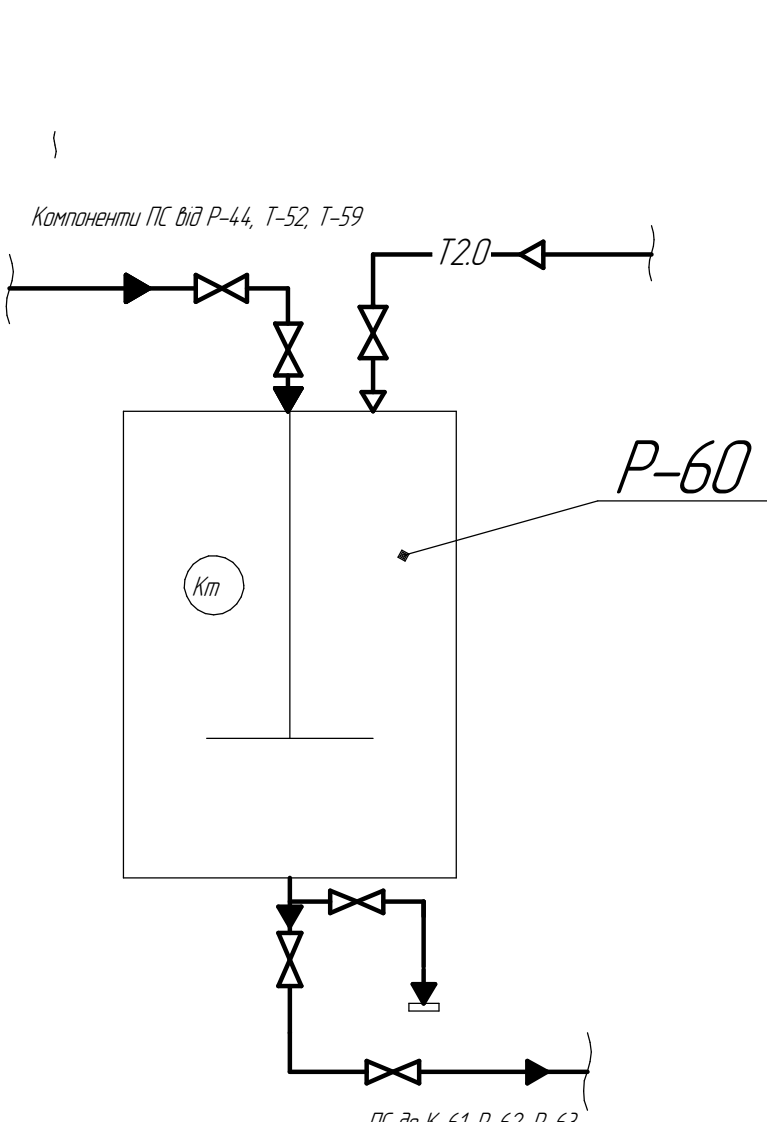
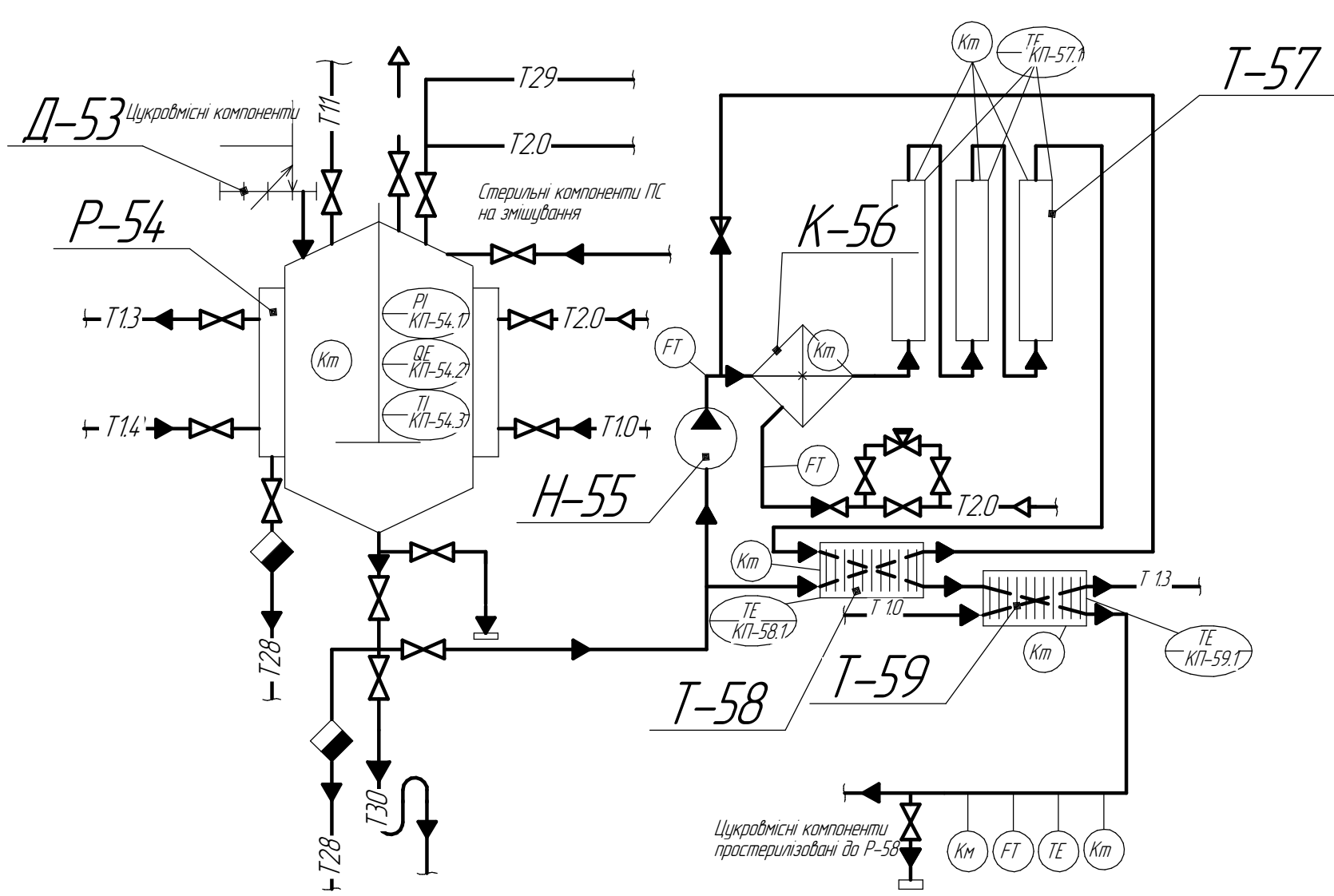
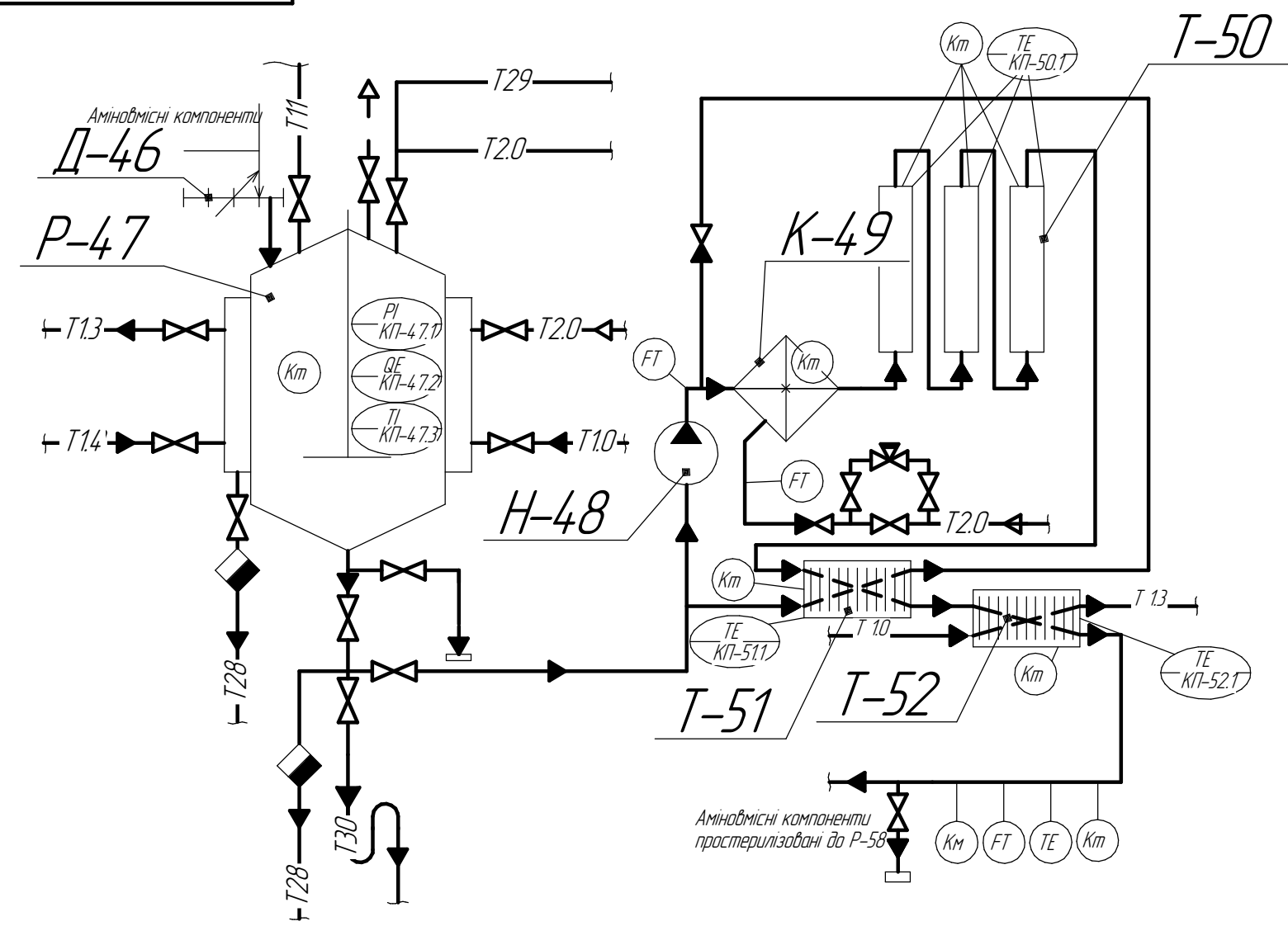
74. СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2015 «Вимоги до виготовлення стерильних та асептичних лікарських засобів в умовах аптек»
75. Filter Classes according EN 779 and EN 1822 - Quick Overview. EMW filtertechnik. URL: <https://www.emw.de/en/filter-campus/filter-classes.html> (дата звернення: 18.06.2023).
76. Comparative Guide to Norms for the Classification of Air Filters - Venfilter. Venfilter. URL: <https://www.venfilter.es/en/normative/comparative-guide-to-norms-for-the-classification-of-air-filters/> (дата звернення: 18.06.2023).
77. Загальна мікробіологія та вірусологія. Лабораторний практикум [Електронне видання] : навч. посіб. для здобувачів ступеня бакалавра за освітньою програмою «Біотехнології» спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад. : Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, Л. О. Тітова.
78. Liquid vial filling » syntegon. *Processing and packaging solutions* » Syntegon. URL: <https://www.syntegon.com/solution-finder/pharma/liquid-vial-filling/> (дата звернення: 18.06.2023).
79. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols / ред.: W. F. Wolkers, H. Oldenhof. New York, NY : Springer US, 2021. URL: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1> (дата звернення: 18.06.2023).
80. Резенчук, О. Є. Класифікація та аналіз роботи ферментерів з пневматичним перемішуванням / О. Є. Резенчук, В. М. Поводзинський, В. Ю. Шибєцький // Наукові вісті НТУУ «КПІ» : міжнародний науково-технічний журнал. – 2011. – №3(77). – С. 79-84. – Бібліогр.: 7 назв.
81. Закоморний Д. М. Класифікація ферментерів з механічно рухомими конструкціями перемішувачів пристроїв / Д. М. Закоморний, В. М. Поводзинський // Збірник тез доповідей IV Міжнародної науково-технічної конференції молодих учених та студентів „Актуальні задачі сучасних технологій“, 25-26 листопада 2015 року — Т. : ТНТУ, 2015 — Том 1. — С. 15. — (Фізико-технічні основи розвитку нових технологій).

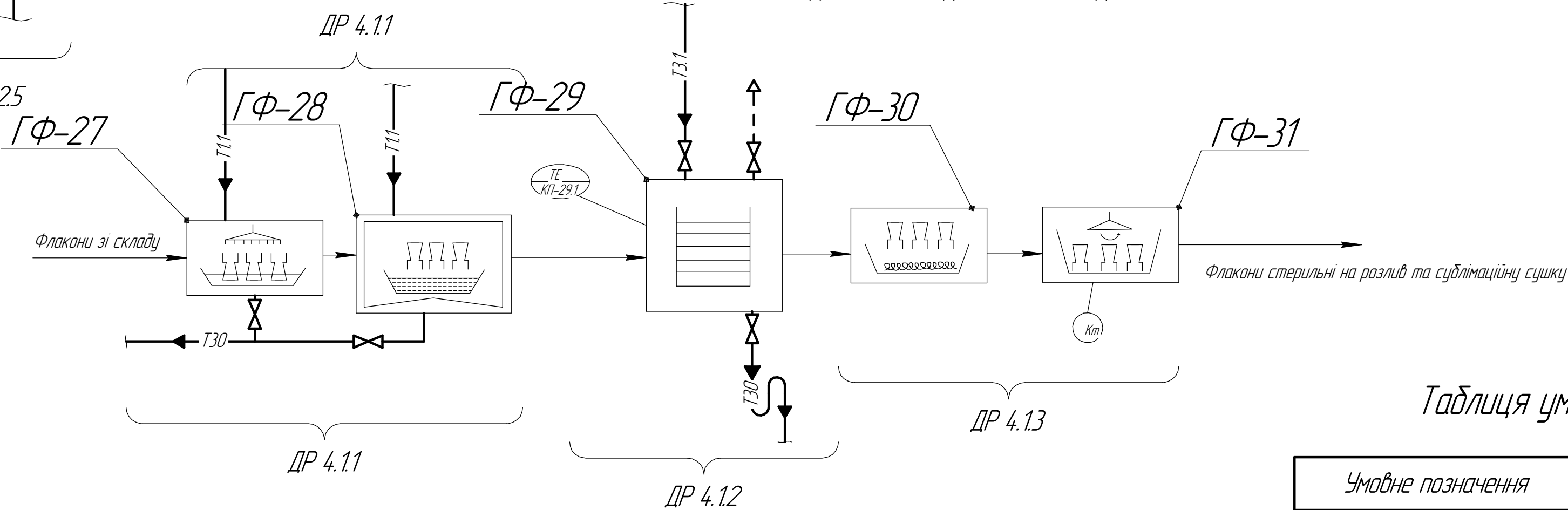
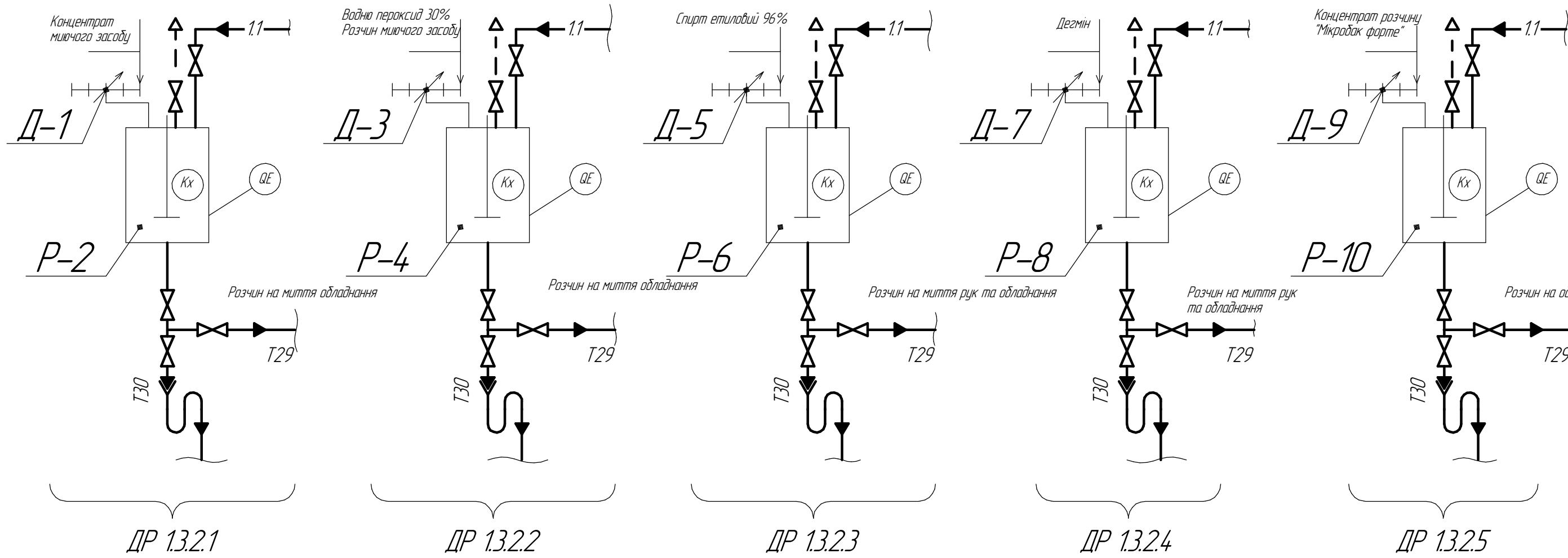
					ДП БТ-9210.00.000 ПЗ	Арк.
						123
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

82. Industrial-scale bioreactor 1000-5000L - Sysbiotech. Sysbiotech.
URL: <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-1000-5000l/> (дата
звернення: 18.06.2023).
83. Ружинська Л.І. Проектування реакторів біотехнологічних та
фармацевтичних виробництв. Навч. посібник/ Укладачі: Л.І. Ружинська, І А
Буртна, В.М.Поводзинський, В.Ю. Шибєцький – К.: НТУУ «КПІ», 2014 –
130с.
84. Бакалаврський дипломний проєкт. Організація виконання та захисту,
вимоги до структури, змісту та оформлення [Електронний ресурс]: навч.
посіб. для здобувачів ступеня бакалавра за освітньою програмою
«Біотехнології» спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія / КПІ ім.
Ігоря Сікорського; уклад.: Т. С. Тодосійчук, В. Ю. Поліщук, Л. Б.
Орябінська, І. Р. Клечак, Л. І. Ружинська ; КПІ ім. Ігоря Сікорського.
85. ГОСТ 31833-2012 Оборудование для микробиологических производств.
Аппараты для гидролиза растительного сырья. Ферментаторы.
86. Good manufacturing practice for manufacturers of food
supplements. <https://foodsupplementseurope.org/>.
URL: <https://foodsupplementseurope.org/publications-guidelines/> (дата
звернення: 18.06.2023).



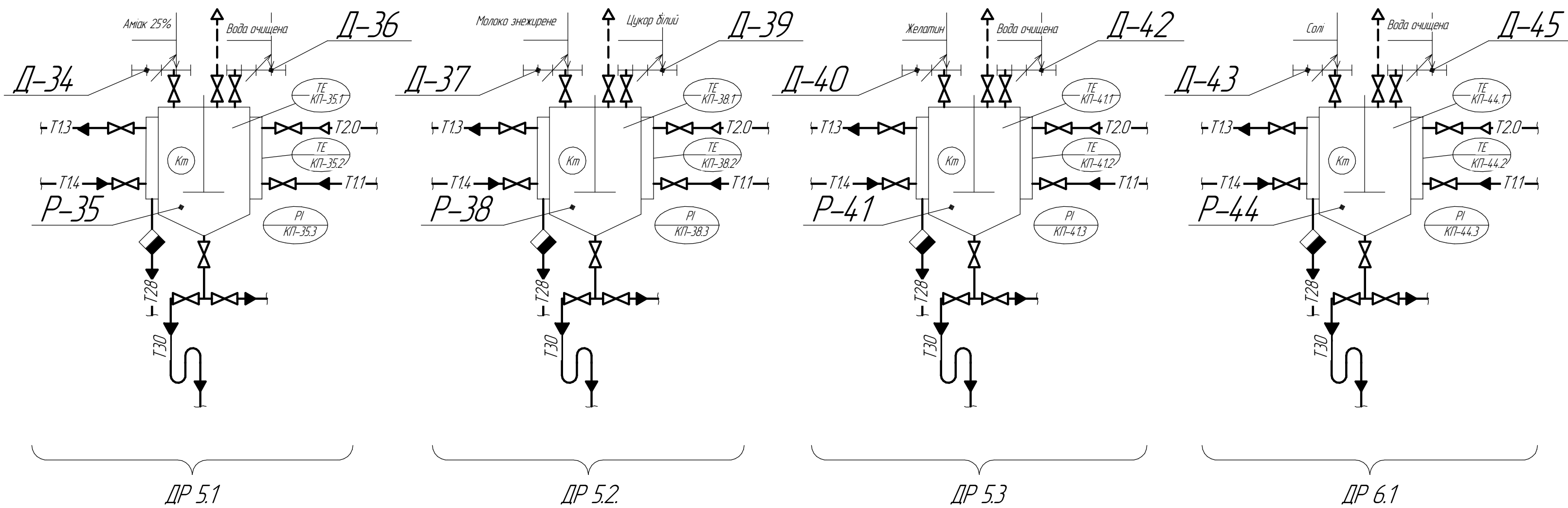
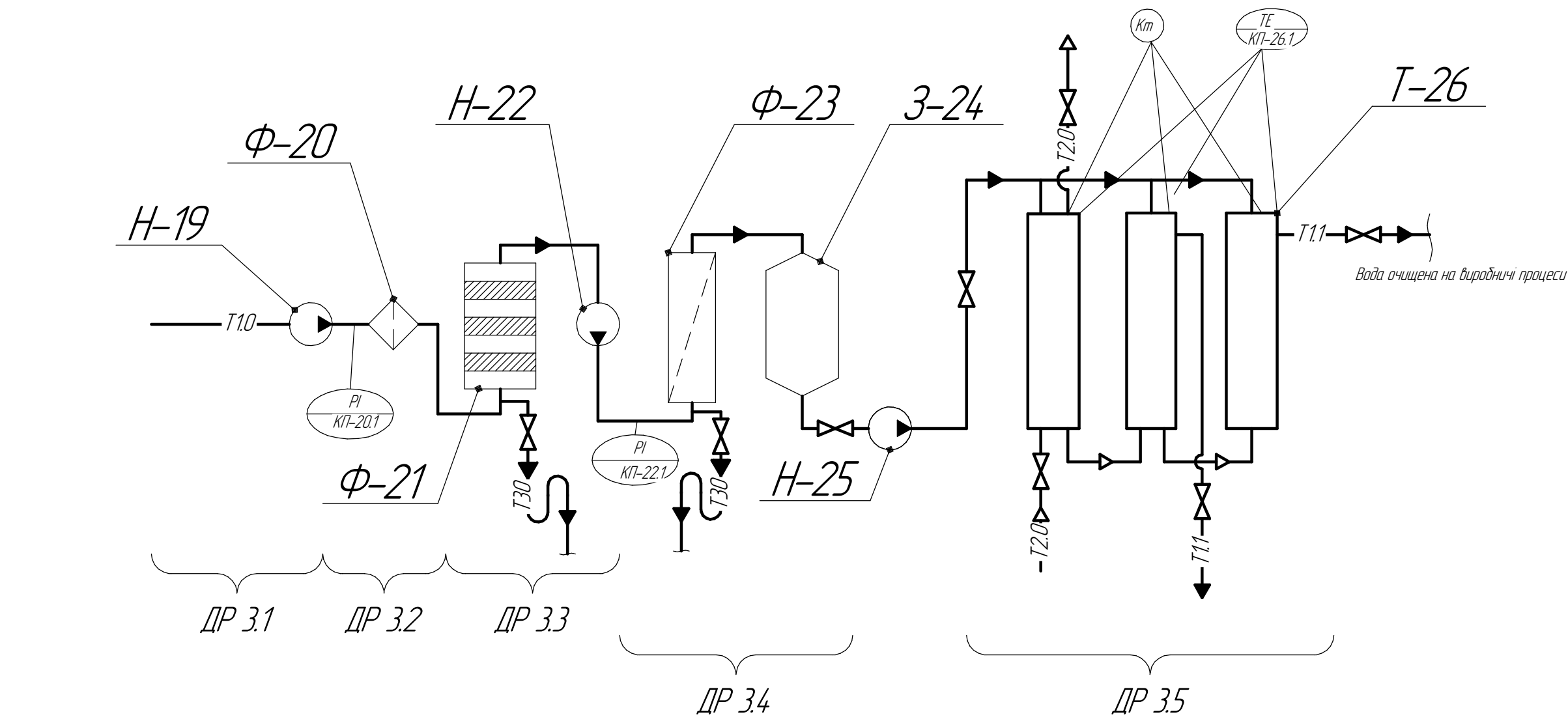
ДЛ 51-9210. 01000 ТС				
Технологія виробництва дієтичної добавки на основі пробіотичного штамму <i>Bifidobacterium longum</i> Дієтна біосистема				
Розроб.	Карпенко Ю.О.	Склад.	Архив.	Архив.
Конс.	Шидецький В.Ю.	Д.	1	1
Конс.	Литвинов Г.С.	КП ім. Іззара Сікарського ФБТ		
Затв.				





Таблиця умовних позначень

Умовне позначення		Найменування середовища у трубопроводі
Лит.	Графічне	
T1.0		Вода питна
T1.1		Вода очищена
T1.3		Вода відпрацьована
T1.4		Вода питна гаряча 95°C
T2.0		Пара насичена 0,2 МПа
T2.1		Пара відпрацьована
T3.0		Повітря
T3.1		Повітря стерильне
T3.2		Повітря відпрацьоване
T4.0		Азот
T4.1		Азот відпрацьований
T1.1		Аміак 10%
T1.8		Фреон
T2.8		Конденсат
T2.9		Дезинфікуючий розчин
T3.0		Рідкі відходи



Перелік елементів схеми

Позначення	Найменування	К-ть	Примітка
P	Реактори	14	
З	Збірники	1	
T	Теплообмінні апарати	3	
Ф	Фільтрувальна апаратура	9	
СШ	Сушарка	1	
К	Колонка нагрівна	3	
Н	Насоси	6	
ГФ	Обладнання для підготовки тари та пакування	13	
В	Вентилятори	2	

ДП 5Т-9210.02.000 АС				Технологія виробництва дієтичної добавки на основі пробіотичного штаму <i>Bifidobacterium longum</i> . Дієтна біосистема		
Розроб.	Позначення	Підпис	Дата	Стаття	Аркш.	Аркш.
Конс.	Карпенко Ч.О.			Д	1	2
Конс.	Шидецький В.Ю.			Апаратурна схема виробництва дієтичної добавки		
Керівн.	Литвинов Г.С.					
Затв.				КПІ ім. Іззара Сікарського ФБТ		
Копія				Формат А1		

