

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___»_____2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва біфідумбактерину у флаконах.

Дільниця підготовки поживного середовища»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Шевченко Дарина Анатоліївна _____

Керівник:

доцент каф. промислової біотехнології, к.б.н., с.н.с.

Яловенко Олена Ігорівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

асистент каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Зубченко Людмила Сергіївна _____

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

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 6220. 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Шевченко Д.А.				1	1
Керівн.	Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

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

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студентці

Шевченко Дарині Анатоліївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва біфідумбактерину у флаконах. Дільниця підготовки поживного середовища», керівник проєкту Яловенко Олена Ігорівна, к.б.н., доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Bifidobacterium bifidum* №1; середовище культивування - Біфідум; ферментер для промислового культивування - об'єм 750 л; параметри культивування: $t = 38 \pm 1$ °C, pH 6,8—7,3, $\tau = 10-16$ год; кінцевий продукт – розфасована у флакони ліофільно висушена мікробна маса живих біфідобактерій для фармацевтичної промисловості.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва пробіотичного препарату біфідумбактерину; 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 реактору зі змішувачем для приготування поживного середовища, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду реактору зі змішувачем – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.04.20-14.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	01.04.20-14.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	01.04.20-14.04.20	
4.	Технологічна частина	14.04.20-22.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	14.04.20-22.04.20	
6.	Охорона праці	28.04.20-15.05.20	
7.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	28.04.20-15.05.20	
8.	Подання дипломного проекту до експертної комісії	30.05.20-08.06.20	

Студент

Дарина Шевченко

Керівник

Олена Яловенко

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва біфідумбактерину у
флаконах. Дільниця підготовки поживного середовища»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить 117 с., 10 рис., 5 табл., 71 посилань.

Робота присвячена розробці технології виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину та дільниці підготовки поживного середовища.

Запропоновано в якості продуцента пробіотику використовувати штам біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum* №1, так як зазначений штами володіє вираженими пробіотичними властивостями, проявляє резистентність до антибіотиків, антагоністичний по відношенню до ряду патогенних бактерій.

В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схема виробництва Біфідумбактерину. Розраховано та вибрано найбільш ефективне та перспективне обладнання для підготовки поживного середовища. Наведено технологічний та конструктивний розрахунки реактору зі змішувачем.

Розроблена технологія повністю відповідає санітарно-гігієнічним та екологічним нормам, наведено техніку безпеки та охорону праці.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ПРОБІОТИЧНИЙ ПРЕПАРАТ, БІФІДУМБАКТЕРИН, BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM №1, АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ, ДИСБАКТЕРІОЗ ШКТ, ПІДГОТОВКА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА, РЕАКТОР ЗІ ЗМІШУВАЧЕМ.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РЕФЕРАТ		
Розробив		Шевченко Д.А.					
Консульт.							
Керівник		Яловенко			КПІ ім. Ігоря		
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	5	117

	<i>О.І.</i>				
<i>Затвер.</i>					<i>Сікорського ФБТ</i>

ABSTRAKT

Das Diplomprojekt umfasst 117 Seiten, 10 Bilder, 5 Tabellen, 71 Referenzen.

Die Arbeit widmet sich der Entwicklung der Produktionstechnologie des probiotischen Präparats Bifidumbacterin und der Herstellung des Nährmediums.

Es wird vorgeschlagen, einen Stamm von Bifidobakterien *Bifidobacterium bifidum* Nr. 1 als Hersteller eines Probiotikums zu verwenden, da dieser Stamm ausgeprägte probiotische Eigenschaften aufweist und eine Antibiotikaresistenz aufweist, einer Reihe pathogener Bakterien entgegenwirkt.

Das Papier begründet und präsentiert die technologischen und Ausrüstungsschemata für die Herstellung von Bifidumbacterin. Die effektivste und vielversprechendste Ausrüstung zur Herstellung des Nährmediums wurde berechnet und ausgewählt. Es werden technologische und konstruktive Berechnungen eines Reaktors mit einem Mischer gegeben.

Die entwickelte Technologie entspricht vollständig den Hygiene- und Umweltstandards, Sicherheitsmaßnahmen und Arbeitsschutz werden vorgestellt.

SCHLÜSSELWÖRTER: PROBIOTISCHES ARZNEIMITTEL, BIFIDUMBACTERIN, BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM Nr. 1, ANTAGONISTISCHE AKTIVITÄT, DYSSBAKTERIOSE, PRÄPARATION NÄHRMEDIUMS, REAKTOR MIT MISCHER.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		6

ЗМІСТ

ВСТУП	9
РОЗДІЛ I. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	12
1.1. Основні промислові продуценти	12
1.2. Систематичне положення	14
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки.....	14
1.4. Культуральні ознаки	15
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	17
1.6. Поширення в природі.....	21
РОЗДІЛ II. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	22
2.1. Характеристика кінцевого продукту	22
2.2. Схема хімічних перетворень.....	23
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	27
2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси...29	
РОЗДІЛ III. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ ..	32
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	32
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму	35
3.3. Схема отримання продуценту, що використовується в роботі.....	41
РОЗДІЛ IV. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	47
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	47
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	51
4.3. Опис технологічного процесу	55
4.4. Матеріальний баланс	77

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи с</i>	<i>Дат</i>			
<i>Розробив</i>	<i>Шевченко Д.А.</i>						
<i>Консульт.</i>							
					<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
					<i>Д</i>	<i>7</i>	<i>117</i>

Керівник	Яловенко О.І.		
Затвер.			

ЗМІСТ

*Сікорського
ФБТ*

4.5. Контроль виробництва.....	80
РОЗДІЛ V. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ	
ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	86
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарат	86
5.2. Розрахунки, що підтверджують працездатність та надійність конструкції	91
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	104
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	106
ВИСНОВКИ.....	109
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	111

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						8
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

ВСТУП

Усе життя макроорганізму супроводжується дією на нього цілого комплексу шкідливих факторів, які несуть негативний вплив на основні систем його життєдіяльності, а саме на їх нормальне функціонування. В першу чергу, вплив екологічних факторів, які з кожним роком погіршуються, збільшення кількості стресових ситуацій, нераціональне харчування, гострі і хронічні кишкові інфекції. По-друге, безконтрольне масове вживання хіміотерапевтичних препаратів, у тому числі антибіотиків [1]. Саме вони здійснили найістотніший внесок у статистику сучасної захворюваності.

Усі вищезазначені шкідливі фактори призводять до пригнічення адаптаційних можливостей організму, активують процеси симпато-адреналової системи, що, в свою чергу, обумовлює нейрогуморальні зміни за рахунок дисбалансу продукування наступних нейромедіаторів: серотонін, дофамін, норадреналін, гістамін та інших. Всі перераховані речовини, крім своїх основних функцій (контролюють роботу шлунково-кишкового тракту, «відповідають» за рухову активність, м'язовий тонус, концентрацію уваги, емоцій, сну, здійснюють контроль настрою, апетиту, болю тощо) також впливають і на внутрішню нормальну мікрофлору, яка населяє організм. Отож чимало зміни стану здоров'я людини або психоемоційного стану відображаються на мікрофлорі [2,3].

В результаті порушень мікрофлори постійно виникають питання про способи підтримання її сталості та відновлення її оптимального рівня функціонування в організмі людини. З цієї причини, бактеріальні препарати на основі представників облігатної (основна, складає 95-99% від загальної кількості бактерій в організмі, це найбільш розповсюджені і корисні симбіонти людини) й факультативної (додаткова, концентрація цих бактерій

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Шевченко Д.А.</i>			<i>ВСТУП</i>		
<i>Консульт.</i>							
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>					
					<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
					<i>Д</i>	<i>9</i>	<i>117</i>
					<i>КПІ ім. Ігоря</i>		

Затвер.						Сікорського ФБТ
---------	--	--	--	--	--	--------------------

не перевищує 5%) мікрофлори господаря – пробіотики – все частіше використовуються в практиці охорони здоров'я [1, 4].

Основною проблемою використання пробіотичних препаратів на даний час є втрата частини мікробних клітин та їх метаболітів на етапі проходження через природні бар'єри (слизова оболонки шлунково-кишкового тракту та печінка) та можливості їх адгезії та колонізації у ШКТ. Мікробні клітини інактивуються також при виготовленні та подальшому зберіганні пробіотичних препаратів.

Пробіотики на основі біфідобактерій – одні з високоефективних і необхідних організму препаратів, бо ці мікроорганізми є найважливішими представниками нормальної мікрофлори людини, як за чисельністю, так і за їх поліфункціональною роллю. Більша їх частина міститься у товстому кишечнику. Біфідобактерії потрапляють до організму з перших годин життя та становлять до 80 - 90% м/о кишечника новонародженого.

Важливою проблемою є те, що в Україні понад 70% фармацевтичного ринку в галузі пробіотиків на основі біфідобактерій займають іноземні фірми, а 30% – вітчизняні виробники і це завдає відчутного удару по фінансовій складовій України [5].

Актуальність даної теми пов'язана з тим, що у всьому світі біологічні бактеріальні препарати позитивно зарекомендували себе у якості засобів профілактики та лікування дисбактеріозу ШКТ. Але в останні роки ефект від їх застосування значно знизився, спостерігається нестабільність результатів лікування та профілактики. З огляду на це особливої актуальності набуває розробка пробіотичних препаратів покращеної якості для корекції порушень мікрофлори, що слугуватиме досить ефективним, доступним та поширеним методом на сьогодні.

Враховуючи вищесказане, **метою** даної роботи є розробка вдосконаленої та економічної технології виробництва для забезпечення фармацевтичної промисловості високоякісним пробіотичним препаратом.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		10

Для досягнення поставленої мети доцільно є вирішення наступних завдань:

1. Встановити особливості обраного продуценту для виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину.
2. Проаналізувати методи створення високопродуктивних промислових продуцентів.
3. Обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті.
4. Визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту для розробки способу його отримання та обрання технології виробництва пробіотику;
5. Розробити технологічну і апаратурну схеми виробництва;
6. Обґрунтувати вибір конструкції для приготування поживних середовищ та здійснити її технологічний та конструктивний розрахунки.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Пробіотичні препарати - це препарати на основі живих мікроорганізмів та речовини мікробного походження, які за природного способу введення, позитивно впливають на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму хазяїна (людини або тварини) внаслідок оптимізації та стабілізації його мікробіоти [6].

Висновок, опублікований спільно Комітетом ООН з продовольчих питань і сільського виробництва (FAO) і Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO), визначив основні вимоги до пробіотичних мікроорганізмів:

- штами, що пропонуються для виробництва пробіотиків, мають бути виділені від здорових людей або видів тварин, для яких вони будуть призначені;
- повинні мати чітке фізіолого-біохімічне та генетичне маркування (повинні мати паспорт) для унеможливлення фальсифікації;
- мають позитивно впливати на організм хазяїна, що підтверджується лабораторними дослідженнями і клінічними випробуваннями;
- у разі введення у великих кількостях повинні характеризуватися мінімальною здатністю до транслокації з просвіту травного тракту у внутрішнє середовище макроорганізму; за тривалого використання не повинні викликати побічних ефектів;
- не повинні пригнічувати нормальний мікробіоценоз;
- мають бути нешкідливими для людей, ураховуючи імунологічну безпеку;
- повинні мати колонізаційний потенціал, тобто бути стійкими до

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи с</i>	<i>Дат</i>	<i>РОЗДІЛ 1.</i>		
<i>Розробив</i>	<i>Шевченко</i>						
<i>Консульт.</i>	<i>Д.А.</i>						
					<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
					<i>Д</i>	<i>12</i>	<i>117</i>

Керівник	Яловенко О.І.			ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Сікорського ФБТ
Затвер.					

—

природних інгібіторів травного тракту (низьких значень рН, жовчних кислот, ферментів травлення, антимікробних субстанцій, синтезованих індигенною мікрофлорою), добре адгезуватися до епітелію відповідних слизових оболонок;

- повинні мати природну стійкість щодо сучасних антибактеріальних препаратів;
- повинні мати стабільні характеристик як з клінічного погляду, так і з технологічного;
- повинні мати високу швидкість росту та розмноження в умовах, наближених до умов шлунково-кишкового тракту;
- мають потрапляти в організм людини в активній формі, минаючи тривалі етапи реактивації клітин, що дасть їм змогу одразу проявляти свою біологічну активність, успішно конкуруючи з потенційними патогенами.

Спектр мікроорганізмів, котрі практикуються для бактеріального лікування, щороку збільшується.

Основною групою мікроорганізмів, які використовуються у складі сучасних пробіотичних препаратів і продуктів на основі живих бактерій є грампозитивні бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus*: *B. subtilis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. reuteri*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. Lactis* та інші. Велике значення має те, що вони належать до групи GRAS (generally regarded as safe), тобто розглядаються як нешкідливі для здоров'я людини [6,7].

За однією з класифікацій [6] препарати пробіотиків, що використовуються нині у клінічній практиці, поділяють на сім поколінь. Серед препаратів-пробіотиків I покоління, впродовж тривалого часу, найбільшу популярність, особливо у педіатрії, має Біфідумбактерин. Він належить до групи препаратів, що складаються з монокультури живих мікроорганізмів, які є представниками нормальної мікрофлори кишечника людини (монокомпонентні препарати).

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		13

[illegible]

Препарат Біфідумбактерин – ліофільно висушений порошок у флаконах, а також у супозиторіях. Латинська назва цього препарату *Bifidobacterinum siccuum*. В одній його дозі міститься не менш як 10^9 живих клітин біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum* №1 [6].

1.2. Систематичне положення

Bifidobacterium bifidum № 1 відноситься до роду *Bifidobacterium*. Рід *Bifidobacterium* включений в сімейство *Bifidobacteriaceae*, яке віднесено до порядку *Bifidobacteriales* в підклас *Actinobacteridae* в клас *Actinobacteria* в відділ *Firmicutes* в домен *Bacteria*.

Бактерії роду *Bifidobacterium* згідно "Визначника бактерій Берджи" [8] віднесені до сімейства *Actinomycetaceae* 20 частини класу *Thallobacteria* відділу *Firmicutes* царства *Procaryotae*. Відповідно до цієї ж класифікації, рід *Bifidobacterium* віднесений до 2 категорії (грампозитивні мікроорганізми, що мають клітинну стінку) і 20 групи (грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми), без будь-якого об'єднання в сімейство [8,9].

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Морфологічні ознаки представників роду *Bifidobacterium* є спільні. Клітини *Bifidobacterium bifidum* є неспороутворюючі, грампозитивні, в старих культурах можуть спостерігатися грамнегативні варіанти, розмір $0,5-1,3 \times 1,5-8$ мкм.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]



Рис. 1.1. Морфологія біфідобактерій

Форма клітин варіює: від форм у вигляді ком, з булавовидними потовщеннями на кінці, прямих паличок, іноді розгалужені (В-, Т-форми), зернисті; в чистих культурах вони більш поліморфні.

Розміщення клітин одинарне, парами, розетками. Іноді зустрічаються роздуті клітини коковидної форми (зазвичай в несприятливих умовах).

Нерухомі, джгутики, капсули, слизові шари відсутні.

Слід зазначити, що довжина і форма клітин у різних культур одних і тих же видів біфідобактерій залежить, певною мірою, від складу середовища, присутності кисню, віку культури і способу інкубації [10,11].

1.4. Культуральні ознаки

На щільних поживних середовищах бактерії роду *Bifidobacterium*, в тому числі і *Bifidobacterium bifidum* № 1, зазвичай невеликого розміру діаметром 2-5 мм, з рівним краєм, опуклі, плоскі, блискучі, непрозорі, білого або світло сірого кольору з темним центром, на вигляд нагадують нерівні грудочки вати (рис.1.2.). Шорсткість колонії не спостерігається.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

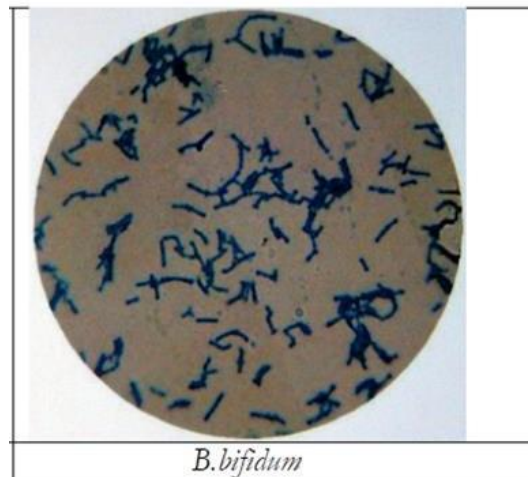


Рис. 1.2. Колонії біфідобактерій, вирощені на твердому живильному середовищі [10]

Зростання на рідких та напіврідких поживних середовищах (середовище Біфідум, казеїново – дріжджове) спостерігається у вигляді рівномірного помутніння або випадіння гомогенного або, рідше, зернистого осаду, на вигляд нагадує «цвяшки», «крихти» (рис. 1.3.). Утворення плівки не характерно.



Рис. 1.3. Мікроскопічний препарат *B. bifidum*, вирощений на рідкому поживному середовищі [10]

[illegible]

Бактерії роду *Bifidobacterium*, в тому числі і *Bifidobacterium bifidum* №1, володіють здатністю утворювати набряклі, інволюційні, кулясті форми при розвитку в несприятливих умовах - невідповідна кислотність середовища ($\text{pH} < 5,5$ чи $> 8,5$), температура культивування ($t < 20^\circ\text{C}$ чи $> 45^\circ\text{C}$), нестача поживних компонентів середовища, присутність кисню. Поява плеоморфних розгалужених клітин активується і катіонами одновалентних лужних металів - K^+ , Na^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+ , а також виключенням із поживного середовища будь-якої з чотирьох амінокислот (DL-аланін, DL-аспарагінова кислота, L(+)-глутамінова кислота, DL-серин), суміш яких запобігає появі розгалужених клітин[10,11,12].

При зростанні на середовищах загального призначення *Bifidobacterium bifidum* № 1 не мають особливих запахів. Тим не менш, вони в значній мірі обумовлюють запах продуктів бродіння, утворюючи різні леткі сполуки, такі як діацетил і його похідні, а також сірководень [11].

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

В наш час рід *Bifidobacterium* включає 32 види. Усі представники роду маю подібні фізіолого-біохімічних властивості.

При первинному виділенні від людини, з рубця тварин, кишечника бджіл представники роду *Bifidobacterium* є строгими анаеробами (виключеннями є *B. psychraerophilum*, *B. Lactis* – володіють властивістю аеротолерантності). В процесі лабораторного культивування вони набувають здатність розвиватися при доступі кисню, а в високопоживних середовищах можуть рости і в повністю аеробних умовах.

Розмноження біфідобактерій відбувається шляхом формування поперечних перегородок. На рівні сформованої септи в поперечній перегородці клітинна стінка товща бічної. На деяких ділянках тіла однієї клітини чи її відростків розмноження може відбуватися одночасно чи

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

послідовно, внаслідок чого утворюються нерівномірної довжини ланцюги клітин без ознак відокремлення клітин, що входять у їх склад [13].

Клітинна стінка бактерій роду *Bifidobacterium* однорідна, товщиною 16 нм, іноді зустрічаються ділянки нерівномірної товщини, містить пептидоглікан (муреїн) – гетерополімер N-ацетилглюкозоаміну і N-ацетилмурамової кислоти. Полісахариди клітинної стінки бактерій містять такі мономери, як глюкоза, галактозам і рамноза. Головними жирними кислотами, які входять до складу клітинної стінки, є пальмітинова, пальмітолеїнова і олеїнова кислоти, співвідношення яких варіює а залежності від складу поживного середовища і температури культивування. Наявність в складі клітинної стінки фосфотидилгліцерола, дифосфотидилгліцерола і аланілфосфотидилгліцерола є специфічною для біфідобактерій ознакою. Важливим компонентом клітинної стінки є ліпотехоеві кислоти. Показано, що саме вони визначають більшість пробіотичних властивостей бактерій роду *Bifidobacterium*, в тому числі *Bifidobacterium bifidum* № 1 [13,14].

Цитоплазматична мембрана - двошарова, шириною 75-85Å⁰. Нуклеоїди і рибосоми мають структуру, типову для усіх прокаріот.

Оптимальною температурою для росту біфідобактерій є 37-41 °С, мінімальна - 25-28 °С, максимальна - 43-45 °С (виключенням є – *B.thermacidophilum*, який здатен рости при 47°С) .

Оптимальне значення рН середовища, при якому можуть існувати біфідобактерії складає 6,5-7,0 при рН нижче 5,5 і вище 8,5 ріст мікроорганізмів не спостерігається.

Тип енергетичного метаболізму – бродіння. Тип бродіння – гетероферментативне молочнокисле бродіння. Усі біфідобактерії зброджують глюкозу, галактозу і фруктозу з утворенням органічних кислоти. Штами, виділені від людини, зброджують лактозу, лактулозу і N-ацетилглюкозамін. Органічні кислоти, що утворюються при зброджуванні вуглеводів, є оцтова і L(+) молочна кислота. Також, у процесі бродіння,

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

утворюються домішки мурашиної, бурштинової кислот й етанолу. Масляна і пропіонова кислоти, вуглекислий газ у процесі бродіння не утворюються[14].

Бактерії роду *Bifidobacterium* – хемоорганогетеротрофи (організми, які отримують енергію і карбон з органічних сполук). Збродження вуглеводів здійснюється за фруктозо-6-фосфатном шляхом. Особливістю цього шляху є, з одного боку, участь ферменту фруктозо-6-фосфат-фосфокетолази, з іншого - те, що тільки тут одночасно важливу роль відіграє транскетолаза і ксилулозо-5-фосфат фосфокетолаза [11].

Bifidobacterium bifidum не утворюють каталазу, H_2S , не відновлюють нітрати до нітритів, не володіють уреазною активністю, не розріджують желатин.

Потреби біфідобактерій в біологічно активних речовинах великі й різноманітні: *Bifidobacterium bifidum* у якості компонентів поживного середовища, потребують біотин, пантотенову кислоту, цистеїн, рибофлавін, пуринові і піримідинові основи, пептиди, амінокислоти, кофермент А, олігосахариди, деякі ненасичені жирні кислоти та ін. З амінокислот потрібно лізин, пролін, серин, аланін, аспарагінова і глутамінова кислоти[10,15].

Необхідно відмітити, що біфідобактерії є дуже вимогливі до складу середовищ культивування. Вони не ростуть на синтетичних середовищах.

Найбільш ефективно культивування *Bifidobacterium bifidum* №1 відбувається на двох різновидах поживних середовищ:

1. Казеїново-дріжджове поживне середовище (КД). Склад середовища: натрію хлорид – 5 г/л; агар мікробіологічний – 0,5 г/л; лактоза – 10 г/л; L-цистеїн – 0,1 г/л, дріжджовий аутолізат – 650,0 мл/л середовища (значення амінного азоту 130 ± 20 мг%), гідролізат казеїну – 350,0 мл/л середовища (значення амінного азоту 150 ± 10 мг%), печінковий екстракт – 100,0 мл/л середовища, вода очищена – до 1,0 л. рН середовища ($7,5 \pm 0,1$), значення амінного азоту готового середовища (150 ± 10) мг%. Стерилізація в автоклаві при температурі (121 ± 1)°C протягом 30 хвилин.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

2. Поживне середовище Біфідум. До його складу входять(г/дм³): панкреатичний гідролізат казеїну — 30,0; екстракт пекарських дріжджів — 5,0; глюкоза — 2,5; лактоза — 7,5; цистеїн — 0,5; NaCl — 0,5; MgSO₄ — 2,5; аскорбінова кислота — 0,5; ацетат натрію — 0,3; лимоннокислий амоній — 0,3; агар — 0,75; вода — до 1,0 дм³; рН — 6,8-7,3. пептон основний сухий — 10,0 г/л, агар мікробіологічний — 0,75 г/л, натрію хлорид — 5,0 г/л, лактоза — 10,0 г/л, L-цистеїн — 0,1 г/л. рН середовища (6,5 ± 0,1) [6,16].

У молоці біфідобактерії розвиваються повільно, так як молоко не є природним середовищем їх існування. Однією з причин поганого росту біфідобактерій в молоці служить розчинений в ньому кисень. У них не виявлено казеолітичної активності, тобто вони можуть засвоювати казеїн тільки після часткового гідролізу. В результаті розщеплення казеїну, утворюються поліпептиди, глікопептиди, аміноцукри, що стимулюють ріст біфідобактерій [16].

Бактерії роду *Bifidobacterium* володіють низькою фосфатазною активністю. Важливою характеристикою роду *Bifidobacterium*, що використовуються в промисловості, є їхня стійкість до кислого середовища, так як це основа для створення сучасних ефективних пробіотиків, що володіють високою колонізаційною стійкістю мікробних компонентів в шлунково-кишковому тракті організму господаря [12].

Представники роду *Bifidobacterium* стійкі до кананіцину, мономіцину. Чутливі до антибіотиків пеніцилінового ряду, гентаміцину [17].

Продукуючи кислоти і бактеріюцини, бактерії роду *Bifidobacterium* є антагоністами по відношенню до патогенних і умовнопатогенних мікроорганізмів: шигеллам Зонне і Флекснера, ентеропатогенних кишкових паличок, сальмонел, стафілококів та ін. Поряд з антагоністичною активністю відносно патогенних мікроорганізмів, важливе значення, в забезпеченні захисної функції нормальної мікрофлори, має її регулюючий вплив на фактори місцевого імунітету і загальний імунологічний статус організму господаря.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

Крім антагоністичної активності, для бактерій роду *Bifidobacterium* також притаманна антиоксидантна активність [15].

1.6. Поширення в природі

Мікроорганізми роду *Bifidobacterium* широко поширені в природі і є одними з основних бактерій-симбіонтів кишечника людини і тварин. В кількісному відношенні домінують у порівнянні з іншою нормофлорою. Їх кількість у новонароджених складає до 90% від усіх бактерій, а їх частка в мікрофлорі дорослих досягає 60%.

Біфідобактерії, як найбільш строгі анаероби, колонізують в організмі людини найближчу до епітелію зону, де завжди підтримується від'ємний окисно-відновний потенціал (причому не лише в товстій кишці, а й в інших, більш аеробних біотопах організму: в ротоглотці, піхві, на шкіряних покровах) [10,11]. У жінок, під час вагітності, концентрація біфідобактерій різко зростає, що пов'язано з функцією біфідобактерій матері як одного з найважливіших факторів захисту організму новонародженого від колонізації його потенційними патогенами. Крім того, вчені з'ясували, що в ході розвитку дитини біфідобактерії можуть замінювати неспоріднені види: така заміна може відбуватися як в проміжку від 1 року до 5-6 років, так і пізніше, між 5-6 і 10-11 роками [18].

Бактерії роду *Bifidobacterium* відіграють важливу роль в стимулюванні роботи імунної системи організму, виробляють антибактеріальні речовини, запобігають прикріпленню патогенних мікробів до стінок кишечника, синтезують вітаміни і беруть участь в травленні за рахунок здатності розщеплювати складні харчові вуглеводи, які не можуть бути засвоєні організмом.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Пробіотики належать до препаратів, які можна застосовувати по відношенню до великого кола живих організмів (люди, тварини, птахи, риби тощо) незалежно від виду господаря, з якого був виділений пробіотичний штам.

Відповідно до сучасної класифікації, виділяють 6 груп препаратів, що забезпечують корекцію мікробіоценозу [6]:

1) монокультури живих мікроорганізмів, які містять представників нормальної мікрофлори кишечника (монокомпонентні препарати);

2) комплекс живих мікроорганізмів (дво- та чотириштамові пробіотики, полікомпонентні препарати, симбіотики);

3) субстанції, оральне введення яких стимулює ріст і розмноження індигенної флори, насамперед лакто- та біфідобактерій (пребіотики);

4) монокультури чи комплекс мікроорганізмів і субстанції, що стимулюють їхнє приживлення, ріст та розмноження (синбіотики);

5) генно-інженерні штами мікроорганізмів із заданими властивостями, їхні структурні компоненти та метаболіти (рекомбінантні пробіотики);

6) інші сполуки мікробного, рослинного або тваринного походження крім мікроорганізмів або стимуляторів їхнього росту та розмноження, які позитивно впливають на функції клітин органів і тканин людини (полікомпонентні комбіновані препарати).

Відповідно до однієї з класифікацій, зараз у клінічній практиці застосовуються пробіотичні препарати семи поколінь. Їх коротка характеристика наведена в таблиці 2.1.[6]:

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i> <i>с</i>	<i>Дат</i>			
<i>Розробив</i>	<i>Шевченко</i> <i>Д.А.</i>				<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>					<i>Д</i>	<i>22</i>	<i>117</i>
					<i>КЕЛІ</i>		

Керівник	Яловенко О.І.			РОЗДІЛ 2.БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Сікорського ФБТ
Затвер.					

Таблиця 2.1. Пробиотичні препарати різних поколінь

По- ко- лін- ня	Пробиотики	Склад	Кіль- кість шта- мів у про- біо- тику	Концент- рація клітин, КУО/доза	По- ко- лін- ня	Пробиотики	Склад	Кіль- кість шта- мів у про- біо- тику	Концент- рація клітин, КУО/доза
I	Пробиотики на основі монокуль- тур облигатної або факультатив- ної нормофлори: Біфідобактерин Колібактерин Лактобактерин	<i>B. bifidum</i> <i>E. coli</i> <i>L. fermentum</i> або <i>L. plantarum</i>	1 1 1	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁸	IV	Симбіотики (комбінація пробіо- тиків і пребіотиків) та іммобілі- зовані пробіотики: Екстралакт Біфалакт-екстра Біфідобактерин-форте Пробіофер	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. bifidum</i>	1 1 1 1	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁷ 10 ⁸
II	2—4-компонентні пробіотики на основі облигатної, факультатив- ної або транзиторної флори: Біфікол Біфіформ Лінекс Кансулі йогурту Симбіолакт композиум	<i>B. bifidum</i> , <i>E. coli</i> <i>B. longum</i> , <i>E. faecium</i> <i>B. infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>L. lactis</i>	2 2 3 4 4	10 ⁸ 10 ⁵ 10 ⁵ 10 ⁸ 10 ⁸	V	Препарати на основі рекомбінант- них генно-інженерних штамів: Субалін	<i>B. subtilis</i>	1	10 ⁸
III	Пробиотики на основі транзитор- них мікроорганізмів: Бактисубтил (Флонівін БС) Біоспорин Ентерол-250 А-бактерин (Аеробакт) Лактовіт форте	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> <i>S. boulardii</i> <i>A. viridans</i> <i>L. sporogenes</i> , <i>B. coagulans</i>	1 2 1 1 2	10 ⁸ 10 ⁸ 10 ⁷ 10 ⁸ 10 ⁸	VI	Поликомпонентні пробіотики на основі лакто- і біфідобактерій: Probiotic Symbiolact Біфідум-Мульти-1,2,3 Полібактерин	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	9 6 6 7	10 ⁸ 10 ¹⁰ 10 ⁸ 10 ⁸
					VII	Мультипробиотек: Симбітер Симбітер концентрований Симбітер-2 Симбітер-М Албакт	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Lactococcus</i>	14 14 25 21 15	10 ⁸ 10 ¹³ 10 ¹² 10 ⁹⁻¹⁰ 10 ¹²

Біфідумбактерин належить до пробіотиків I покоління. Це є препарат на основі живих бактерій *Bifidobacterium bifidum*. Латинська назва - *Bifidobacterinum siccum*. В одній дозі його міститься не менш як 10⁹ живих клітин біфідобактерій та допоміжні речовини: цукор кристалічний, молоко знежирене, желатин[6]. Препарат випускають у вигляді порошку для орального застосування у вигляді розчинів по 5 або 10 доз у флаконах № 10. Це є кристалічна або пориста маса кремового кольору різної інтенсивності, можливий сірий відтінок з специфічним слабкокислим запахом і солодкуватим смаком. Масова частка вологи сухого препарату складає не більше 3,5% [19]. За АТС класифікацією Біфідумбактерин належить до антидіарейних мікробних препаратів (A07F A10) [6,12].

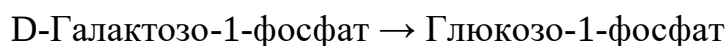
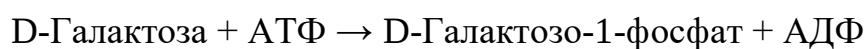
2.2. Схема хімічних перетворень

В основі процесу отримання цільового продукту лежить процес біфідобродіння, що забезпечує біотрансформацію лактози, як основного

[illegible]

джерелпа вуглецю та енергії для біологічного агента, до молочної та оцтової кислот.

Лактоза являється компонентом поживного середовища, для вирощування штама *Bifidobacterium bifidum №1*, що містить у своєму складі молочний цукор (лактозу). Лактоза являє собою дисахарид, який перш ніж катаболізуватися, повинен бути розщеплений на фосфорильовані моносахариди - глюкозу та галактозу (фермент β -галактозидаза).



Bifidobacterium bifidum №1 використовують гетероферментативне молочнокисле бродіння, так як не містять ферментів альдолази та тріозофосфатізомерази. Біфідобродіння здійснюється по пентозофосфатному шляху або по шляху Ентнера-Дудорова. Саме біфідобродіння забезпечує утворення молочної та оцтової кислот [14].

Сумарне рівняння процесу :



Розгорнуту схему біохімічних перетворень можемо спостерігати далі на рис. 2.1. [20]:

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

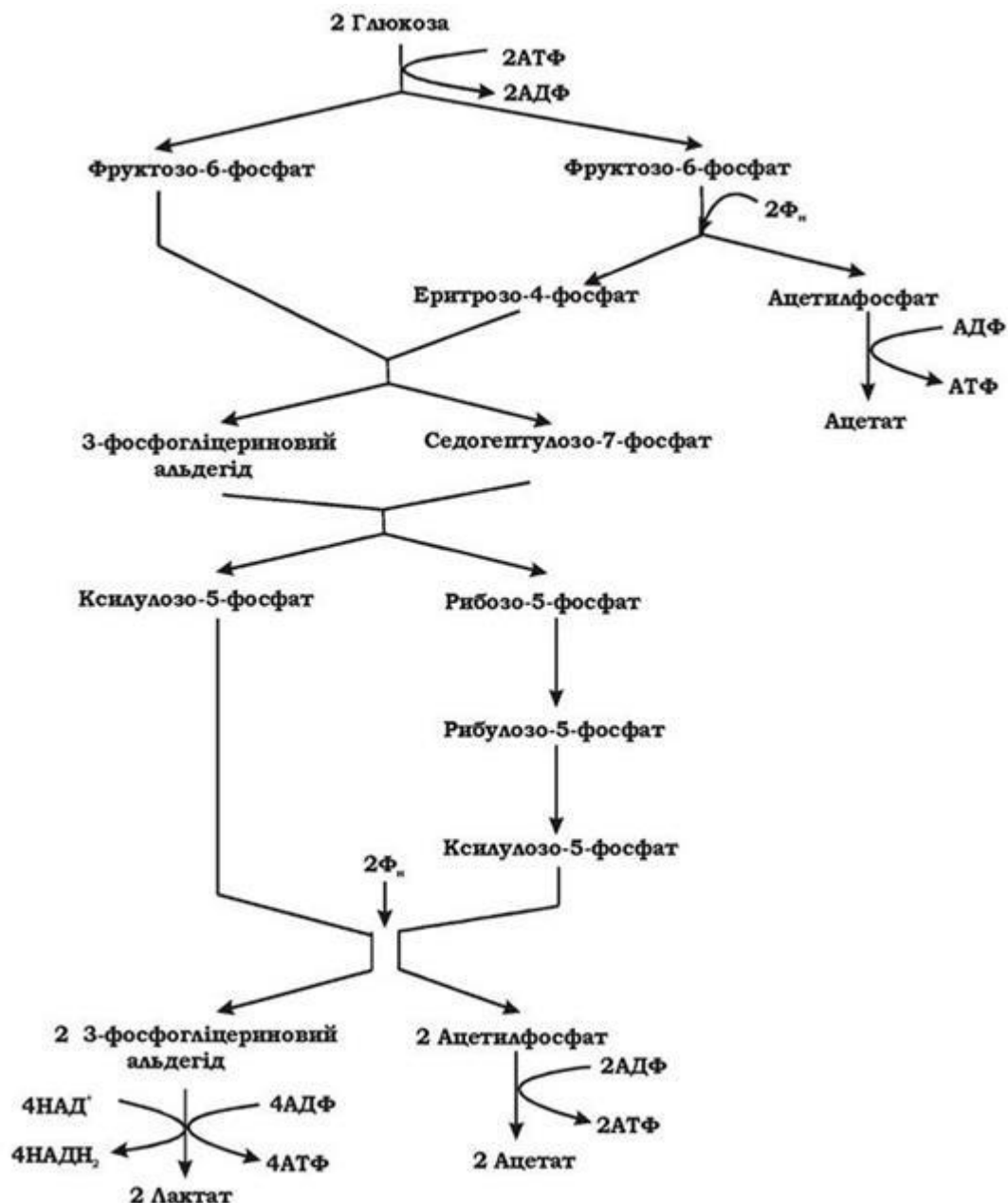


Рис. 2.1. Схема гетероферментативного молочнокислого бродіння, що спричиняється біфідобактеріями [20]

Спочатку відбувається ізомеризація двох молекул глюкозо-6-фосфату у дві молекули фруктозо-6-фосфату. Потім одна молекула фруктозо-6-фосфату за участю неорганічного фосфату розщеплюється на ацетилфосфат та еритрозо-4-фосфат, а інша вступає в реакцію з еритрозо-4-фосфатом. Продуктами цієї реакції є 3-фосфогліцириновий альдегід та седогептулозо-7-

[illegible]

фосфат ($C + C_4 \rightarrow C_3 + C_7$). На наступних етапах обидва продукти обмінюються C2-фрагментами, перетворюючись у ксилулозо-5-фосфат та рибозо-5-фосфат ($C_3 + C_7 \rightarrow 2C_5$). Рибозо-5-фосфат перетворюється у ксилулозо-5-фосфат. На завершення дві молекули ксилулозо-5-фосфату за участю неорганічного фосфату розщеплюються на дві молекули ацетилфосфату та дві молекули 3-фосфогліцеринового альдегіду. Останні окиснюються до двох молекул пірувату. Піруват відновлюється до лактату, а ацетилфосфат перетворюється в ацетат з виділенням АТФ.

Оптимальна температура 37-38°C. Діоксид вуглецю та етанол в реакціях даного шляху не утворюється [14,20].

Біфідобактерії - грампозитивні мікроорганізми, тому для отримання препаратів на основі біомаси *Bifidumbacterium bifidum* №1 їх клітини повинні синтезувати наступні компоненти: білки, ліпіди, полісахариди, нуклеїнові кислоти, тейхоєві кислоти [21].

Синтез амінокислот забезпечують наступні попередники: піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат і з хоризмату – ароматичні амінокислоти.

Важливою складовою клітин біфідобактерій є фосфоліпіди.

Жирні кислоти синтезуються з Ацетил-КоА. КоА-похідні не являються субстратами ферментів, які беруть участь у синтезі жирних кислот, замість них використовується ацилпереносний білок (АПБ), який має подібність з кофермент А.

УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін – попередники пептидоглікану (який може складати від 50 до 95% загальної маси стінки клітин) – синтезуються з глюкозамін-6-фосфату.

Також до попередників фосфоліпідів належить діоксиацетонфосфат, з якого синтезується фосфатидсерин.

Біосинтез піримідинових нуклеотидів починається з карбамоїлфосфат та аспартат. Утворений у пентозофосфатному циклі, рибозо-5-фосфат активується перетворенням у 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						26
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

фосфорибозил-1- пірофосфату з ортоатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбосилується в уродинмонофосфат.

Біосинтез пуринових нуклеотидів починають 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, надходять із бікарбонату, аспартату та фомілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Додаткові реакції приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і утворюється АТФ та ГТФ.

Тейхоєві кислоти, як компоненти клітинної стінки біфідобактерій, можуть складати до 50%. Синтез їх починається з ксилулозо-6-фосфату, з якого синтезується діоксиацетон, а з діоксиацетону в свою чергу 3-фосфогліцерин. 3-фосфогліцерин є вихідною сполукою для синтезу тейхоєвих кислот [21,22].

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

Пробіотичний препарат Біфідумбактерин являє собою ліофільно висушену біомасу *Bifidobacterium bifidum* №1. Форма випуску для ентерального застосування - флакони з сухою біомасою, рідше пакети з порошком і таблетки.

Якісна характеристика.

Склад:

- діючі речовини – в одній дозі міститься не менш як 10^9 живих біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum* №1;
- допоміжні речовини — препарат крім інгредієнтів середовища культивування містить інгредієнти стабілізуючого середовища сушіння, зокрема:

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

- сахароза (ГОСТ 5833—75 або Ерн 5.0, с. 2499) або цукор дрібнокристалічний (ТУ 15.8-00372658-005-2004) — від 7 до 10 % ;
- желатин (ГОСТ 11293-89) — від 0,7 до 1,0 %;
- молоко знежирене (ДСТУ 2661-94) або згущене нежирне стерилізоване (ДСТУ 4404:2005) — від 15 до 25 %.

Сахароза - дисахарид, що складається з двох моносахаридів - α -глюкози і β -фруктози (рис.2.2.). Структурні одиниці пов'язані разом глікозидним зв'язком, що утворюється між двома гідроксидами. Це є дрібний кристалічний порошок білого кольору, без запаху, солодкий на смак. Молекулярна маса - 342,3 г/моль. Щільність 1,5879 г / см³. Розчинність (грам на 100 грам): у воді 186 °С, в етанолі 20 °С. Погано розчинна у спиртах та нерозчинна в діетиловому ефірі. Не проявляє відновних властивостей - не реагує з реактивом Толленса і реактивом Фелінга. З ізомерів сахарози, що мають молекулярну формулу C₁₂H₂₂O₁₁, можна виділити мальтозу і лактозу. При охолодженні рідким повітрям, після освітлення яскравим світлом кристали сахарози фосфоресціюють.

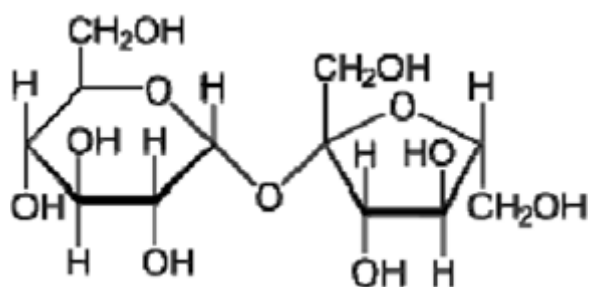


Рис. 2.2. Структурна будова сахарози

Желатин - білковий продукт тваринного походження, що представляє собою комбінацію лінійних поліпептидів з різною молекулярною масою; продукт денатурації колагену, гідролізований колаген. Желатином є білкова желейна речовина, фібрилярний білок сполучної тканини тварин. До складу входять гліцин, пролін і оксипролін. Отримують шляхом виварюванням

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

(тривалим кип'ятінням з водою) кісток, хрящів та сухожилів, сполучної тканини, в основному свинячі і яловичі.

В'язкість желатину значна. Безбарвний або жовтуватого відтінку. Розчинаючись у воді, утворює колоїдні системи, які з легкістю переходять в гель, якщо температура зовнішнього середовища є достатньо низькою.

Желатин набухає у воді і розчиняється при нагріванні вище 50 °С. Це єдиний гідроколоїд, який при охолодженні утворює гель, а при нагріванні переходить у рідкий стан знову. При тривалому впливі температури вище 80°С, він піддається гідролізу і втрачає з часом все більше желеутворюючої здатності. Практично нерозчинний в спирті, етері, хлороформі.

Молоко знежирене - продукт, що отримується при відділенні вершків від незбираного молока на сепараторі. Містить близько 3,2 % білків, 4,8 % молочного цукру, 0,05 % жиру, 0,7 % мінеральних речовин. Щільність знежиреного молока становить 1030-1035 кг / м³. Частка води - в середньому 91,5%. В'язкість - від $1,71 \div 1,75 \cdot 10^{-3}$ Па · с. Для знежиреного молока характерний злегка синюватий відтінок. Процеси молочнокислого бродіння в знежиреному молоці в перші 12 годин йдуть трохи повільніше, ніж в цілісному (через наявність в ліпопротеїнових оболонках жирових кульок речовини, що стимулює кислотоутворення), але ця різниця несуттєва з практичної точки зору.

Пробіотичний препарат не містить сторонньої мікрофлори, його кислотність складає не менше 90°Т.

Препарат є не шкідливим, не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів [16].

2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Найважливішими функціями пробіотику Біфідумбактерину на основі живих бактерій *Bifidobacterium bifidum* в організмі людини є участь у метаболічних процесах, а також у реалізації механізмів колонізаційної

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

резистентності. Обмінна функція біфідофлори відбувається за рахунок різноманітної біосинтетичної здатності, участі у травленні, метаболізмі жовчних кислот, холестерину, гормонів, ксенобіотиків, канцерогенів тощо.

Протиінфекційний захист пробіотику на основі бактерій роду *Bifidobacterium* може здійснюватися прямим впливом на патогенні та умовно патогенні мікроорганізми, такі як *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Sh. flexneri*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*, в результаті синтезу антимікробних компонентів (КЛЖК, антибіотиків, бактеріоцинів, лізоциму, пероксиду водню), конкуренції за поживні інгредієнти та сайти адгезії. При цьому найбільше пригнічуючу дію вони здійснюють на *S. aureus* і *Sh. sonnei*, які найчастіше є причиною харчових отруєнь, що виникають при вживанні кисломолочних продуктів. Також бактерії роду *Bifidobacterium* можуть опосередковано впливати на вищезазначені мікроорганізми — через стимуляцію імуногенезу.

У результаті закислення середовища кишечника поліпшується всмоктування заліза, кальцію, вітаміну D, гальмуються гнильні процеси, інактивується багато шкідливих ферментів, унеможлиблюється всмоктування аміаку та інших токсичних метаболітів.

За деякими даними [23], біфідобактерії є постачальниками низки незамінних амінокислот, вітамінів, встановлена їх антиканцерогенна та антимутагенна активність, здатність знижувати рівень холестерину в крові. Кислоти, які продукують біфідобактерії, бактеріоцини попереджають проникнення мікробів у верхні відділи ШКТ та сприяють формуванню неспецифічної резистентності. Виражена протективна активність біфідобактерій обумовлена їх високою адгезивністю до слизової оболонки товстого кишечника [24].

B. bifidum у складі Біфідумбактерину, внаслідок активізації ензиматичних систем, поліпшують процеси гідролізу й абсорбції ліпідів, протеїнів, 80 вуглеводів, беруть участь у мінеральному обміні, запобігають

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						30
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

адгезії та колонізації кишечника умовно патогенними мікроорганізмами, руйнують токсичні продукти обміну тощо.

Біфідобактерії володіють проєктивною активністю відносно синтезу IgA та гальмують деградацію секреторного IgA в кишечнику, посилюють фагоцитоз, нормалізують співвідношення CD4/CD8, підвищують утворення інтерлейкінів (IL-6, IL-1b), підвищують продукцію g-інтерферону [25].

В медицині Біфідумбактерин використовують:

- для лікування дітей, особливо першого року життя, які перенесли гостру кишкову інфекцію, дітей, які перебувають з перших днів життя на штучному вигодовуванні, недоношених;
- для застосування через 3-5 днів після відміни антибіотиків (при призначенні спільно з антибіотиками треба враховувати сумісність);
- при обтяженому фоні (рахіт, гіпотрофія, анемія);
- в комплексній терапії хворих на тяжкі інфекційні захворювання, локальні гнійникові ураження, при будь-яких дисфункціях кишечника (метеоризм тощо);
- хворим із захворюваннями органів травлення (незалежно від віку);
- людям, що страждають ферментопатіями, спадковими захворюваннями обміну речовин;
- при тривалій гормонотерапії;
- при опроміненні [26].

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Біфідобактерії є продуцентами багатьох біологічно активних сполук, мають високу швидкість росту, безпечні для оточуючого середовища, що робить їх цінним продуцентом.

Згідно вимог ВООЗ біопрепарат або культуру мікроорганізмів можна вважати пробіотиком лише тоді, коли чітко встановлено їх таксономічне положення із застосуванням сучасних методів ідентифікації, зокрема молекулярно-генетичних. Зважаючи на це, науковцями була проведена ідентифікація на рівні вивчення геному для *Bifidobacterium bifidum*, як основного продуцента для створення пробіотичного препарату Біфідумбактерину.

На сьогоднішній день геном *Bifidobacterium bifidum* розшифрований повністю.

Повна геномна інформація *B. bifidum* міститься на одній кільцевій хромосомі. Загальна довжина геному складає 2.20341Мб, частка ГЦ-пар становить 62.7%. Всього виявлено 1,709 гена, що кодують білки, ідентифіковано 53 гени тРНК для всіх амінокислот та три grn оперона.

На прикладі *Bifidobacterium bifidum* S17 було проведене картування генів і укладено кільцеву карту геному (рисунок 3.1.)[41].

					ДП 6220. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи с	Дат	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ		
Розробив	Шевченко Д.А.						
Консульт.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	32	117
					КПІ ім. Ігоря		

Керівник	Яловенко О.І.			ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Сікорського ФБТ
Затвер.					

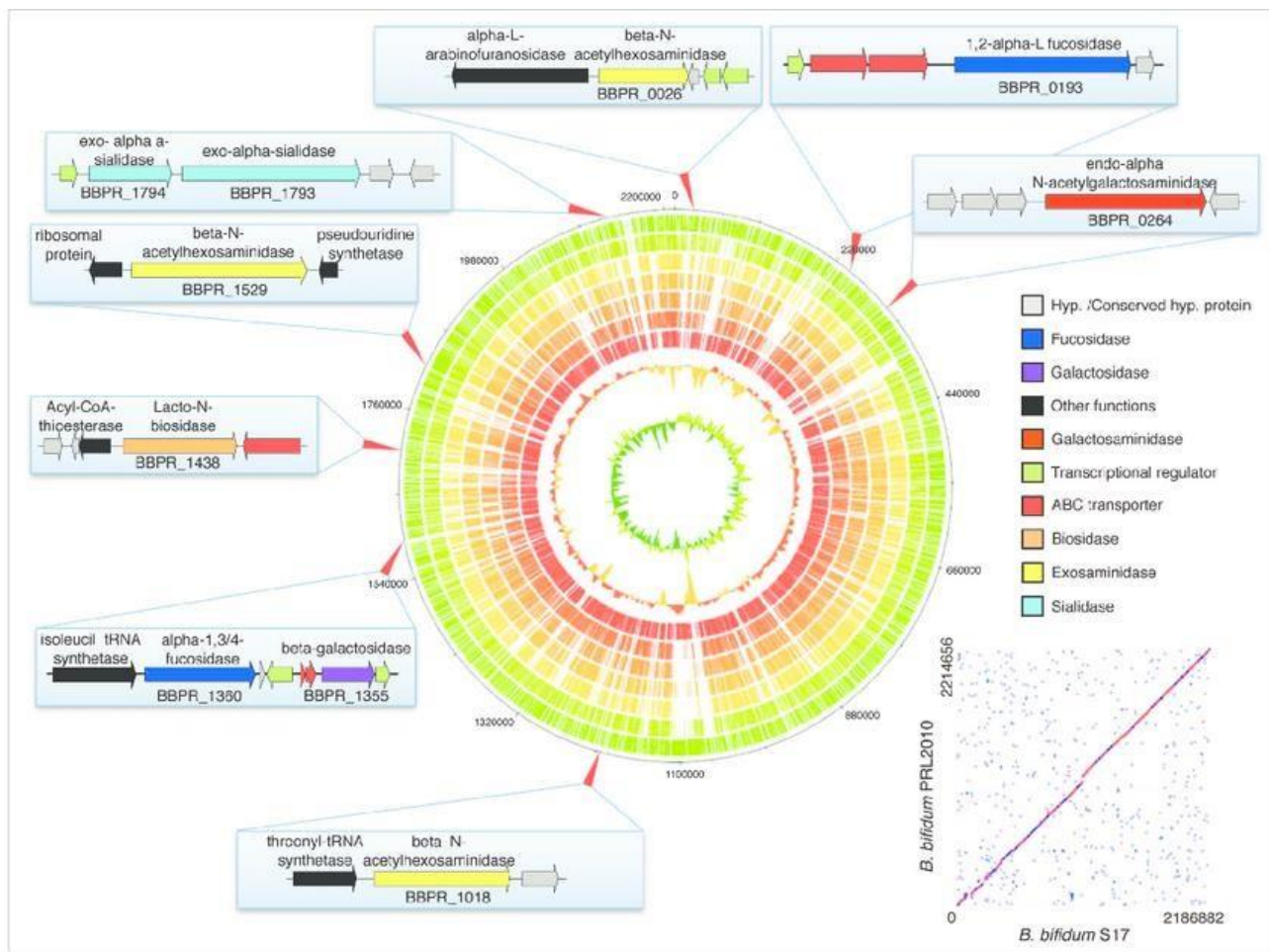


Рис. 3.1. Генетична карта штаму *B. bifidum* S17

У генетичному апараті зосереджена вся інформація про ознаки певного організму. У процесі розмноження організму саме він гарантує збереження і точне відтворення цих ознак, таким чином дочірні особини, що утворюються виявляють зазвичай повну подібність з батьківськими формами. Це свідчить про те, що генетичному апарату характерна висока стабільність і точність механізмів, що визначає його функціонування. Організація генетичного апарату здійснена так, щоб з одного боку забезпечити його сталість, з іншого - пластичність, тобто здатність змінюватися.

Для ідентифікації мікроорганізмів, в тому числі і для біфідобактерій, в наукових та практичних лабораторіях широко використовуються діагностичні API-системи [27].

[illegible]

Проте бувають випадки, коли результати вивчення морфологічних ознак, або спектру вуглеводів що зброджуються, отриманні за допомогою АРІ-тестування не відповідають даним, які здобувають за допомогою сиквенсу гену 16S рРНК. Таким чином з метою встановлення приналежності штамів біфідобактерій використовують різні генетичні підходи, що включають виявлення відмінностей в генах рРНК і спейсерних ділянках.

Аналіз нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК є зручним інструментом для видової ідентифікації біфідобактерій. За даним методом підбираються родоспецифічні праймери, комплементарні нуклеотидній послідовності фрагмента гена 16S рРНК. Проводять аналіз не всього гену, а тільки варіабельної частини довжиною ~ 500 п.н. Полімеразну ланцюгову реакцію застосовують для ампліфікації гену 16S рРНК та отримання видоспецифічних та штамоспецифічних продуктів[28,29]. Однак, згідно з деякими даними, перелічені вище методи, не володіють достатньою роздільною здатністю для штамової диференціації. Для даної мети видається більш доцільним вивчення нуклеотидної послідовності гена білка теплового шоку масою 60 кДа (HSP60), який міститься в єдиній копії в геномі всіх біфідобактерій і на підставі послідовності якого будується древо даних мікроорганізмів [30].

Також в останні роки в бактеріології все частіше починають впроваджувати метод видової ідентифікації біфідобактерій, заснований на масс-спектрометрії з лазерною десорбцією-іонізацією при взаємодії матриці (MALDI-TOF-MS). Метод MALDI-TOF масс-спектрометрії дозволяє реєструвати білковий спектр чистої культури бактерій роду *Bifidobacterium*, який, при порівнянні з базою даних, дає можливість провести ідентифікацію з точністю до виду [31].

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму

На противагу рослинним і тваринним організмам, мікроорганізмам, як об'єктам селекції, притаманні певні особливості, зокрема :

- виділення культури можливо здійснювати по факту з 1 клітини, що забезпечує значну генотипову однорідність культури;
- у зв'язку зі значною швидкістю розмноження, мікроорганізмам характерна висока мінливість і здатність швидко змінюють свій генотип;
- мікроорганізми зазвичай є гаплоїдними, таким чином не володіють прихованими в рецесивному стані ознаками;
- спосіб розмноження – вегетативний;
- мікроорганізмам властива швидка зміна поколінь.

З метою отримання промислових продуцентів використовують виділення клітин з природних субстратів, експериментальне підвищення активності культури, отримання корисних форм методом гібридизації та відбір нових форм після дії мутагенів[32].

3.2.1. Використання природного та штучного добору

Виділяють природний та штучний добір. Природний добір - процес виживання тих організмів, які в результаті наявності певних особливостей їх генотипів найбільш пристосовані до умов навколишнього середовища і залишають найбільшу кількість нащадків. Коротко кажучи, природний добір – це диференційоване відтворення, за даних умов, різних варіантів генотипів.

Штучний добір, на відміну від природного, здійснюється людиною на її розсуд, його ціллю є отримання нових штамів мікроорганізмів.

На меті природного та штучного добору стоїть потреба в отриманні такої форми мікроорганізму, яка, на відміну від вихідної, була б більшою

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						35
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

[illegible]

мірою пристосована у певному середовищі. Для досягнення цього потрібно створити певні умови культивування, при застосуванні яких нова форма, за рахунок природних мутацій, витіснить з популяції вихідну.

За змінених умов культивування, відбувається пристосування мікроорганізмів, по мірі зміни генотипового складу популяції відбувається “переродження культури”[33].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Індукований мутагенез здійснюється шляхом обробки культури за допомогою різних мутагенів: хімічними (їх поділяють на групи: інгібітори синтеза попередників НК; алкілюючі сполуки; окисники; подовжувачі ниток ДНК; інгібітори синтеза РНК; речовини із комплексною дією на ДНК), фізичними (температура, різні види випромінювань). Необхідний мутаген обирають, спираючись на тип мутації, що необхідно отримати, та на міру ефективності мутагена по відношенню до даного мікроорганізма.

Фізичними факторами (УФ – випромінювання і різні види іонізуючої радіації) можливо обробляти водну суспензію спор або клітин. При застосуванні хімічних факторів (алкілметансульфонати, алкілсульфати, алкілнітрозомочевина, метилнітрозогуанідин) є потреба дотримуватись умов, за яких спостерігається максимальний прояв мутагенної активності даної речовини. Значну роль тут відіграє рН розчину, таким чином обробку здійснюють в буферних розчинах при таких значеннях рН, які є найбільш ефективними для даного мутагену.

УФ- опромінення – досить доступний та зручний спосіб, метою якого є отримання мутантів різного типу. Дану ціль задовольняють різні джерела ультрафіолетового світла, які здійснюють випромінювання у короткохвильовій області (близько 253,7 нм). Проте значна частота мутацій, досягається, в даному випадку, при незначному виживанні бактерій.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

Дозу мутагена обирають, спираючись на виживання мікроорганізму, що обробляється. Виживаність визначали співвідношенням числа колоній на агарі після мутагенної дії до числа колоній, які вирости після посіву тієї ж але необробленої суспензії (виражається у відсотках). На виживання мікроорганізму чинять вплив як доза мутагену, так і те, наскільки даний мікроорганізм проявляє чутливість до летального ефекту мутагену, при чому остання властивість може значно коливатися у декількох штамів одного виду мікроорганізму. Дози, що застосовують в селекційній роботі, гарантують виживання клітин в області від 0,1 до 50-80%[33,34].

Максимум поглинання УФ-світла ДНК, велика летальність та мутагенна активність виявляється за УФ-опромінення при довжині хвилі 260 нм. Експерименти *in vitro* показали, що пурини являються стійкішими по відношенню до до хімічних змін, які обумовлені дією УФ-променів, а піримідини мають змогу змінюватись щонайменше у двох напрямках. Це є гідратація та утворення піримідинових димерів. На відміну від першої реакції, яка не має суттєвого біологічного значення, друга - призводить до значних порушень реплікації ДНК.

Окрім фізичних мутагенів, відносно широко використовуються і хімічні мутагени. Доза впливу для хімічних мутагенів залежить від концентрації мутагену в суспензії і експозиції при певній температурі. Один з добре вивчених хімічних мутагенів - азотиста кислота, спричиняє окислювальне дезамінування (заміну аміногрупи гідроксильною) азотистих основ ДНК. За цього процесу порушується правило комплементарності основ і проходить заміна АТ на ГЦ [33].

3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

Існує 3 основні процеси для передачі генетичного матеріалу між бактеріями - кон'югація, трансдукція й трансформація. Дані механізми різняться між собою способом транспортування ДНК.

Загальні особливості для способів обміну генетичною інформацією у бактерій:

1) Процес переносу ДНК завжди здійснюється в одному напрямку від донорних бактерій до реципієнтних.

2) Не відбувається повного обміну генетичної інформації, про що свідчить процес утворення мерозиготи.

3) За умови закінчення процесу генетичного переносу рекомбінацією - відбувається утворення рекомбінантного потомства.

Трансформація – передача генетичного матеріалу від донора до реципієнта за допомогою ізольованої ДНК. При трансформації не потрібен безпосередній контакт між клітиною–донором і клітиною–реципієнтом. Джерелом трансформуючої ДНК може служити вбита культура бактерій (свіжа), або чисті препарати ДНК, які з неї екстраговані.

До первинного етапу генетичної трансформації належить необоротна адсорбція ДНК на поверхні клітини та її поглинання. Подальші етапи, як і при інших парасексуальних процесах, пов'язані з рекомбінацією трансформованою хромосомною ДНК донора з хромосомою реципієнта і пострекомбінаційними процесами. Обсяг інформації, яку є можливість перенести при трансформації ДНК - близько 10 т.п.н.[30,33].

Трансдукція – процес переносу генетичної інформації (хромосомних генів або плазмід) від клітини донора до клітини-реципієнта, за участі бактеріофага. За даного процесу необхідне упакування фрагмента хромосоми або плазмиди у головку бактеріофага; подальший вихід цієї структури з клітини донора за рахунок лізису і потрапляння в іншу клітину при новому акті зараження. Білковий капсид фагової головки забезпечує захист ДНК від руйнівного впливу нуклеаз. Таким чином трансдукуюча ДНК вважається більш захищеною ніж ДНК при трансформації. Але даний процес має певні

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

недоліки - перенос інформації може проходити лише між близькорідними бактеріями.

При трансдукції саме обсяг головки бактеріофага визначає розмір інформації, що переноситься. Різні фаги можуть переносити інформацію від 20 до 40 т.п.н. В процесі трансдукції здійснюється передача як окремих генів так і спеціальних маркерів.

Кон'югація - генетичний обмін, що відбувається за прямого контакту і забезпечує перенос генетичної інформації від клітини донора до клітини реципієнта. За даного механізму генетичний матеріал переноситься з допомогою кон'югативних плазмід. Хромосомні гени при кон'югації можуть також переноситись за участі кон'югативних транспозонів, які локалізуються в хромосомі. Перевагами даного механізму є висока ефективність при горизонтальному переносі генів в будь-якому середовищі існування бактерій; можливість кон'югувати мікроорганізмів, що віддалені в систематичному відношенні. Порівнюючи з трансформацією та трансдукцією, при кон'югації кількість перенесеної ДНК значно більша. В деяких випадках (м'які умови схрещування) можливий перенос всієї хромосоми[34].

3.2.4. Використання особливих методів для отримання продуцентів

Окрім основних механізмів обміну генетичною інформацією (кон'югація, трансдукція й трансформація) існують і інші, вивченість яких ще є незначною і застосування яких у лабораторній практиці не так поширене[35].

Злиття бактеріальних протопластів або сферопластів – один з малопоширених способів обміну. Через те, що в даному обміні приймають участь не інтактні клітини, а протопласти його ще називають штучний обмін. Метод вважається досить трудомістким через те, що експериментатор має для початку отримати протопласти із двох батьківських клітин, а на наступному

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

етапі забезпечити їх злиття методом обробки спеціальними агентами (поліетиленгліколем та ін.). В процесі рекомбінації виникають стабільні рекомбінантні клітини, що суміщають властивості обох батьківських штамів[35].

3.2.5. Використання методів генної інженерії

Генна інженерія - один з сучасних методів, за допомогою якого є можливим отримання продуцента з бажаними властивостями.

Генетична інженерія представляє собою систему експериментальних прийомів, які дозволяють конструювати лабораторним шляхом в пробірці штучні генетичні структури у вигляді так званих рекомбінантних (гібридних) молекул ДНК. Завдяки розробленим методам вдається не тільки отримати гібридні ДНК із фрагментів геномів різних організмів, але і вводити такі рекомбінантні молекули в клітину, створюючи умови для роботи (експресії) в неї введених, часто повністю чужорідних генів.

До основних інструментів генетичної інженерії, які забезпечують об'єднання, синтез, відшукування та аналіз генів належать:

- ферменти, що діють на ДНК;
- вектори (системи, які переносять гени);
- штучні олігонуклеотиди (лінкери, адаптери, праймери, промотори, зонди).

Дослідник в експериментах, що пов'язані з генною інженерією, оперує безпосередньо генами, причому їх перенос в нове генетичне середовище не залежить від таксономічного роду використаних організмів (на відміну від традиційних методів - штучного мутагенезу, гібридизації, які обмежуються бильзьковидовими формами).

Методи генної інженерії дають змогу отримувати рекомбінантні молекули ДНК із фрагментів геномів різних організмів, проводити подальше

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

клонування штучно створених молекул, здійснювати їх введення у клітину з допомоги векторів (плазмід або вірусних ДНК) і створювати умови для експресії цих чужорідних генів в клітини [36].

3.3. Схема отримання продуцентів, що використовуються в роботі

Генетичні особливості мікроорганізмів, включаючи можливу наявність позахромосомних факторів спадковості, адгезивну здатність – важливі фактори при відборі виробничих штамів.

Після аналізу, вказаних у I розділі дипломного проекту даних, з приводу критеріїв відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів, можемо виділити одну з основних вимог – антогоністична активність. Для підсилення природної здатності штамів бактерій роду *Bifidobacterium* до синтезу речовин, які відповідають за прояв антагоністичних властивостей – молочної та оцтової кислот – здійснюють індукований мутагенез, тобто штучний добір, який супроводжується використанням мутагенних чинників. У більшості випадків мутації, які викликають надсинтез продуктів, призводять до метаболічних змін клітини [37].

Для реалізації потреб виробництва, отримання промислового продуцента здійснюється з використанням ультрафіолетового випромінювання.

Процес отримання продуцентів *Bifidobacterium bifidum* для виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину включає наступні основні стадії :

1. Виділення. Вихідний штам розсівають на чашки Петрі і відбирають кілька сотень клонів, які характеризуються типовою для даної культури морфологією і варіанти, які мають деякі морфологічні відхилення.

Даний процес здійснюють з використанням щільного поживного середовища Блаурока. Середовище попередньо розплавляють на водяній бані та швидко охолоджують до температури 45°C. В порожні чашки Петрі

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		41

[illegible]

вносять штам біфідобактерій - *Bifidobacterium bifidum* №1, в кількості по 1 мл розведень (10^{-8} та 10^{-9}). Одразу після цього наливають 50 мл розплавленого стерильного поживного середовища. Для ефективнішого розподілення культури в поживному середовищі здійснюють легке обертання закритої чашки Петрі з вмістом по поверхні стола. Далі їх поміщають в термостат за температури $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ на 48-72 год.

Колонії, які володіють типовою для даної культури морфологією і варіанти з деякими морфологічними відхиленнями визначають візуально.

2. Підготовка штаму до селекційної роботи. Дана стадія включає декілька підстадій :

2.1. Вивчення морфологічних форм культури, вивчення потенційно пробіотичних характеристик біфідобактерій та встановлення зв'язку між морфологічною формою клонів та їх біосинтетичною здатністю. Визначають стійкість біфідобактерій до дії антибіотиків, спектр антибактеріальної активності, адгезивну та кислотоутворюючу здатність.

Характерна ознака відібраних штамів – їх антагоністична дія та здатність гальмувати ріст умовно-патогенної мікрофлори. Кількісно антагоністичну активність штамів визначали найпоширенішим методом - методом відстроченого антагонізму за методикою перпендикулярних штрихів. Даний метод заключається у підсіванні тест-культур патогенних штамів родів *Escherichia*, *Candida* та *Bacillus* до попередньо вирощених (за 48 год) на щільному живильному середовищі штрихів штаму *Bifidobacterium bifidum* №1. Підсівали добові суміші культур. Ступінь антагоністичної активності пробіотичних штамів вважається високим – із зоною затримки росту 20,0-25,0 мм і більше, середнім – із зоною затримки росту 10,0-19,0 мм, низьким – із зоною затримки росту 0-9,0 мм. Повторюваність дослідів – трикратна. Контроль росту тест-культур здійснюється шляхом їх паралельних посівів на чашки Петрі з аналогічним середовищем, але без культур-антагоністів [38,39].

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		42

[illegible]

Визначення активності кислотоутворення антагоністично активних штамів біфідобактері проводять титриметричним методом та виражають в градусах Тернера за формулою:

$$T^{\circ} = A \cdot K \cdot 20$$

де: А – кількість 0,1 Н лугу, що витрачається на титрування 5 мл досліджуваної рідини; К – поправка до титру, що визначається при титруванні 0,1 Н розчину лугу 0,1 Н розчином янтарної кислоти; 20 – коефіцієнт аліквотності; T° – величина, що виражає кількість 0,1 Н лугу, яка пішла на титрування 100 мл дослідного зразку [32].

Адгезивні властивості мікроорганізмів визначали за методикою В.І. Бриліс [40] з використанням еритроцитів барана. Добові культури бактерій центрифугували протягом 5 хв при 3000 об/хв. Одержану біомасу ресуспендували в буфері PBS. Одержували суспензію бактерій, яка містила 10^9 КУО/мл за стандартом мутності. Одержані суспензії бактеріальних та еритроцитарних клітин змішували у рівних об'ємах в мікропробірці та інкубували за температури 37°C протягом 30 хв. Після цього клітини двічі промивали центрифугуванням в буфері PBS при 200 об/хв протягом 5 хв. З осаду клітин готували мазки, фарбували за Грамом і підраховували кількість адгезованих до еритроцитів клітин бактерій.

Для оцінки адгезивних властивостей мікроорганізмів використовували середній показник адгезії (СПА), який визначали за середньою кількістю мікроорганізмів, що прикріплюлися до поверхні одного еритроцита. Враховували всі еритроцити, що знаходяться в п'яти полях зору, в сумі не менше 50. Із врахованих еритроцитів обчислювали відсоток клітин, що мають на поверхні адгезовані мікроорганізми (К, %). Зважаючи на значення СПА і коефіцієнта К, підраховували індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ). Ступінь адгезивності досліджуваних бактерій оцінювали по показнику ІАМ. Так, мікроорганізми вважали неадгезивними при $ІАМ < 1,75$, низькоадгезивними – при ІАМ від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними – від 2,51 до 4,0 та високоадгезивними – при $ІАМ > 4,0$.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		43

[illegible]

2.2. Очистка культури. Кілька клонів з найбільш високим показником, по відношенню до рівня контролю, яким є вихідна культура, відбирають і перевіряють на антагонізм в декількох повторах (як описано в п. 2.1), а потім відбирають один клон, що має стійко високий та відтворюваний рівень показника. Ця тривала процедура призводить до відбору клону з найоптимальнішими ознаками - помітно підвищеними показниками антагонізму.

2.3. Стабілізація культури. Досліджують антагоністичну активність та рівень продукування клону, що був отриманий на попередній стадії, шляхом розсіву на близько 100 субклонів (як описано в п. 2.1).

Отримані дані розподіляють у варіаційний ряд та здійснюють обробку зі застосуванням статистичних методів:

- середнє арифметичне $\bar{X}$;
- середнє квадратичне відхилення (σ);
- коефіцієнт мінливості ($CV = \sigma \times 100$).

Субклони, що потрапили в крайню праву частину цього ряду (максимальне значення), відбирають та повторно оцінюють (як описано в п. 2.3.). При цьому відбувається побудова 2-го варіаційного ряду. Якщо аналіз другої вибірки вказує на зниження необхідних параметрів мікроорганізму, то здійснюють ще один етап клонування, вибравши з цього ряду найкращий клон, та будують третій варіаційний ряд і порівнюють їх коефіцієнти мінливості. Дана процедура проводиться доти, доки коефіцієнти мінливості досліджуваних вибірок не будуть відмінними більш ніж на 5%.

Якщо ж значення 2-го варіаційного ряду істотно не відрізняються, то підготовку вихідного для селекції штаму закінчують, відбираючи субклони з 1-го варіаційного ряду, а 2-й ряд (власний ряд цього субклона) вважають контрольним.

Задача ступеневого клонування - «стабілізувати» вихідну культуру за кількісною ознакою, отримавши максимально однорідну з даною ознакою популяцію, за допомогою дії стабілізуючого відбору. Дана популяція

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		44

слугуватиме надійним контролем мінливості, що індукується мутагенами в процесі подальшого відборі мутантів [41].

3. Отримання мутантів. Мета, яка ставиться при обробці мутагеном, пов'язана зі зміною характеру культури і направлена на підвищення пробіотичних властивостей продуценту.

Як зазначалося вище, при виборі дози мутагену орієнтуються на виживаність. Це визначається відношенням числа колоній на агарі після мутагенної дії до числа колоній не оброблених мутагеном (виражається у відсотках).

УФ-хвилі легко проникають до генетичного матеріалу бактерій, якщо їх довжина складає 260 нм. Чашку з колоніями поміщають під УФ-лампу, тривалість обробки – 60 с. У результаті, якщо доза мутагену підібрана правильно, виживаність має складати 0,1-1%.

Вважається, що клітини, які при цьому вижили (можливі мутанти з потенційно цікавими нам властивостями), зазнали деяких змін і можуть надалі використовуватися для селекційної роботи.

4. Відбір клітин з бажаними властивостями. На даному етапі проводять розведення суспензії, що була оброблена мутагеном, потім здійснюють її висів на щільне поживне середовище Блаурока. Дана процедура проводиться з метою практичного визначення життєздатних колоній, які не загинули від дії мутагену. Кожна отримана моноколонія аналізується окремо. Здійснюється порівняння індексу активності культури в результаті проведення мутагенезу і індексу активності музейної культури. Надалі відбирається колонії з потенційно більшою пробіотичною активністю, тобто ті, де варіанти щодо індексу активності були найкращими. З отриманих результатів робиться висновок з приводу актуальності проведення індукованого мутагенезу.

5. Стабілізація штаму. Відібраний клон пересівають і стабілізують для отримання однорідної популяції. Процес проводять аналогічно як у пункті 2.3.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

6. Отримання промислового продуценту.

Послідовність операцій при отриманні продуценту для виробництва препарату можна представити у вигляді блок-схеми (рис.3.2.).

Виділення штаму з асоціативної культури за допомогою середовища Блаурока

Підготовка штаму до селекційної роботи

Вивчення морфологічних форм культури та активності штаму

Очистка культури

Стабілізація культури

Отримання мутантів

Відбір клітин з бажаними властивостями

Стабілізація штаму

Отримання промислового продуценту

Рис. 3.2. Схема отримання продуцента, що використовуються у виробництві Біфідумбактерину

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						46
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: Біфідумбактерин

На сьогоднішній день на території України побіотичний препарат Біфідумбактерин виробляє тільки один завод ПрАТ «Біофарма». Код АТС. А07F АЮ. Протидіарейні мікробні препарати. Номер реєстраційного посвідчення - UA/13645/01/01. Термін дії реєстраційного посвідчення закінчився у 19.05.2019 [42].

Призначення: продукт призначений для лікування та профілактики при кишкових дисфункціях (здуття, метеоризм, нудота, діарея), що виникли на тлі порушень кишкової мікробіоти; після перенесеної антибактеріальної терапії для відновлення мікробіоти кишечника; при діатезах та інших проявах алергії, при порушеннях кишкових функцій. Біфідумбактерин може використовуватись в медичній практиці і як дієтична добавка до раціону харчування [43].

Зовнішній вигляд: Біфідумбактерин – розфасована у флакони ліофільно висушена мікробна маса живих біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum* №1. Опис зовнішнього вигляду та фізико-хімічних характеристик продукції наведено в таблиці 4.1. відповідно до аналітично-нормативної документації (далі за текстом АНД) [6]:

Таблиця 4.1. Специфікація Біфідумбактерину

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи с</i>	<i>Дат</i>	<i>РОЗДІЛ 4.</i>		
<i>Розробив</i>	<i>Шевченко Д.А.</i>						
<i>Консульт.</i>							
					<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
					<i>Д</i>	<i>47</i>	<i>117</i>
					<i>КПІ ім. Ігн</i>		

Керівник	Яловенко О.І.			ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Сікорського ФБТ
Затвер.					

Показники контролю	Встановлені значення	Методи контролю
Опис	Порошок (пориста або кристалічна маса) бежевого кольору різної інтенсивності або бежевого кольору із сіруватим відтінком зі специфічним запахом та смаком.	За п.1 АНД візуально
Автентичність	Нерухливі, грампозитивні поліморфні палички з біфуркацією на одному або двох кінцях, завдовжки 4—5 мкм, розміщуються у вигляді скупчень або окремих клітин. Облігатний анаероб. У разі росту на напіврідких середовищах окремі колонії біфідобактерій мають форму дрібних «цвяхів», «крихток», «ниток» білого кольору, що утворюють під час струшування крихкоподібну масу.	За п.2 АНД, бактеріологічно, бактеріоскопічно
Розчинність	У разі додавання води із розрахунку 1 см ³ на одну дозу препарату протягом 5 хв утворюється гомогенна завись сірувато-бежевого кольору	За п.3 АНД, візуально
Прозорість	Завись має бути не прозорою	За п. 4 АНД, візуально
Кольоровість	Завись повинна мати бежевий або бежевий із сіруватим відтінком колір	За п. 5 АНД, візуально
pH	5,5—6,5	За п. 6 АНД, ДФУ[5], вид. 1, р. 2.2.3, с. 17, потенціометрично
Втрата по масі при висушуванні	Не більше 3,5%	За п. 7 АНД, ДФУ[5], вид. 1, р. 2.2.32, с. 49
Специфічна нешкідливість	Препарат має бути не шкідливим	За п. 8 АНД
Мікробіологічна чистота	Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджеподібних грибів	За п. 9 АНД, ДФУ[5], доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42
Специфічна активність: визначення кількості	В одній дозі препарату має міститися не менш як 10 ⁹ живих біфідобактерій	За п. 10.1 АНД

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		48

живих біфі- Показник активності За п. 10.2 АНД
добактерій в одній кислотоутворення Біфідобактерину
дозі препарату; має бути не нижче ніж 90 °T
визначення
активності кисло-
тоутворювання
препарату

Упаковка: по 5 або 10 доз (1 доза –10⁹ живих біфідобактерій) 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 за ГОСТ 64-071-89 з картону коробкового (хромерзац) за ГОСТ 7933-89 з перегородками або гофрованою вкладкою, або з полімерною вкладкою з плівки полівінілхлоридної для розміщення та фіксації флаконів.

На флакони наклеюють етикетку з етикеткового паперу за ГОСТ 7625-86 або з паперу для письма за ГОСТ 18510-87, або етикетку на липкій основі.

Групова і транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768-90.

Маркування: на флакон фарбою глибокого друку для скляних виробів за ТУ У 42.34.011—97 українською або російською мовою наносять: назву препарату, кількість доз, номер серії, термін придатності.

На етикетці флакону українською та російською мовами вказують: виробника, товарний знак, назву препарату латинською, українською та російською мовами, кількість доз, номер серії, термін придатності.

На пачці та етикетці групової тари українською та російською мовами наносять: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською та російською мовами, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування перорально», умови зберігання,

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

			c		
--	--	--	-----	--	--

--	--	--

«Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих- код, реєстраційний номер у країні імпортерів (за потреби).

Номер серії та термін придатності допускається наносити збоку пачки методом тиснення.

На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок.

Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192-96.

Транспортування: препарат транспортують у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури 2—8 °С відповідно до ГОСТ 7768-90.

Зберігання: у сухому, захищеному від світла місці за температури 2-8°С.

Термін придатності: 1 рік [6].

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

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

Таблиця 4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

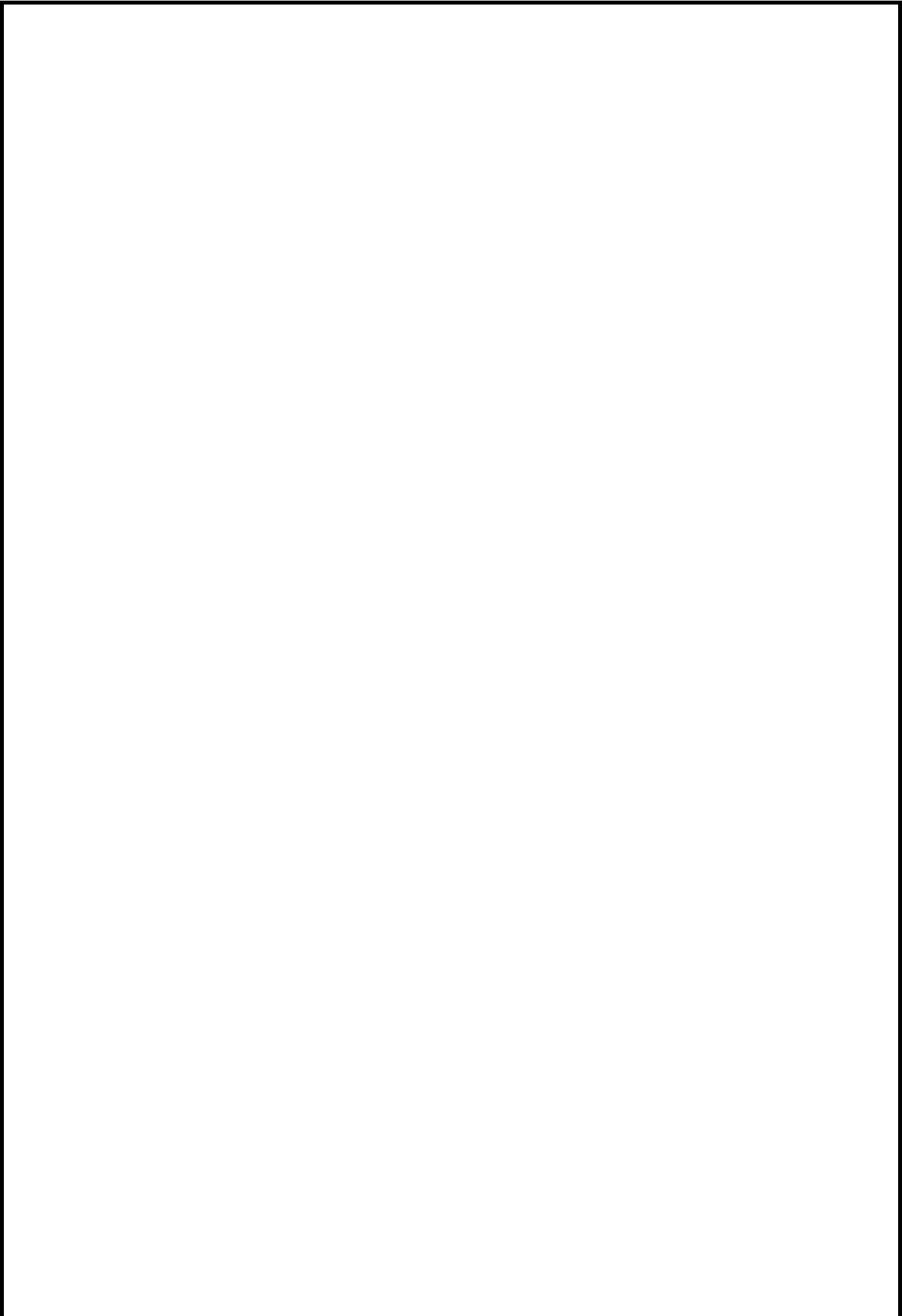
Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1.Основна сировина:			
1.1.Агар мікробіологічний	ГОСТ 17206-84	Масова частка золи (в перерахунку на суху речовину) не менше 2%; не допускається присутність йоду і важких металів	Компонент поживного середовища Біфідум
1.2.Аскорбінова кислота	ГОСТ 4815-49	Масова частка аскорбінової кислоти 96%	Компонент поживного середовища Біфідум
1.3.Ацетат натрію	ГОСТ 54626-2011	Масова частка ацетат натрію 98,5%	Компонент поживного середовища Біфідум
1.4. Вода очищена	ДФУ вид.1, доп. 1, с. 308 - 309	До 100 МО/мл Усі показники згідно ДФУ	Холодо- і теплоагент; для мийки і ополіскування обладнання, приготування поживних середовищ
1.5. Гідролізат казеїну панкреатичний	ДСТУ 4639:2006	Усі показники згідно вимогам ДСТУ	Компонент поживного середовища Біфідум
1.6.Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Усі показники згідно вимогам ДСТУ	Компонент поживного середовища Біфідум
1.7. Екстракт пекарських дріжджів	ДСТУ 4812:2007	Усі показники згідно вимогам ДСТУ	Компонент поживного середовища Біфідум
1.8. Желатин	ГОСТ 11293-89	Усі показники	Компонент

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

		згідно вимогам ГОСТ	захисного середовища
1.9. Лактоза	ДФУ, 1 вид, доп. 2, 2008, с. 485	Усі показники згідно ДФУ	Компонент поживного середовища Біфідум
1.10. Лимоннокислий амоній	ГОСТ 9264-79	Масова концентрація розчину 400 г/дм ³	Компонент поживного середовища Біфідум
1.11. Молоко знежирене	ДСТУ 2661-94	Вміст жиру – 5% Усі показники згідно вимогам ДСТУ	Компонент захисного середовища
1.12. Сахароза	ГОСТ 5833-75	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Компонент захисного середовища
1.13. Цистеїн	ДФУ 1 вид. 2004, ст. 483	Усі показники згідно ДФУ	Компонент поживного середовища Біфідум
1.14. NaCl	ГОСТ 4233-77	Масова частка хлориду натрію не менше 99%	Компонент поживного середовища Біфідум
1.15. MgSO ₄	ГОСТ 450-77	Масова частка у ПС 2,5 г/л	Компонент поживного середовища Біфідум
1.16. Штам <i>Bifidobacterium bifidum №1</i>		Морфологія, характерна для даного продуценту, без присутності сторонньої мікрофлори	Посівний матеріал
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Аміак	ГОСТ 9-92	Масова частка аміаку не менше 25%	Для регулювання рН
2.2. Засіб дезінфекційний ПОЛІДЕЗ	ТУ У 24.2-21643506-003: 2007	Вміст активного хлору до 2%	Обробка взуття персоналу
2.3. Засіб дезінфекційний Хлорантоїн	ТУ У 22902465.004-95	Вміст активного хлору не менше 14%	Для санітарної обробки приміщень

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						53
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

2.4. Засіб дезінфекційний Дезактин	ТУ У 22920528.002.	Вміст активного хлору не менше 14%	Для санітарної обробки приміщень
2.5. Засіб дезінфекційний Бімой	ТУ У 22902465.005-96	Діюча речовина – сульфанол – 5-8%	Для санітарної обробки обладнання
2.6. М'ясо-пептонний агар	ДП «Біофарма»	—	Мікробіологічний контроль
2.7. Натр їдкий технічний	ГОСТ 2263-79	Масова частка гідроксиду натрію не менше 42%	Для регулювання кислотності, нейтралізації стічних вод та етилацетату
2.8. Середовище Сабуро	ДП «Біофарма»	—	Мікробіологічний контроль
2.9. Спирт етиловий ректифікаційний	ГОСТ 18300-87	Об'ємна доля етилового спирту, не менше 96,2%	Антисептик; для спиртовки
3. Матеріали:			
3.1. Алюмінієві ковпачки	ТУ У 25206109.001—2001	Зовнішній вигляд, розміри, маркування, цілісність	Для обтиснення флаконів із препаратом
3.2. Вата бавовняна	ГОСТ 5679-91	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Для фільтрації компонентів поживного середовища
3.3. Гумові пробки	ТУ У 6001 52253.013-96	Зовнішній вигляд, розміри, маркування, цілісність, стерильність	Для закоркування флаконів із препаратом
3.4. Коробки картонні	ГОСТ 7933-89	Зовнішній вигляд, розміри, маркування, цілісність	Вторинна упаковка по 10 флаконів
3.5. Комплекти одягу чоловічі та жіночі для чистих приміщень	ТУ У 16293843.007-2000	-	-
3.6. Папір клейкий етикетковий	ГОСТ 7625-86	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Маркування готової продукції
3.7. Папір для письма	ГОСТ 18510-87	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Маркування готової продукції
3.8. Скотч			
3.9. Рукавички хірургічні гумові	ГОСТ 3-88	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	-



					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						54
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

3.10. Тканина шовкова	ГОСТ 4403-91	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Фільтруючий і стерилізуючий матеріал
3.11. Транспортна тара	ДСТУ 2044-92	Усі показники згідно вимогам ДСТУ	Відвантаження готової продукції
3.12. Фільтрувальний папір	ГОСТ 12026-76	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Фільтруючий і стерилізуючий матеріал
3.13.Флакони скляні	ТУ У 28.7-30883300.005-2002	Маркування, цілісність, відсутність сторонніх включень	Сушіння препарату, пакування готової продукції
3.14.Фарба глибокого друку для скляних виробів	ГОСТ 28196-89	Усі показники згідно вимогам ГОСТ	Маркування готової продукції
4.Напівпродукти:			
4.1. Посівний матеріал	Згідно виробничого регламенту	Мікробіологічна чистота	Для засіву ферментера

4.3. Опис технологічного процесу

Технологія виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину складається з наступних принципових стадій розробленого виробництва, а саме: підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування та ліофільне сушіння продукту. Дані процеси докладніше представлені розгорнуто у графічній частині дипломної роботи на технологічній схемі виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину. Апаратурне оформлення процесів представлено розгорнуто у графічній частині дипломної роботи на апаратурній схемі виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Відповідно до ГОСТ 52550-2006.

ДР 1.1 Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання та інструктаж персоналу.

Особи, які допускаються до виробництва повинні мати відповідну професійну підготовку і пройти інструктаж з охорони праці, ознайомитись з інструкцією з техніки безпеки на роботу, що буде виконуватися, а також інструктаж по санітарним основам.

ДР 1.1.2 Медичне обстеження персоналу.

Медичне обстеження персоналу проводиться 1 раз на рік. Безпосередньо на виробництві з персоналом проводять інструктаж, щодо дотримання правил гігієни та санітарно – гігієнічних вимог.

ДР 1.2. Підготовка технологічного одягу.

У виробничих приміщеннях персонал, що працює, забезпечується технологічним одягом і засобами індивідуального захисту. Технологічний одяг персоналу відповідає класу чистоти тієї зони, в якій він працює, і виконує своє основне призначення – максимально захищає продукт виробництва, від частинок.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						55
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

У приміщеннях класів чистоти В згідно з вимог потрібно носити стерильний брючний костюм або комбінезон, головний убір, бахіли, маску, гумові або пластикові рукавички. Для С класу чистоти – косинку, брючний костюм, бахіли. Для D класу – халат або брючний костюм, технологічне взуття, косинку.

Прання технологічного одягу проводиться один раз на 5-6 діб. Дезінфекційну обробку взуття персонал проводить самостійно щотижня за допомогою дезінфекційного засобу «ПОЛІДЕЗ» [6,44,45].

ДР 1.3. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Персонал та обладнання зобов'язані пройти відповідну обробку дезінфікуючими розчинами, відповідно до вимог GMP, з метою зменшення ризику зараження цільового продукту (отримання бракованої продукції).

Дезінфікуючі розчини, що призначені для обробки приладів та приміщень, готують згідно з «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001р. № 502.

ДР 1.3.1. Приготування розчину Дезактину.

Мийно-дезінфекційний засіб Дезактин використовують для очистки та дезінфекції поверхонь всіх типів, для передстерилізаційної очистки. Володіє миючими властивостями. Також характерна бактерицидна, віруліцидна та фунгіцидна дія. Розчин Дезактину готують 0,2 % концентрації, для цього 2 г порошку дезактину розбавляють 1 літром води.

ДР 1.3.2. Приготування розчину Хлорантоїну.

Хлорактивний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб. Робочий розчин засобу має миючі, дезінфікуючі та передстерилізаційні властивості, не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, устаткування з лакофарбовими, гальванічними і полімерними покриттями, добре емульгує жири, видаляє білково-жирову плівку з оброблюваних поверхонь, легко з них

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		56

змивається, не залишаючи нальоту. Робочий розчин Хлорантоїну готують у тарі будь-якого матеріалу, за винятком оцинкованого заліза, шляхом розчинення у 1 літрі води 2 г концентрату при перемішуванні протягом 1-2 хвилин.

ДР 1.3.3. Приготування розчину Біомою.

Багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом. Застосування Біомою: миття і дезінфекція різноманітного технологічного обладнання, інвентарю, комунікацій і тари (особливо відмінно миє склотару). Для миття використовують 0,5 % розчин Біомою. Приготування: 5 г концентрату Біомою розбавляють 1 літром води[6, 12].

ДР 1.4. Підготовка виробничих приміщень

Виробництво препарату забезпечується при підготовці приміщень трьох класів чистоти: В, С, D. Дані класи задовольняються подачею повітря, очистка якого відбулась у відповідності до класу приміщення, прибиранням приміщень, з поділом на щоденне та генеральне, та відбором проб з об'єму повітря та з поверхонь.

Контроль мікробного забруднення проводиться не рідше, як 1 раз на тиждень: під час виробничого процесу і за 1,5 години до початку роботи. В змивах із площі 10x10 см не допустимий ріст мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

ДР 1.4.1. Щоденне прибирання.

На усіх виробничих ділянках 1 раз за зміну проводять вологе прибирання приміщень, обладнання і трубопроводів, так як можливий розвиток міцеліальних грибів і дріжджів. Робочий персонал зобов'язаний вдягнути гумові рукавиці, фартух та взуття, з метою уникнення пошкоджень одягу та шкіри дезінфікуючими розчинами.

Панелі, стіни, двері виробничих приміщень класу С, D щоденно протирають вологими серветками, змоченими у 0,2% мийно-дезінфекційному

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						57
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

засобі Дезактину та Хлорантоїну. Розчини після відпрацювання направляються на стадію знешкодження рідких відходів.

Для знезараження поверхні стін, підлоги, стелі, обладнання, а також повітря виробничих приміщень використовують бактерицидні лампи. Після проведення дезінфікуючої обробки приміщення звільняють від персоналу і вмикають бактерицидні лампи, які розташовані на стелі не менше, ніж на 2 години.

ДР 1.4.2. Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання приміщення проводять один раз на 5-6 днів або на вимогу бактеріолога.

Стіни, двері, стелю, підлогу та інші поверхні приміщення класу чистоти В зрошують 0,2 % мийно-дезінфекційним засобом Дезактину та Хлорантоїну, з розрахунку 150-200 мл/м² поверхні, потім приміщення закривають на 30-40 хв., після чого надлишок розчину видаляють за допомогою губки. Відпрацьовані мийні розчини направляються на знешкодження рідких відходів [44,45].

По завершенню обробки приміщення звільняють від персоналу і вмикають бактерицидні лампи на 10-12 годин, і не менше, як за 30 хв. до початку роботи вмикають вентиляцію для ламінарного потоку повітря.

ДР 1.5. Підготовка обладнання

До та після технологічного процесу здійснюють підготовку обладнання і комунікацій. Даний блок робіт включає мийку, обробку дезінфікуючими розчинами обладнання і комунікацій із подальшим ополіскуванням. Велике значення має також перевірка на герметичність і справність, а також стерилізація обладнання, коли це є можливим. Підготовка обладнання регламентується відповідними розділами технологічних інструкцій та інструкцій з експлуатації обладнання за встановленими на підприємстві методиками.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						58
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

ДР 1.5.1. Миття обладнання та комунікацій.

Обробку обладнання і комунікацій здійснюють 0,5% розчином Біомою та дистильованою водою. Для миття обладнання використовується безрозбірна СІР мийка. Відпрацьований миючий розчин направляється на знешкодження.

ДР 1.5.2. Ополіскування обладнання.

Обладнання та комунікації, після миття, ополіскують упродовж 10 хв. холодною водою. Стічні води зливаються і направляються на стадію знешкодження відходів.

ДР 1.5.3. Технічний огляд та перевірка на герметичність.

Апарат з прилеглими трубопроводами перед завантаженням середовища перевіряють на герметичність під дією атмосферного тиску (0,15 - 0,19) МПа. Нещільності в фланцевих з'єднаннях, зварювальних швах знаходять за допомогою мильної води. Остаточну перевірку герметичності апарату з прилеглими ділянками трубопроводів здійснюють за допомогою галоїдних течієшукачів під атмосферним тиском (0,15-0,19) МПа і при температурі (78-81) °С. При наближення щупа течієшукача до наявних нещільностей апарата - пристрій буде подавати сигнал. Тривалість перевірки цим методом одного апарату становить 1,5-2 години. Знайдені пропуски усувають і проводять повторну перевірку.

ДР 1.5.4. Стерилізація обладнання.

Стерилізацію обладнання ведуть насиченою водяною парою за температури $(140 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ і тиску $(0,29 \pm 0,02)$ МПа. На даній стадії контролюється температура, тиск водяної пари, час стерилізації та відсутність сторонньої мікрофлори. Разом весь процес стерилізації одного ферментера становить 2,5 години [44-46].

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						59
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

Однією з основ технологічної гігієни є очищення повітря виробничих приміщень як можливого джерела забруднення. Це забезпечується використанням фільтрів певної ефективності.

Повітря, яке подається в приміщення, має проходити чотири основні операції:

- стиснення повітря для подолання опору повітроводів та арматури;
- видалення пилу та інших частинок;
- видалення та знищення залишкових мікроорганізмів;
- регулювання температури та вологості.

ДР 2.1. Забір повітря.

Підготовка вентиляційного повітря включає в себе операції з забору повітря з атмосфери за допомогою повітрозабірника Пз-1 через забірну шахту висотою 20–30 м, де концентрація мікроорганізмів стабілізована. Температура та вологість зовнішнього повітря, кількість в ньому пилу та мікроорганізмів непостійна та залежить від пори року, погодних умов, географічного розташування підприємства та висоти забору повітря.

ДР 2.2. Механічна очистка повітря.

Для попереднього очищення повітря використовують фільтри грубої очистки Ф-2, в яких з повітря вилучають механічні частки розміром більше 5 мкм. Ці фільтри запобігають забрудненню вентилятора В-3 та знижують кількість контамінантів. Для очищення повітря від грубого пилу використовують коміркові фільтри, заповнені фільтруючими матеріалами, у даному випадку – вінілопластиковою сіткою. Діаметр пор фільтрувального матеріалу 5-10 мкм.

ДР 2.3. Нагнітання повітря.

При проходженні через вентилятор при тиску 0,2 МПа відбувається нагнітання повітря.

ДР 2.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря.

Через вентилятор В-3 повітря надходить до нагрівальної колонки Нк-4, де відбувається усереднення та стабілізація фізико-хімічних показників

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						60
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

повітря до температури 20°C та вологості 40-60%. На вході гострої пари в нагрівальну колонку та у місці зливу з неї конденсату розташовані вентиля. Завершується цей процес у повітряному фільтрі Ф-5 із діаметром пор фільтруючого матеріалу 1,5 мкм, де відбувається очистка повітря від дрібних частинок пилу та мікроорганізмів, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки. На виході з фільтру отримано вентиляційне повітря, яке надходить до приміщень. Для вентиляційного повітря до приміщень класу В додатково використовуються термінальні фільтри Ф-6 типу НЕРА для стерилізації вентиляційного повітря. Підготовка стерильного вентиляційного повітря чистих приміщень – приміщень класу В передбачає використання рециркуляції відпрацьованого повітря, що здійснюється за допомогою вентилятора В-7 та фільтра Ф-8 [44,45].

ДР 3. Приготування та стерилізація 5% розчину аміаку.

Культура *Bifidobacterium bifidum* №1 підкисляє середовище росту метаболізуючи компоненти субстрату, тим самим збільшуючи кількість біомаси. Аміак застосовують для корекції рН середовища культивування.

Для приготування та стерилізації розчину використовують збірник з сорочкою та мішалкою об'ємом на 15 л. Стерилізують за температури 131°C і тиску 0,15 гострою парою протягом 45 хв [47].

ДР 4. Підготовка флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків

Готовий продукт представляє собою ліофільно висушену мікробну масу, що фасується у скляні флакони об'ємом 10 мл, які закриваються герметично за допомогою гумових пробок та алюмінієвих ковпачків через гігроскопічність продукту. Скляні флакони, гумові пробки та алюмінієві ковпачки підлягають наступним стадіям підготовки.

ДР 4.1. Мийка, ополіскування та сушка тари.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

Флакони, гумові пробки та ковпачки миються в миючих апаратах 0,5% розчином Біомою та ополіскуються питною водою. Мийку тари проводять при температурі від 40 до 60°C протягом 20 хвилин.

Після миття та ополіскування тара піддається сушці. Це відбувається в сушильній шафі при температурі 105°C протягом 1 години.

Посуд стерилізують в автоклаві при температурі 121°C протягом 1 години. Під час кожного автоклавування додатково як метод контролю застосовують термоіндикатори.

Після цього скляні флакони, гумові пробки та алюмінієві ковпачки подаються в шафу для зберігання і подальшого фасування готового препарату. Відпрацьований миючий розчин, стічні води зливаються і направляються на стадію знешкодження відходів.

ДР 5. Підготовка поживних середовищ

Особливістю технологій біфідовмісних пробіотиків є використання складних середовищ для вирощування біфідобактерій, а також необхідність забезпечення чітких анаеробних умов культивування, що значно ускладнює технологічний процес.

З огляду на фізіологічні потреби біфідобактерії є дуже вимогливими мікроорганізмами і потребують додаткових факторів росту. Ці бактерії мають потребу у вітамінах, амінокислотах, пептидах, пуринових і піримідинових сполуках, солях, ефірах жирних кислот, спеціальних ростових добавках [48].

Тому поживні середовища для культивування біфідобактерій містять багато компонентів і мають складний технологічний процес приготування і стерилізації.

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища Біфідум.

Отримання посівного матеріалу та подальше культивування штаму *B. bifidum* №1 відбувається на середовищі Біфідум, яке має наступний склад (г/дм³): панкреатичний гідролізат казеїну — 30,0; екстракт пекарських

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		62

дріжджів — 5,0; глюкоза — 2,5; лактоза — 7,5; цистеїн — 0,5; NaCl — 0,5; MgSO₄ — 2,5; аскорбінова кислота — 0,5; ацетат натрію — 0,3; лимоннокислий амоній — 0,3; агар — 0,75; вода — до 1,0 дм³; рН — 6,8-7,3.

Вибір даного середовища пов'язаний з тим, що середовище, в значній мірі, відповідає потребам масового виробництва за сукупністю біологічних, технологічних і економічних параметрів.

Джерелом амінокислот, факторів росту, вітамінів є дріжджі; ферментативним субстратом і джерелом енергії слугує глюкоза; ацетат натрію і лимоннокислий амоній – пригнічують ріст стрептококів, пліснявих грибів; джерелом пептонів, мінеральних речовин є гідролізат казеїну; джерелом сірки – цистеїн; важливим компонентом для побудови білків цитоплазми слугує MgSO₄; оскільки біфідобактерії є строгим анаеробом, для підвищення густини поживного середовища, з метою ускладнення дифузії повітря у середовище, використовують агар; для підтримання відповідного осмотичного тиску поживного середовища використовують натрію хлорид; як джерело цукрів використовується лактоза, яка метаболізується біфідобактеріями. Крім того, необхідно враховувати, що основні компоненти середовища є харчовими продуктами і можуть бути використані *per os*.

Певні компоненти поживного середовища Біфідум потребують окремої підготовки перед процесами змішування та гомогенізації.

Екстракт хлібопекарських дріжджів повинен попередньо профільтруватися, так як можливий деякий вміст твердих часток. Для даного процесу використовується набивний фільтр, що містить прошарок вати бавовняної. Перевагами цього методу є можливість фільтрації промислових об'ємів компонентів поживних середовищ. При проведенні процесу контролюється швидкість фільтрації, температура – для збереження факторів росту в дріжджових компонентах, необхідна концентрація компонента. Фільтрацію дріжджового компонента проводять при температурі 8 – 15 °С, необхідну концентрацію підтримують протягом всього процесу фільтрації. Зниження температури нижче 8°С приводить до

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		63

A horizontal line representing a 1D lattice. It is divided into several segments by vertical lines. The fourth segment from the left is labeled with the letter c .

зменшення швидкості фільтрації, а температура вище 15°C супроводжується інтенсивним утворенням пограничного шару, що приводить до необхідності частого застосування «реверсу» і регенерації мембран. Далі дріжджовий компонент середовища проходить стерилізацію у автоклаві Ав - 11 при температурі 121°C на протязі 30 хвилин [49]. Підготований екстракт хлібопекарських дріжджів зливають у реактор зі змішувачем Р-12, де відбуватиметься гомогенізація всіх компонентів поживного середовища.

Панкреатичний гідролізат казеїну надходить у виробництво у готовому вигляді, представляє собою порошкоподібну суміш світлого кольору. Його підготовлюють наступним чином: казеїн заливають водою очищеною (температура $45 \pm 5^\circ\text{C}$) і стабілізують 5%-им розчином аміаку до значення рН $8,0 \pm 0,2$ у реакторі зі змішувачем Р-10 [50].

Стерилізація термолабільних і термостабільних компонентів проходить окремо. Термостабільні компоненти – гідролізат казеїну, солі - розчиняють гарячою очищеною водою у реакторі Р-10. Далі розчини автоклавують в автоклаві Ав-11 в режимі $t=121^\circ\text{C}$, $p=0,2$ МПа протягом 1 години. Солі, компоненти поживного середовища автоклавують окремо, так як може втрачатися поживна цінність компонентів.

Термолабільні компоненти – глюкоза, лактоза, цистеїн - розчиняють в гарячій очищеній воді у Р-10. Розчини автоклавують в автоклаві Ав-11 в режимі $t= 121^\circ\text{C}$, $p=0,2$ МПа протягом 30 хвилин.

Після стерилізації розчини направляються до реактора зі змішувачем Р-12, де гомогенізуються та охолоджуються до необхідної температури.

Підготовані компоненти поживного середовища змішуються наступним чином: в змішувач Р-12 подають невелику кількість від потрібної кількості води – 10-20%, туди подають розчини солей, кислот і мікроелементів – NaCl, MgSO₄, аскорбінова кислота, ацетат натрію, лимонікислий амоній (тобто компоненти, які добре розчиняються). Потім подають розчини – глюкози, лактози, цистеїну, агар мікробіологічний і суспендують. Далі додають панкреатичний гідролізат казеїну. Додають

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		64

			c			
--	--	--	-----	--	--	--

екстракт пекарських дріжджів зі збірника. Далі додають ще невелику кількість води і знову перемішують з нагріванням до 70°C, в подальшому ще 30 хв перемішують до повної гомогенізації[51].

На всіх етапах проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 5.2. Приготування захисного середовища висушування СЖЛ

Середовище необхідне для захисту клітин від несприятливого впливу заморожування і зневоднення, а також для отримання необхідної структури сухої біомаси. До складу входить: знежирене молоко - 35%, сахароза – 30%, желатин - 3,5%, вода - 31,5%.

Для приготування СЖЛ - середовища знежирене молоко фільтрують для видалення механічних домішок, доводять рН до 7,4—7,6 (розчином аміаку), стерилізують за температури 121 °С упродовж 45 хв, охолоджують до 35—40 °С, додають сахарозу до кінцевої концентрації 30-32%, після чого знову стерилізують.

Щоб отримати розчин желатози, до сухого желатину додають дистильовану воду з розрахунку 1 дм³ води на 90—100 г желатину. Розчин ретельно перемішують і залишають для набухання за кімнатної температури на 3 години, після чого підігрівають на водяній бані (50—60 °С) до повного розчинення желатину і стерилізують.

Далі підготовані компоненти гомогенізують в реакторі зі змішувачем Р-32 протягом 30 хв.

На цій стадії обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікрофлори [16,52].

ТП 6. Одержання посівного матеріалу *Bifidobacterium bifidum* №1

Технологічний процес проводять в приміщенні класу чистоти В. Біологічним агентом для отримання Біфідумбактерину є штам *Bifidobacterium bifidum* № 1. Посівний матеріал штаму *B. Bifidum* № 1, для виробничого культивування, отримують в пробірках, 10 колбах об'ємом 750

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						65
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

			c			
--	--	--	-----	--	--	--

мл, в інокуляторі об'ємом 100 л. Посівний матеріал для виробничого культивування отримують на середовищі Біфідум.

На даному етапі обов'язково контролюється мікробіологічна чистота, інтенсивність накопичення біомаси, кількість живих клітин, температура, рН.

ТП 6.1. Відновлення музейної культури.

Флакони/ампули з ліофілізованим штамом колекційної культури *Bifidobacterium bifidum №1*, з концентрацією клітин 10^9 КУО/см³, обробляють 76% спиртом, відкривають і градуйованою піпеткою в асептичних умовах вносять 5 мл фізіологічний розчин хлориду натрію (1 см³ на дозу). $t = 38 \pm 1^\circ\text{C}$. Вміст флаконів перемішують і тієї ж піпеткою переносять в стерильні пробірки, які призначені для отримання культури I генерації [53].

ТП 6.2. Вирощування культури I генерації у пробірках.

Культуру штаму *B. Bifidum №1*, розведену у фізіологічному розчині, переносять у пробірки, які містять середовище Біфідум. Пробірки закривають за допомогою гумових пробок (так як штам, що використовується є облигатним анаеробом) та інкубують посіви в термостаті ТС-17 при температурі $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж 24 - 48 годин.

Кожні 2 години проводиться мікробіологічний контроль культури I генерації за допомогою висіву культури на середовище Сабуро для виявлення грибів та на МПА - для сторонніх бактерій, дріжджів, також використовуючи мікроскопіювання за методом «роздавлена крапля». (відкоригувати речення). Якщо культура I генерації не містить сторонньої мікрофлори, то її використовують як посівний матеріал для одержання культури II генерації [6,16,44].

ТП 6.3 Вирощування культури II генерації в колбах.

Посівний матеріал культури I генерації, котрий був отриманий у пробірках, відбирають в асептичних умовах та переносять в колби об'ємом 750 мл з приготованим та простерилізованим поживним середовищем Біфідум. Колби закривають гумовими пробками. Вирощування культури в колбах відбувається без перемішування в термостаті Тс-18 (даний штам є

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						66
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

			c			
--	--	--	-----	--	--	--

облігатним анаеробом) до вмісту біомаси 10^8 КУО/см³. Культивування триває 48 годин.

На даній операції здійснюється контроль температури (38 ± 1) °С.

Мікробіологічний контроль здійснюють шляхом посіву по 0,1 – 0,2 мл на одну чашку Петрі з МПА і на одну чашку Петрі з середовищем Сабуро. Посіви на МПА інкубують в термостаті при температурі (38 ± 1) °С протягом 48 годин. Посіви на середовищі Сабуро інкубують при температурі (22 ± 1)°С протягом 72 годин. Після закінчення інкубації на чашках Петрі повинні бути відсутні сторонні мікроорганізми.

Далі, впевнившись в чистоті культури, здійснюють пересів біфідобактерій в попередньо простерилізований інокулятор І-19.

ТП 6.4. Вирощування культури ІІІ генерації в інокуляторі.

Для вирощування культури ІІІ генерації використовується інокулятор І-19 об'ємом 100 л. У попередньо простерилізований інокулятор вносять 55 л середовища Біфідум. Підготовлений посівний матеріал, в асептичних умовах, вносять в обсязі не більше 10%. Процес культивування відбувається при температурі 38 ± 1 °С. Для забезпечення анаеробних умов культивування, у ферментер подають суміш вуглекислого газу та азоту, яка витискає повітря.

При вирощуванні в інокуляторі посівного матеріалу контролюється температура культивування (38 ± 1) °С, відсутність сторонньої мікрофлори та рН середовища культивування ($pH = 7-7,2$), щільність посівного матеріалу доводиться до 10^9 КУО/см³.

Кожні 2 години проводиться мікробіологічний контроль висівом культури на середовище Сабуро для виявлення грибів та на МПА - для сторонніх бактерій, дріжджів, також використовуючи мікроскопіювання за методом «роздавлена крапля». За умов відсутності сторонньої мікрофлори культуру ІІІ генерації використовують для виробничого культивування. За допомогою 5% розчину аміаку здійснюють коригування рН середовища [6,53].

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

			c			
--	--	--	-----	--	--	--

ТП 7. Виробниче культивування *Bifidobacterium bifidum* №1

Культуру вирощують глибинним способом методом періодичного культивування у виробничому ферментері Вф-23 об'ємом 750 л на середовищі Біфідум. Біореактор обладнаний паровою рубашкою, приладами для вимірювання та регулювання температури, рН середовища, концентрації розчиненого кисню і культуральної рідини. Крім цього, біореактор оснащений спеціальними опціями для подачі поживного середовища і вуглеводів, введення інокулята, подачі розчинів. Для перемішування ферментер оснащений механічною мішалкою зі швидкістю обертання 70-100 об/хв.

Посівний матеріал вносять у ферментер в асептичних умовах у обсязі не більше 20% [16].

ТП 7.1. Заповнення ферментеру поживним середовищем.

Приготоване на ДР 5.1. поживне середовище Біфідум, в об'ємі 350 л вносять у ферментер протягом 2 годин. Коефіцієнт заповнення складає 0,6...0,7. Процес є анаеробним, асептичним.

Поживне середовище, повторно, стерилізують в біореакторі за температури 110 °С протягом 30 хвилин, шляхом подачі пари в сорочку апарату. Після охолодження простерилізованого середовища до температури культивування (38 ± 1) °С, в асептичних умовах, відбирають стерильну пробу для контролю стерильності поживного середовища [44].

ТП 7.2 Внесення посівного матеріалу до виробничого ферментеру.

В асептичних умовах в ферментер, що містить середовище Біфідум, вносять посівний матеріал (20 % від об'єму середовища) протягом 0,3 години [16].

ТП 7.3 Виробниче культивування.

Виробниче культивування здійснюється, за періодичного режиму, у ферментері за таких параметрів культивування: температура 38 ± 1 °С; рН

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						68
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

			c			
--	--	--	-----	--	--	--

6,8—7,3 (регулюють 5%-м розчином аміаку); надлишковий тиск 0,03—0,04 МПа; тривалість 10 - 16 год.

Для забезпечення анаеробних умов культивування, у ферментер подають суміш вуглекислого газу та азоту, яка витискає повітря. Як інертний газ також може використовуватися аргон, діоксид вуглецю, водень або гелій. Проте, використання суміші вуглекислого газу та азоту є найбільш доцільним, так як саме азот повністю витискає кисень із ферментера, а вуглекислий газ протидіє контамінації сторонніми мікроорганізмами середовища[47].

Перемішуючий пристрій (70-100 об/хв), у процесі біосинтезу, вмикають на кілька (2-6) хвилин тільки перед відбором проб та після подачі 5%-го розчину аміаку. Весь інший процес вирощування біомаси проходить без перемішування.

Через кожні 2 години культивування з ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю і визначення концентрації живих клітин. Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації біфідобактерій на рівні 10^9 КУО/см³.

При виробничому культивуванні відбуваються наступні модифікації: поживне середовище збіднюється, споживається біфідобактеріями, натомість біфідобактерії активно розвиваються та розмножуються для збільшення концентрації в культуральній рідині. Бактерії знаходяться в стадії експоненціального росту [6, 16, 44, 53].

ТП 8. Стабілізація культуральної рідини

Культуральної рідину, одержану на попередній стадії у ферментері, переносять у збірник зі змішувачем З-29, додають захисне середовище, підготоване на ДР 5.2., у співвідношенні з культуральною рідиною 1:1, з метою запобігання загибелі бактеріальних клітин при їх заморожуванні та висушуванні. Встановлюють рН 6,0-6,5 за допомогою 5% розчину аміаку, одержуючи напівфабрикат Біфідумбактерину [52].

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

На даній операції обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль напівфабрикату на відсутність сторонньої мікрофлори.

ТП 9. Наповнення флаконів

Технологічний процес ведеться в приміщенні класу чистоти В (зона А). Напівфабрикат Біфідумбактерину розливають у флакони ємністю 10 мл по 5 мл за допомогою спеціальної машини Фп-35. Спосіб заповнення флаконів шприцевий. Розлив препарату іде при постійному перемішуванні. Флакони накриваються кришками спеціальним апаратом Фп-36, але не закупорюються і передаються на наступну стадію.

Контроль наповнення флаконів здійснюється апаратником і мікробіологом на ділянках на початку, середині і наприкінці розливу. У разі невідповідності дози - перевіряють калібрування дозуючого пристрою. В процесі розливу здійснюється контроль на наявність сторонньої мікрофлори[44].

ТП 10. Ліофільне сушіння препарату

Технологічний процес відбувається в приміщенні класу чистоти С. Після процесу висушування в флаконі міститься 1 г кінцевого продукту, що містить 5 доз (1 доза – 10^9 КУО/см³).

У сушильній камері СШ-37, що називається субліматором, знаходяться порожнисті плити, усередині яких циркулює гаряча вода з ємності С-40. На плитах встановлюють дека з матеріалом, що висушується. Між плитами і деками є зазор, що сприяє передачі тепла переважно радіацією. У даному виробництві висушування проводять з флаконів дещо більшого об'єму, в які наливають розчин, що підлягає висушуванню. Заморожування проводять в окремих низькотемпературних морозильних камерах. Ємності із замороженим продуктом, що підлягає висушуванню, швидко завантажують в охолоджену камеру субліматора, який герметизують і встановлюють необхідні параметри процесу.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						70
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

[illegible]

В процесі сублімації пароповітряна суміш з субліматора СШ-37 поступає в труби конденсатора-виморожувача Т-41, в міжтрубному просторі якого циркулює холодоагент. Конденсатор включається в один циркуляційний контур з компресором (фреоновим) холодильної установки К-44, і з'єднується з вакуумом-насосом ВН-42, призначеним для відсмоктування газів, що не конденсуються, і повітря з субліматора. Пара, що конденсується, відбирається в сепараторі С-43. У трубах конденсатора відбуваються конденсація і заморожування водяної пари. Для безперервного видалення з конденсатора льоду, що утворюється в ньому, встановлюють два конденсатори (Т-41 і Т-45), які поперемінно працюють і розморожуються.

ТП 9.1. Заморожування .

Заморожування відбувається за температури -60°C упродовж 18—24 год (залежно від завантаження апарата). Для проведення даного процесу в апарат вводять холодоагент фреон-22 (хладон), що забезпечує замороження продукту для проведення процесу безпосередньо сушіння.

Під час проведення процесу заморожування в сублімаційній сушарці проводять технологічний контроль, а саме контроль температури і тиску в сушильній шафі. Так, при проведенні процесу заморожування температура не має виходити за межі -45 – 60°C .

ТП 9.2. Сублімаційне сушіння.

Сублімаційне сушіння замороженого препарату здійснюють під вакуумом (26,6 Па). Через 40 год, після початку процесу сушіння, починають плавне підігрівання полиць сублімаційної установки на 1 — 2°C за годину до досягнення температури 0°C . Матеріал на стадії первинної сушки можна поділити на 3 шари: лід, матеріал, в якому сталася часткова сублімація та водяну пару. Після первинної сушки весь лід сублімується, проте в досліджуваному зразку залишається зв'язана волога. Вміст залишкової вологості коливається в межах 7 – 8 %. Далі збільшують підігрівання на 2 – 3°C за годину до досягнення температури 32 — 34°C . За цієї температури Біфідумбактерин витримують приблизно 6 годин. Досліджуваний зразок на

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		71

[illegible]

етапі вторинної сушки розділяється на 2 частини: ліофілізований продукт та частина, яка містить залишкову вологу. На етапі вторинного сушіння важливо продовжувати висушування при підвищеній температурі, щоб зменшити вміст залишкової вологи до оптимальних обсягів (до 3,5 %). Цей процес називається ізотермальною десорбцією, оскільки зв'язана волога десорбується з продукту.

Загальний час проведення процесу сушіння (від початку заморожування продукту в установці глибинного заморозки) становить 96 годин. рН підтримується на рівні 7,0-7,4. Після цього флакони накривають гумовими пробками та передають на стадію закупорювання [9,12].

Час і режим висушування визначають в залежності від марки сублімаційного обладнання, товщини шару біомаси, кріопротекторів, що використовуються та інших факторів [6,16,45,47].

ТП 11. Укупорювання флаконів

Технологічний процес проводиться в приміщенні XXIV "Приміщення закупорки флаконів" (клас чистоти В) і в приміщенні XXV "Приміщення завальцовки флаконів" (клас чистоти С).

Закупорка здійснюється в асептичних умовах. В процесі закупорки здійснюють контроль продукту відповідно вимогам АНД, а також контролюється цілісність флаконів (тріщини, відколи). У разі невідповідності вимогам до продукту або порушення цілісності флаконів їх відбраковують.

Закупорені пробками флакони передають в приміщення завальцовки флаконів. Флакони, закупорені пробками, накривають стерильними алюмінієвими ковпачками і передають для обтиску до напівавтомата Фп-46.

Герметизовані флакони після перегляду складають в спеціальну тару і передають на стадію "Упаковка, маркування, відвантаження готової продукції"[44].

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						72
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

[illegible]

ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту

Технологічний процес ведуть в приміщенні XIV "Приміщення упаковки та маркування» клас чистоти – не класифікується.

Готовий препарат Біфідумбактерин контролюють за показниками згідно з АНД.

ПМВ 12.1. Маркування флаконів з готовим продуктом.

Герметизовані флакони складаються в спеціальні лотки по 200-210 штук. На флакони фарбою глибокого друку для скляних виробів за ТУ У 42.34.01197 наноситься: назва препарату, кількість доз, номер серії, термін придатності.

ПМВ 12.2. Пакування флаконів з готовим продуктом в індивідуальні упаковки.

Промарковані флакони по 10 штук вкладаються в пачки фасувальним апаратом Пм-47.

На пачці та етикетці групової тари українською та російською мовами наносять: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською та російською мовами, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування перорально», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер у країні імпортерів (за потреби).

Серійний номер і термін придатності допускається наносити на бічній стороні пачки методом тиснення.

ТП 12.3. Відвантаження готового продукту.

Пачки з флаконами по 45 штук укладають в ящики. Ящики обклеюють по швам скотчем (на етикетці групової тари додатково вказують кількість пачок).

Пакований готовий продукт перевозять на склад готової продукції для пакування в транспортну тару.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арх
						73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		72

Групова та транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768-90. На етикетці групової тари додатково зазначають кількість упаковок.

Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192-77.

Показники проведення технологічного процесу і результати контролю фіксуються в протоколі серії. Після закінчення технологічної стадії етикетки з устаткування додають до протоколу серії і передають на збереження зі зразками препарату, які зберігаються на підприємстві [42, 44, 45].

ЗВ 13. Знешкодження відходів та промислових викидів

Протягом всього виробництва утворюється декілька рядів відходів, які проходять стадії знезараження. Проводять знезараження некондиційного посівного матеріалу та культуральної рідини, конденсату, промислових стоків, партій бракованого препарату тощо.

Отриманий в посівному апараті некондиційний посівний матеріал, та отриману в ферментері некондиційну культуральну рідину, піддають термічній обробці у вказаних апаратах температури 130-132°C “гострою” парою тиском $P = 0,3$ МПа протягом (40 ± 5) хвилин, охолоджують шляхом подачі холодної технічної води в сорочку до 25-30°C, розбавляють водою до окислення 450-700 мг/л, доводять рН середовища до 7,0 соляною кислотою або розчином їдкого натра та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Залишки розчинів СМЗ після санітарної обробки виробництва, промивні дезінфікуючі розчини та відпрацьовану воду направляють до збірника нейтралізації стічних вод, де розводять водою в 3-4 рази, встановлюють рН на рівні 7,0 розчинами соляної кислоти чи їдкого натру, та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему. В цей же збірник зливають промивні води після мийки інокулятора та ферментера.

Тверді відходи виробництва, у вигляді склобою, рукавичок, пакувальних матеріалів, бракованих флаконів, пробок та ковпачків,

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						74
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

[illegible]

утилізуються на міському сміттєзвалищі. Перед транспортуванням твердих відходів на смітник є підстави для їх попередньої обробки, тобто. подрібнення, перемелення і дроблення. Ця попередня обробка забезпечує проходження катаболічних процесів в твердих відходах. На типовому звалищі, де відходи розміщуються по відсіках, вся система загалом працює як група реакторів періодичної дії, у яких відходи перебувають у різних стадіях біодеградації і піддаються випадковим впливам, наприклад, потрапляння води, що містить розчинний кисень або різні ксенобіотики. Для традиційного типу звалища можна використовувати модель періодичного культивування з повторним внесенням посівного матеріалу мікроорганізмів і безхребетних. У стадії катаболізму твердих відходів, супроводжуваного фізичними і хімічними процесами, переважають аеробні процеси, найбільш лабільні молекули швидко руйнуються поруч з безхребетними і мікроорганізмами [14].

ПВ 14. Переробка відходів

На даному виробництві досить поширене використання матеріалів та речовин, що можуть повторно використовуватися при належній їх обробці. Це фільтрувальні матеріали, холодоагент, конденсати.

Тканинні фільтри, що використовуються при підготовці води відновлюються за рахунок вимочування їх в гарячій воді з подальшим чищенням та обробкою дезінфікуючими розчинами.

Переробка конденсату здійснюється за регенеративним методом, який передбачає виділення корисних речовин. До методів вилучення речовин з конденсату належать екстракція, відгонка та інші [53].

Для переробки холодоагенту використовується, зазвичай, однопрохідний метод. Даний метод очищення означає одноразове пропускання холодоагенту через секцію фільтрів і / або застосування процедури дистиляції.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						75
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

[illegible]

Холодоагент надходить у систему у вигляді пари або рідини; далі він переходить у великий сепаратор, де швидкість потоку різко зменшується, це забезпечує виділення пари при високій температурі. На цьому етапі забруднюючі речовини випадають в осад на дно сепаратора і згодом видаляються під час процедури видалення масла. Дистильований пар подається в конденсатор з повітряним охолодженням і переходить в рідку фазу. Рідина подається в резервуар для зберігання. У цьому резервуарі блок випарника знижує температуру рідини з 56 °С до температури переохолодження 3-4 °С. Змінний фільтр-осушувач в контурі видаляє вологу, а також служить черговим етапом для видалення мікроскопічних часток забруднюючих речовин. Охолодження холодоагенту також спрощує процедуру його переміщення в балони, які перебувають при температурі навколишнього середовища[54].

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс ділянок підготовки поживного середовища Біфідум (для 500 л), підготовки захисного середовища СЖЛ (для 500 л), виробничого культивування, стабілізації культуральної рідини, ліофільного висушування препарату, герметизації та упаковки продукту для 1 серії готової продукції (16 235 упаковок) по 10 флаконів у кожному.

Таблиця 4.3. Матеріальний баланс стадій виробництва

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ДР 5.1.							
Панкреатичний гідролізат казеїну			15	Поживне середовище			500
Екстракт пекарських дріжджів			2,5	Втрати			5,875
Глюкоза	1,25						
Лактоза	3,75						
Цистеїн	0,25						
NaCl	0,25						
MgSO4	1,25						
Аскорбінова кислота	0,25						
Ацетат натрію	0,15						
Лимоннокислий амоній	0,15						
Агар	0,375						
Вода			480				
Аміак	0,7						
Всього:	8,375		497,5	Всього:			505,875
	505,875				505,875		
Стадія ДР 5.2.							
Знежирене молоко			175	Поживне середовище СЖЛ			495
Сахароза			150	Втрати			5
Желатин	17,5						
Вода			157,5				

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи с	Дат		
-----	------	----------	------------	-----	--	--

Всього:	17,5		482,5	Всього:			500
	500				500		

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ТП 7.							
Поживне середовище Біфідум від ДР 5.1.			360	Культуральна рідина			420
Посівний матеріал			72	Втрати			12
Всього:			432	Всього:			432
	432		432				
Стадія ТП 8.							
Культуральна рідина			420	Стабілізована культуральна рідина			825
Захисне середовище від ДР 5.2.			420	Втрати			15
Всього:			840	Всього:			840
	840		840				
Стадія ТП 9.							
Стабілізована культуральна рідина			825	Флакони з культуральною рідиною (напівпродукт Біфідумбактерин)		163500	817,5
Флакони скляні №10		165000		Втрати		3000	7,5
Гумові пробки		165000				163500	
Всього:		330000	825	Всього:		330000	825
	330825		330825				
Стадія ТП 10.							
Флакони з культуральною рідиною (напівпродукт Біфідумбактерин)		163500	817,5	Флакони з висушеним препаратом Біфідумбактерином	163	163000	
				Вода			654
				Втрати	0,5	500	
Всього:		163500	817,5	Всього:	163,5	163500	654
	164317,5		164317,5				

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ТП 11.							
Флакони з висушеним препаратом Біфідумбактерином		163000		Укупорені флакони з сухим препаратом Біфідумбактерином		162500	
Алюмінієві ковпачки		163000				162500	
				Втрати		1000	
Всього:		326000		Всього:		326000	
	326000		326000				
Стадія ПМВ 12.							
Укупорені флакони з сухим препаратом Біфідумбактерином		162500		Упаковані флакони з готовим препаратом Біфідумбактерин в коробки		162350	
Етикетки		162500				162350	
Інструкція		16250				16235	
Коробка пакувальна		16250				16235	
				Втрати		330	
Всього:		357500		Всього:		357500	
	357500		357500				

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						79
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

			c			
--	--	--	-----	--	--	--

4.5. Контроль виробництва

Для отримання якісної продукції, що відповідає усім зазначеним вимогам, здійснюється контроль виробництва. Важливі контрольні точки наведено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що контролюється	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристик а показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1. Підготовка персоналу Км 1.1.1.	Руки виробничого персоналу Мікробна контамінація	Мікробіологічний	1раз/ 2тижні	Клас В: КУО<10 Клас С: КУО≤25 Клас D: КУО≤50
ДР1.2. Підготовка технологічного одягу. Прання одягу Кт1.2.1.	Температура, час	Огляд одягу, Термометр, годинник	Кожну операцію	t = 40-60oC, τ = 30 хв
ДР1.2. Підготовка технологічного одягу. Сушіння одягу Кт1.2.1	Температура, час	Термометр, годинник	На кожне сушіння	t = 80-90oC, τ = 45 хв
ДР 1.3.1. Приготування розчину Дезактину Кх 1.3.1.1.	Розчин Дезактин	Метод аналітичної хімії за НД	Кожну операцію.	C = 0,2 % T = 5 діб t = 40±5°С
ДР 1.3.2. Приготування розчину Хлорантоїну Кх 1.3.2.1.	Розчин Хлорантоїну	Метод аналітичної хімії за НД	Кожну операцію.	C = 0,2% T = 3 доби t = 40±5°С
ДР 1.3.3. Приготування	Розчин Біомою	Метод аналітичної хімії за НД	Кожну операцію	C = 0,5% T = 3 доби

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible][illegible]

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						81
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

я розчину Біомою Кх 1.3.3.1.				$t = 40 \pm 5^\circ \text{C}$
ДР1.4.1 Щоденне прибирання Кмб1.4.1.1	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас В: КУО<10; Клас С: КУО<100; Клас Д: КУО<200.
ДР1.4.2 Генеральне прибирання Кмб1.4.2.1	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас В: КУО<10; Клас С: КУО<100; Клас Д: КУО<200.
ДР1.5.1. ДР1.5.2. Мийка та ополіскуван ня обладнання Кт1.5.1.1 Кмб1.5.1.2 Кт1.5.2.1 Кмб1.5.2.2	Температура, мікробна контамінація	Термометр, мікробіологічний метод, висіви на чашки Петрі	Температура визначаються безперервно під час виробничого процесу	КУО < 2 $\tau = 10 \text{ хв}$ $t = 100^\circ \text{C}$ $P = 0,5 \text{ Мпа}$
ДР 1.5.3. Технічний огляд та перевірка на герметичніст ь Кт 1.5.3.1.	Ферментер	Манометр Технічний	Тиск визначають безперервно під час перевірки на герметичність	$P = 0,15\text{-}$ $0,2 \text{ Мпа}$
ДР 1.5.4 Стерилізація обладнання Кт1.5.4.1 Кмб1.5.4.2	Тиск, температура	Манометр технічний, термометр, термоіндикатор	Кожну операцію	$t = 121^\circ \text{C}$ $\tau = 1 \text{ год}$ $P = 0,2 \text{ Мпа}$
ДР 2.1. Забір повітря Кт2.1.1	Повітря, що надходить з атмосфери	Пропускна здатність повітрязабірника	Кожну операцію	$[x] = 2000$ частинок/м ³
ДР 2.2. Механічна очистка повітря Кт2.2.1	Ступінь чистоти повітря	Манометр	Кожну операцію	$d_{\text{пор}} = 5\text{-}10 \text{ мкм}$
ДР 2.4 Кондиціону вання та стабілізація	Температура. Повітря, вміст мікроорганізмів та часток	Термометр. Метод визначення мікробної контамінації (проба	Беспосередньо під час нагрівання. Під час кожної	$t = 20^\circ \text{C}$ Не має життєздатних мікроорганізмів

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

параметрів повітря Кт2.4.1		повітря КУО/м3), Седиментаційний (седиментація на пластинку КУО/м3)	зміни, під час виробничого культивування	в, та максимально допустиме число часток в 1м3 повітря 200. Е = 95 %
ДР 3. Приготування 5% розчину аміаку Кх 3.1. Кт 3.2.	Аміак водний. Фільтри тонкого очищення	Ваги, мірний посуд. Годинник, манометр технічний, термометр, метод аналітичної хімії	Кожну операцію	С = 5 % t = 131°C Р = 0,15 МПа τ = 45 хв
ДР 4. Підготовка флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків. Миття флаконів Кт 4.1.	Температура Час Кількість циклів	Фізичний термометр Фізичний годинник	Кожну операцію	t = 40 – 60°C τ = 1,5 – 2 хв nциклів = 10
ДР 4. Підготовка флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків. Миття і сушка пробок, ковпачків Кт 4.2.	Температура Час	Фізичний термометр Фізичний годинник	Кожну операцію	t = 30°C τ = 1,5 – 2 хв
ДР 4. Підготовка флаконів, гумових пробок, алюмінієвих ковпачків. Стерилізація флаконів, пробок Кт 4.3. Кмб 4.4.	Температура Час Стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний	Кожну операцію	t = 130 – 134°C τ = 2 год
ДР 5.1. Приготування та стерилізація	Амінний азот рН Стерильність	Фізико-хімічний, потенціометричний, мікробіологічний	Кожну операцію	Амінний азот - 175–205 мг% рН = 6,8-7,3 t = 70°C

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						83
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

поживного середовища Біфідум Кт 5.1.1. Кмб 5.1.2.				$\tau = 30$ хв відсутність мікрофлори
ДР 5.2. Приготування захисного середовища висушування СЖЛ Кт 5.2.1. Км 5.2.2 Кх 5.2.3.	Час, температура Мікробна контамінація	Годинник, термометр, мікробіологічний	Кожну операцію	$t = 116 \pm 1^\circ\text{C}$ $\tau = 30$ хв, відсутність мікрофлори
ТП 6.1. Введення музейної культури Кт 6.1.1. Км 6.1.2.	Температура Фізіолого-морфологічний стан культури та генетичні особливості штаму, температура	Термометр технічний, мікробіологічний - мікроскопіювання	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1^\circ\text{C}$, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 6.2 Отримання культури I генерації у пробірках Кт 6.2.1. Км 6.2.2.	Флакони з культурою Температура Час рН Мікробна контамінація	Термометр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний- мікроскопіювання	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1^\circ\text{C}$ $P = 0,15\text{МПа}$ $\tau = 24-48\text{год.}$ $\text{pH} = 7,0-7,2$, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 6.3. Отримання культури II генерації в колбах Кт 6.3.1. Км 6.3.2.	Колби, з культурою Температура рН Мікробна контамінація	Термометр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний- мікроскопіювання,	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1^\circ\text{C}$ $P = 0,07\text{МПа}$ $\tau = 48\text{год.}$ $\text{pH} = 7,0-7,2$, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 6.4. Отримання культури III генерації в інокуляторі Кт 6.4.1. Км 6.4.2.	Інокулятор з культурою, Температура рН Мікробна контамінація	Термометр, манометр технічний, годинник, мікробіологічний - мікроскопіювання	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1^\circ\text{C}$ $P = 0,07\text{МПа}$ $\tau = 48\text{год.}$ $\text{pH} = 7,0-7,2$, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 7.3. Виробниче культивування Кт 7.1. Кх 7.2. Км 7.3.	Культуральна рідина в ферментері, Мікробіологічна чистота, температура тиск у	Термометр, годинник, манометр технічний, мікробіологічний- мікроскопіювання	Кожну операцію	$t = 38 \pm 1^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 6,8-7,3$ $P = 0,03-0,04$ Мпа $T = 10 - 16$ год. відсутність сторонньої

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						84
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

	ферментері тривалість культивування			мікрофлори
ТП 8. Стабілізація культуральн ої рідини Км 8.1. Кт 8.2.	Культуральа рідина, рН, мікробіологічна чистота	рН-метр, мікробіологічний- мікроскопіювання	Кожну операцію	рН=6,0-6,5, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 9. Наповнення флаконів Кт 9.1.	Об'єм у флаконі,	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Автоматично	V < 10,0 мл
ТП 10. Ліофільне сушіння препарату Кт 10.1. Км 10.2.	Температура Тривалість процесу Тиск Вологість Мікробна контамінація	Температура, годинник, манометр, психрометр, мікробіологічний- мікроскопіювання	Кожну операцію	t = 32-34 °C рН=7,0-7,4 τ = 96 год P = 26,6 Па, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 11. Укупорюван ня флаконів Кт 11.1.	Флакони з препаратом. Готовий препарат за показниками згідно АНД	Візуально	Кожну операцію	Герметично Відповідно вимогам АНД
ПМВ 12.2. Пакування флаконів з готовим продуктом в індивідуальн і упаковки Кт 12.2.1.	Кількість флаконів у картонній коробці.	Візуально	Кожну операцію	n = 10шт
ЗВ 13. Знешкодженн я відходів та промислових викидів Кт 13.1	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікро-біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм
ПВ 14. Переробка відходів Кх 14.1. Кт 14.2.	Наявність хімічних, механічних, мікро-біологічних забруднень	Кількісний хімічний та мікро-біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для даного матеріалу чи речовини

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва представлена на листі формату А1 у графічній частині дипломного проекту.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						85
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи</i>	<i>Дат</i>		

[illegible]

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

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

Підготовка поживних середовищ - основний та допоміжний технологічний процес для більшості виробництв. До апаратів для підготовки поживних середовищ належать, перш за все, реактори зі змішувачем для змішування компонентів поживного середовища, а також резервуари для зберігання різних продуктів, збірники-приймачі для приймання та зберігання рідких продуктів, насоси для подачі розчинів, дозатори та обладнання для подачі сипких компонентів, мірники рідких середовищ та ін.

Реактор зі змішувачем – сталевий або чавунний, емальований вертикальний циліндричний апарат ємністю від 0,1 до 100 м³ та більше, призначений для проведення різних фізико-хімічних процесів, у тому числі, і для підготовки рідких/напіврідких поживних середовищ. У середині знаходиться пристрій для перемішування, тиск не більше 1,6 МПа [55].

Перемішування рідких середовищ полягає в примусовому введенні в об'єм середовища імпульсної енергії, яка передається рідині та іншим наявним в ній частинкам, забезпечуючи механічне переміщення їх відносно інших та інтенсивну фізико-хімічну взаємодію їх між собою.

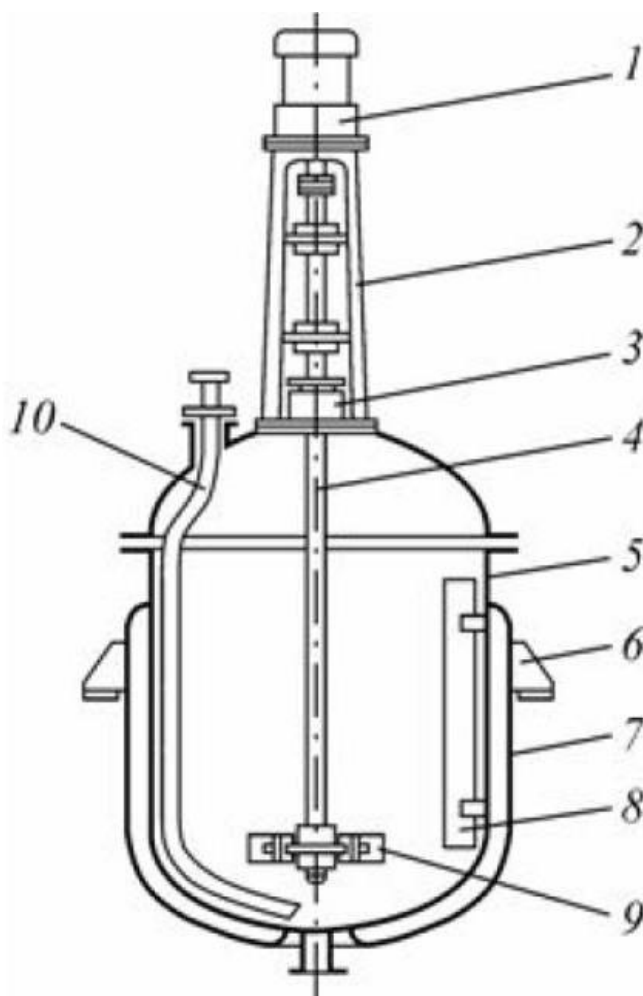
Перемішування характерне для великого різноманіття галузей промисловості (біотехнологічна, хімічна, нафтопереробна та ін.) і застосовується для приготування емульсій - змішування різних об'ємів розчинної і нерозчинної рідини, диспергування останньої на краплі та рівномірний розподіл їх в отриманій системі; суспензій – рівномірне

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Шевченко Д.А.</i>			<i>РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Консульт.</i>		<i>Фесенко С.В.</i>				<i>Д</i>	<i>86</i>
<i>Керівник Затвер.</i>		<i>Яловенко О.І.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i>	
						<i>Аркушів</i>	<i>117</i>

розподілення твердої речовини у вигляді найдрібніших частинок в об'ємі рідини в підвішеному (що не осіли) стані; сумішей – об'єднання двох і більше компонентів; гомогенізація розчинів, а також інтенсифікації тепло- і масообмінних процесів (абсорбції, розчинення, кристалізації, екстракції та ін.), хімічних та біохімічних реакцій.

Основні характеристики будь якого процесу перемішування – витрати енергії, ефективність та інтенсивність перемішування.

Найбільш поширеним способом перемішування в рідких середовищах, який застосовується в різних галузях промисловості, є механічне перемішування як порівняно простий та універсальний засіб для перемішування малов'язких і в'язких середовищ. Воно здійснюється за допомогою різних за конструктивним виконанням і швидкохідністю механічних мішалок [56].



Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

ДП 6220. 00.000 ПЗ

Арк.

87

Рис. 5.1 – Будова апарату з перемішуючим пристроєм:

1 – привід апарату; 2 – стійка приводу; 3 – ущільнення валу; 4 – вал мішалки; 5 – корпус; 6 – опора апарату (лапи); 7 – сорочка; 8 – відбивна перегородка; 9 – мішалка; 10 – труба передавлювання [57]

За конструктивними особливостями механізму перемішування механічні мішалки поділяють на лопатеві, рамні, якірні, пропелерні, турбінні і спеціальні (гвинтові, шнекові, поршневі та ін.) із вертикальним, горизонтальним або похилим розміщенням вала.

За режимом перемішування та частотою обертання перемішуючого пристрою розрізняють тихо- та швидкохідні мішалки, при цьому тихохідні мішалки перемішують в ламінарному режимі, а швидкохідні - переважно в турбулентному режимі [58].

Основними конструктивними елементами мішалок є такі: корпус, перемішувальні пристрої різних типів та механізм приводу.

В якості приводів до апаратів для перемішування рідких середовищ зазвичай використовують приводи моноблочні з мотор-редуктором, герметичні електроприводи і електродвигуни.

Як привід в тихохідних мішалках використовують агрегат мотор - редуктор (електродвигун із редуктором). Привід мішалки в основному установлюють на кришці, у ряді випадків - на окремих монтажних конструкціях. У зоні введення вала в корпус апарата, в залежності від фізико-хімічних характеристик та параметрів поживного середовища, що перемішується, а також вимог виробничої гігієни, технічної безпеки та пожежобезпеки, встановлюють ущільнення. Вал представляє собою елемент конструкції, призначений для передачі моменту від мотора – редуктора до мішалки.

У якості корпусу зазвичай використовують посудини циліндричної форми, у деяких випадках - прямокутної форми. Корпус циліндричної

посудини може мати сорочку або приварені до корпусу змійовики, у корпусі можуть установлюватися різноманітні внутрішні пристрої - барботери, передавлювальні труби та інші.

Також апарати з механічними перемішуючими пристроями оснащують відбиваючими перегородками – вузькі металеві пластини, приварені до внутрішніх стінок реактора у кількості 4-6 штук на однаковій відстані одна від одної. Вони запобігають виникненню виру, перетворюючи круговий рух рідини у вихровий, рівномірно розподілений по всьому об'єму [59,60].

Матеріали елементів апарату, поверхні яких контактують з робочим середовищем (мішалка, вал, корпус, днище, кришка) повинні бути хімічно інертними, нетоксичними до робочого середовища та корозійностійкими, а також витримувати обробку дезінфікуючими засобами та стерилізацію.

При виборі матеріалів для апаратів, необхідно враховувати, що механічні властивості матеріалів істотно змінюються в залежності від температури і тиску. Як правило, властивості міцності металів і сплавів підвищуються при низьких температурах і знижуються при високих.

В даному випадку поживне середовище перемішується при температурі $37 \pm 1^\circ\text{C}$ і тиску 1 атм. Поживні середовища не є агресивними речовинами, тому для стійкості конструкції при виготовленні апарату буде використано леговану сталь X18H10T[56,59].

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Технічна характеристика реактора зі змішувачем

Реактор зі змішувачем для поживного середовища

1. Номінальний об'єм, м ³	1,0.
2. Коефіцієнт заповнення	0,6.
3. Тип перемішуючого пристрою	турбінна шестилопатєва мішалка.
4. Кількість мішалок	1.
5. Частота обертання вала мішалки с ⁻¹	3.
6. Температура на вході, °С:	
- у змішувач	121;
- у рубашку	20.
7. Температура суміші на виході з апарату, °С:	
- зі змішувача	37;
- з рубашки	70.
8. Потужність електродвигуна, кВт	0,55
9. Тип електродвигуна – електродвигун асинхронний АИР63В2	
10. Габаритні розміри, мм:	
- довжина	1500;
- ширина	1500;
- висота	3181.
11. Маса сухого апарата, кг	1070.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Розрахунки, що підтверджують працездатність та надійність конструкції:

Необхідно розрахувати змішувач для поживного середовища.
 $V_{\text{пс}} = 0,5 \text{ м}^3$, ступінь заповнення $\varphi = 0,6$. Температура в апараті підтримується на рівні $t_c = 37^\circ\text{C}$.

Визначення теплофізичних властивостей середовища:

Теплофізичні властивості за визначальної температури – $t_c = 37^\circ\text{C}$.

Густина поживного середовища (ПС) [55]:

$$\rho_c = 1050 \text{ (кг/м}^3\text{)}.$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості ПС:

$$\mu_c = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ (Па} \cdot \text{с)}.$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості розчину ПС:

$$\nu_c = \frac{\mu_c}{\rho_c};$$
$$\nu_c = \frac{1,55 \cdot 10^{-3}}{1050} = 1,45 \cdot 10^{-6} \text{ (м}^2\text{/с)}.$$

Теплоємність розчину ПС [61]:

Коефіцієнт теплопровідності розчину ПС:

Маса поживного середовища:

$$m_{\text{пс}} = \rho_c \cdot V_{\text{пс}},$$
$$m_{\text{пс}} = 1050 \cdot 0,5 = 525 \text{ (кг)}.$$

Теплофізичних властивості сплаву:

Густина сплаву змішувача:

$$\rho_{\text{сп}} = 7850 \text{ (кг/м}^3\text{)}$$

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						91
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Теплоємність сплаву змішувача:

$$c_{\text{сп}} = 0,5 \text{ (кДж/кг} \cdot \text{К)}.$$

Конструктивний розрахунок:

Метою конструктивного розрахунку є визначення розмірів змішувача та основних конструктивних елементів.

Номінальний об'єм апарату розраховуємо за формулою:

$$V_{\text{н}} = \frac{V_{\text{пс}}}{K_3};$$
$$V_{\text{н}} = \frac{0,5}{0,6} = 0,833 \text{ (м}^3\text{)}$$

Оскільки немає апаратів з таким $V_{\text{н}}$ тому буде використовуватись найближчий існуючий $V_{\text{н}} = 1,0 \text{ (м}^3\text{)}$

Було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0). За ГОСТ 20680–86 приймаємо внутрішній діаметр апарату [62]:

$$D_{\text{вн}} = 1000 \text{ мм} = 1,0 \text{ (м)}.$$

$$D_{\text{руб}} = 1100 \text{ мм} = 1,1 \text{ (м)}.$$

$$\text{Висота корпусу } H = 1450 \text{ мм} = 1,450 \text{ (м)}.$$

Розрахуємо днище апарату. Висоту еліптичної частини днища ферментеру визначимо за формулою[63]:

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}}; h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 1000 = 250 \text{ (мм)} = 0,25 \text{ (м)}.$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату [64]

$$h_{\text{о.дн}} = 40 \text{ мм} = 0,040 \text{ м} \text{ – висота основи еліптичного днища};$$

$$S_{\text{дн}} = 12 \text{ мм} = 0,012 \text{ м} \text{ – товщина стінки еліптичного днища};$$

$$F_{\text{вн.дн}} = 1,21 \text{ м}^2 \text{ – внутрішня поверхня еліптичного днища};$$

$$V_{\text{дн}} = 161,7 \text{ дм}^3 = 0,1617 \text{ м}^3 \text{ – об'єм еліптичного днища}.$$

$$m_{\text{дн}} = 117,1 \text{ кг} \text{ – маса днища}$$

$h_{\text{дн}} = h_{\text{ел.дн}} + h_{\text{о.дн}} = 0,25 + 0,040 = 0,29 \text{ (м)}$ – повна висота днища [64].

Повний об'єм ферментера:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}};$$

звідки об'єм циліндричної частини

$$V_{\text{ц}} = V - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 1,0 - 2 \cdot 0,1617 = 0,6766 \text{ (м}^3\text{)}.$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{РН}}^2} = \frac{0,6766 \cdot 4}{3,14 \cdot 1,0^2} = 0,862 \text{ (м)}.$$

Висоту рівня рідини в апараті знаходять за формулою:

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot (V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_{\text{дн}};$$

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot (0,5 - 0,1617)}{3,14 \cdot 1,0^2} + 0,29 = 0,720 \text{ (м)}.$$

Загальна висота апарату без приводу, без штуцерів, без опор складає [65]:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 0,862 + 2 \cdot 0,29 = 1,442 \text{ (м)}$$

Загальна маса апарату дорівнює:

$$G_{\text{ап}} = G_{\text{об.к}} + 2 \cdot G_{\text{дн.к}} + G_{\text{об.р}} + G_{\text{дн.р}} + G_{\text{н}} = 188,4 + 2 \cdot 117,1 + 259,05 + 80 + 304,66 = 1066,3 \sim 1070 \text{ кг}$$

Де $G_{\text{об.к}}$ – маса обечайки корпусу, кг;

$G_{\text{дн.к}}$ – маса кришки або днища, кг;

$G_{\text{об.р}}$ – маса обечайки рубашки, кг;

$G_{\text{дн.р}}$ – маса днища рубашки, кг;

$G_{\text{н}}$ – маса неврахованих вузлів та деталей (приймаєм 40% від маси перерахованих вузлів та деталей) , кг.

$$G_{\text{об.к}} = \rho \cdot V_{\text{об.к}} = 7850 \cdot 0,024 = 188,4 \text{ (кг)},$$

$$V_{\text{об.к}} = (D_{\text{руб}} + s_{\text{руб}}) \cdot \pi \cdot H_{\text{ц}} \cdot s_{\text{руб}} = (1,1 + 0,008) \cdot 3,14 \cdot 0,862 \cdot 0,008 = 0,024 \text{ (м}^3\text{)}$$

$$G_{\text{дн.к}} = 117,1 \text{ кг};$$

$$G_{\text{об.р}} = \rho \cdot V_{\text{об.р}} = 7850 \cdot 0,033 = 259,05 \text{ (кг)},$$

$$V_{\text{об.р}} = (D_{\text{вн}} + s) \cdot \pi \cdot H_{\text{ц}} \cdot s = (1,0 + 0,012) \cdot 3,14 \cdot 0,862 \cdot 0,012 = 0,033(\text{м}^3);$$

$$G_{\text{дн.р}} = 80 \text{ кг};$$

$$\begin{aligned} G_{\text{н}} &= 0,4 \cdot (G_{\text{об.к}} + 2 \cdot G_{\text{дн.к}} + G_{\text{об.р}} + G_{\text{дн.р}}) \\ &= 0,4 \cdot (188,4 + 2 \cdot 117,1 + 259,05 + 80) = 304,66 \text{ кг}; \end{aligned}$$

Розрахунок механічного перемішуючого пристрою:

Методика розрахунку перемішуючих пристроїв вертикальних ємнісних апаратів регламентується керівним нормативним документом

С.-Петербурзького філіалу НІІХІММАШ РД 26-01-90-85 [66].

Цей розрахунок проводиться для усіх апаратів із механічними мішалками при проектуванні та реконструкції виробництва.

Для приготування поживного середовища обираємо реактор зі змішувачем з шестилопатевою відкритою турбінною мішалкою (рис.5.2) [56,62].

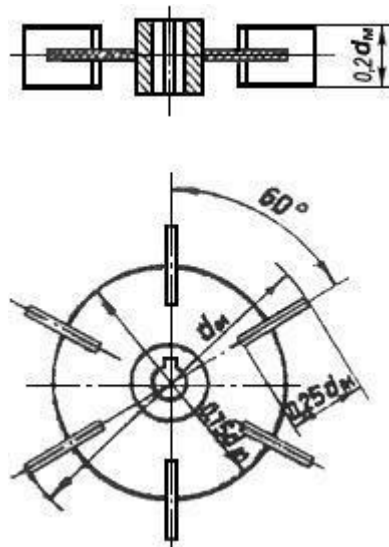


Рис.5.2 Турбінна мішалка [62]

За [56] та ГОСТ 20680-75 основні співвідношення розмірів перемішуючого пристрою для відкритої турбінної мішалки:

$$D \ d_M = 3 \div 4;$$

$$h_M \ d_M = 0,2;$$

$$h \ d_M = 0,4;$$

$$l \ d_M = 0,25;$$

$$b \ d_M = 0,1;$$

$$\xi_M = 8,4$$

Діаметр перемішуючого пристрою визначаємо за формулою:

За ГОСТ 20680-75 даний d_M відповідає стандартному.

Визначемо основні параметри мішалки

Висота лопатей:

$$h_M = 0.2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,25 = 0.05 \text{ (м)}.$$

Ширина лопаті мішалки:

$$l_L = 0.25 \cdot d_M = 0.25 \cdot 0.25 = 0.0625 \text{ (м)}.$$

Висота від днища до верхньої грані лопаті мішалки:

$$h = 0.5 \cdot d_M = 0.5 \cdot 0.25 = 0.125 \text{ (м)}.$$

Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки: $\xi_M = 8,4$

При $n=3 \text{ с}^{-1}$ знайдемо швидкість мішалки ω :

$$\omega = n \cdot \pi \cdot d_M = 3 \cdot 3.14 \cdot 0.25 = 2,35 \left(\frac{\text{м}}{\text{с}}\right)$$

Ширина відбивної перегородки:

$$b = d_M \cdot 0,1 = 250 \cdot 0,1 = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ (м)}$$

Довжина відбивної перегородки:

$$B = 0,08 \cdot D = 0,08 \cdot 1,0 = 0,08 \text{ (м)}$$

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування:

Витрата потужності відбувається в ущільненні та безпосередньо при перемішуванні.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						95
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях вала мішалки залежить від діаметра вала d_v в місці ущільнення.

Тому знайдемо діаметр валу перемішуючого пристрою d_v [57]:

$$d_v = C \cdot d_m = 0,117 \cdot 0,25 = 0,0292(\text{м})$$

де C – для турбінної мішалки 0,117 [11].

Приймаємо одинарне торцеве ущільнення для якого [67]:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_v^{1.3} = 6020 \cdot 0,0292^{1.3} = 60,9(\text{Вт})$$

Торцеве ущільнення обираємо тому, що воно має високу герметичність у порівнянні з аналогами. Торцеве ущільнення має високий ККД, високу зносостійкість, довговічність, добре працює при наявності биття вала.

Знаходимо потужність, що витрачається на перемішування. Значення K_n визначається з таблиці для $K_N = f(Re_{\text{ц}})$ [67]

$$Re_{\text{ц}} = \frac{\rho_p \cdot n \cdot d_m^2}{\mu_p} = \frac{1050 \cdot 3 \cdot 0,25^2}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 12,7 \cdot 10^4;$$

$$\rho_p = 1050 \left(\frac{\text{кг}}{\text{м}^3} \right) - \text{густина поживного середовища}$$

$$= 1,55 \cdot 10^{-3} (\text{Па} \cdot \text{с}) - \text{динамічна в'язкість}$$

За графіком нормалі знаходимо значення $K_N = f(Re_{\text{ц}})$:

$$K_N = 7.$$

Тоді потужність для однієї мішалки:

$$N_1 = K_N \cdot \rho_{\text{сум}} \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 7 \cdot 1050 \cdot 3^3 \cdot 0,25^5 = 193,8(\text{Вт})$$

Розрахункова потужність на валу мішалки:

$$N_p = k_1 \cdot k_2 \cdot \left(\sum k + 1 \right) \cdot N_1;$$

де k_2 – коефіцієнт, що враховує збільшення потужності, що споживається, при пуску чи в результаті збільшення опору середовища при перемішуванні, приймаємо $k_2 = 1,1$.

Коефіцієнт, що враховує ступінь заповнення апарату середовищем:

$$k_1 = \frac{N_p}{D_{RH}};$$

$$k_1 = \frac{0,720}{1,0} = 0,72$$

Сума коефіцієнтів, що враховують збільшення потужності через наявність в апараті допоміжних пристроїв :

$$\sum k = 0,2 + 0,1 = 0,3$$

Тоді :

$$N_p = 0,72 \cdot 1,1 \cdot (0,3 + 1) \cdot 193,8 = 199,53 \text{ (Вт)}.$$

Кінцева встановлена потужність приводного електродвигуна для перемішуючого пристрою ферментера:

$$N_{уст} = 1,15 \cdot \frac{N_p + N_{уш}}{\eta} = 1,15 \cdot \frac{199,53 + 60,9}{0,95} = 305,6 \text{ (Вт)}.$$

де $\eta=0,95$ – ККД редуктора приводу.

Згідно даних розрахунків візьмемо з каталогу електродвигунів стандартний двигун та ротор: електродвигун асинхронний АИР63В2 на 0,55 кВт 3000 об/хв. У даному випадку він буде працювати не на повну потужність.

Тепловий розрахунок:

Метою теплового розрахунку є визначення теплового навантаження апарату і поверхні теплообміну теплообмінних пристроїв апарату.

В процесах нагрівання (охолодження) середовища в апаратах тепла енергія підводиться (відводиться) теплоносієм, що поступає в теплообмінні пристрої апарата: сорочку.

Теплота, що підводиться до середовища в апараті (нагрівання) або відводиться від нього (охолодження) визначається з рівняння теплового балансу.

Тепловий розрахунок полягає у тому, щоб вирахувати необхідну площу поверхні теплообміну, котру знаходять з основного рівняння теплопередачі:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp}},$$

Q – теплове навантаження теплообмінного апарату, визначають з теплового балансу; K – коефіцієнт теплопередачі; Δt_{cp} – середній температурний натиск.

Однією із задач реактора це охолодити суміш з температури $t_1 = 121$ °С до температури $t_2 = 37$ °С

Розрахуємо підвід теплоти для нагріву реактора:

$$Q = \sum G_i \cdot c_i \cdot (t_1 - t_2),$$

$$Q = (1050 \cdot 0,5 + 525 \cdot 4) \cdot (121 - 37) = 220500 \text{ (кДж)}.$$

де G_1, G_2 – маси апарата, поживного середовища;

c_1, c_2 – питомі теплоємності матеріалу апарата, поживного середовища.

Визначаємо середню температуру теплоносія. Якщо в реакторі, після автоклавування температуру необхідно зменшити з $t_1 = 121$ °С до температури $t_2 = 37$ °С – температури культивування.

При охолодженні суміші від t_1 до t_2 холодною водою (припустимо, що температура водопроводу буде завжди $t_3 = 20$ °С, згідно з СанПіН) кінцева температура води в рубашці, по мірі охолодження поживного середовища, буде зростати. В кінці процесу охолодження температура води стане рівною $t_4 = 45$ °С. Тоді середня різниця температур складе:

$$\Delta t_{cp} = \frac{t_1 - t_2}{\ln\left(\frac{t_1 - t_3}{t_2 - t_3}\right)} \cdot \frac{A - 1}{A \cdot \ln A} = \frac{121 - 37}{\ln\left(\frac{121 - 20}{37 - 20}\right)} \cdot \frac{2.125 - 1}{2.125 \cdot \ln 2.125} = 33.1 \text{ (}^\circ\text{C)},$$

$$A = \frac{t_2 - t_3}{t_4 - t_2} = \frac{37 - 20}{45 - 37} = 2.125,$$

Тоді:

$$M_T = \frac{Q}{C_T \cdot \Delta t_T} = \frac{22,050 \cdot 10^7}{4200 \cdot 33,1} = 1586,1 (\text{кг}).$$

де $C_T = 4200$ (Дж/кг · К) – питома теплоємність теплоносія,

Масові витрати теплоносія:

$$G_T = \frac{M_T}{\tau_{\text{пр}}} = \frac{1586,1}{3600} = 0,44 (\text{кг/с});$$

Для визначення поверхні теплообміну необхідно знайти коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у апараті та коефіцієнт теплопередачі [61].

Розрахуємо еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2ab}{a+b} = \frac{2 \cdot 0,04 \cdot 0,11}{0,04 + 0,11} = 0,0586 (\text{м}).;$$

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{\text{ст}} - D}{2} = \frac{1,1 - 2 \cdot 0,06 - 1,0}{2} = 0,04 (\text{м}).$$

де $\delta_{\text{ст}} = 0,06$ м – товщина стінки,

$D_c = 1,1$ м – діаметр сорочки реактора,

$$b = 0,15 - a = 0,15 - 0,04 = 0,11 (\text{м}).$$

Середній діаметр реактора:

$$D_{\text{ср}} = D_c - a = 1,1 - 0,04 = 1,06 (\text{м});$$

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{d_m}{\nu_c} (n \cdot d_m) = \frac{0,25}{1,45 \cdot 10^{-6}} (3 \cdot 0,25) = 12,9 \cdot 10^4;$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c} = \frac{1,55 \cdot 10^{-3} \cdot 4000}{0,6} = 10,33.$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (12,9 \cdot 10^4)^{0,59} \cdot 10,33^{0,38} = 3395,7$$

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища у ферментері становить:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D} = \frac{3395,7 \cdot 0,6}{1,0} = 2037,42 \text{ (Вт/м}^2 \cdot \text{К)}.$$

Визначаємо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія.

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_T = \frac{G_T}{\rho_T} = \frac{0,44}{994,8} = 4,43 \cdot 10^{-4} \text{ (м}^3/\text{с)};$$

де $\rho_T = 994,8$ – густина теплоносія при температурі $t_T = 33^\circ\text{C}$.

Швидкість руху теплоносія:

$$W_T = \frac{V_T}{ab} = \frac{4,43 \cdot 10^{-4}}{0,04 \cdot 0,11} = 0,101 \text{ (м/с)}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{\text{екв}}}{\nu_T} = \frac{0,101 \cdot 0,0586}{0,79 \cdot 10^{-6}} = 7491,9;$$

де $\nu_T = 0,79 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ – кінематична в'язкість теплоносія при температурі $t_T = 33^\circ\text{C}$,

Так як $Re_T < 10000$, то критерій Нуссельта визначаємо за критеріальним рівнянням:

$$Nu_T = 0,037 \cdot Re_T^{0,8} \cdot Pr_T^{0,43}.$$

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						100
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Критерій Прандтля:

$$Pr_T = \frac{\mu_T \cdot c_T}{\lambda_T} = \frac{0,801 \cdot 10^{-3} \cdot 4190}{0,599} = 5,6.$$

де $\mu_T = 0,801 \cdot 10^{-3}$ Па · с – коефіцієнт динамічної в'язкості теплоносія при температурі $t_T = 33^\circ\text{C}$,

$C_T = 4190$ Дж/кг · К – питома теплоємність теплоносія при $t_T = 20^\circ\text{C}$,

$\lambda_T = 0,599 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$ – питома теплопровідність теплоносія при

Тоді:

$$Nu_T = 0,037 \cdot (7491,9)^{0,8} \cdot 5,6^{0,43} = 97,6.$$

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці становить:

$$\alpha_{T_1} = \frac{Nu_T \lambda_T}{d_{\text{екв}}} = \frac{97,6 \cdot 0,599}{0,0586} = 997,6 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}.$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}} = \frac{1}{\frac{1}{2037,42} + \frac{0,03}{16} + \frac{1}{997,6}} = 303,03 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К};$$

де $\lambda_{\text{ст}} = 16$ Вт/м · К – теплопровідність стінки,

Розрахункова поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{\text{ср}} \cdot \tau_{\text{пр}}} = \frac{22,050 \cdot 10^7}{303,03 \cdot 33,1 \cdot 3600 \cdot 2,5} = 2,44 \text{ м}^2$$

Розрахуємо дійсну поверхню теплообміну:

$$F_{\text{дій}} = \pi \cdot D_{\text{вн}} \cdot H_c + F_{\text{вн,дн}} = 3,14 \cdot 1,0 \cdot 0,43 + 1,21 = 2,56 \text{ (м}^2\text{)},$$

$$H_c = H_p - h_{\text{дн}},$$

$$H_c = 0,720 - 0,29 = 0,43 \text{ (м)}.$$

Розрахована площа теплообміну має бути меншою за дійсну площу, яку забезпечує даний реактор зі змішувачем.

$$F_{\text{роз}} < F_{\text{дій}},$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$2,44 < 2,56 \text{ (м}^2\text{)}$$

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Підбір діаметрів штуцерів для апарату що перемішує поживне середовище:

Розрахункова схема штуцера зображена на рис. 5.3

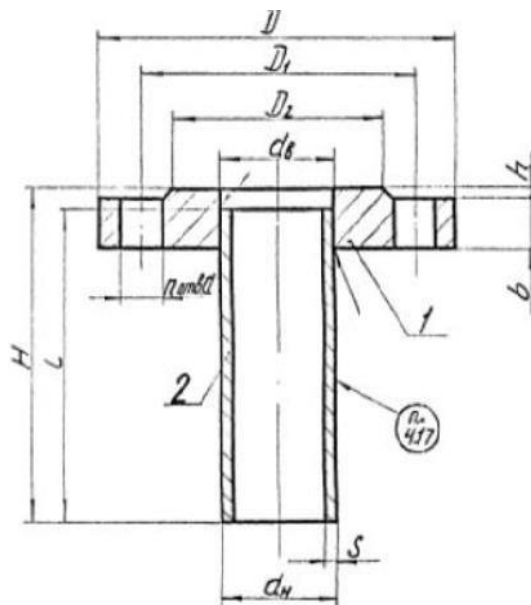


Рисунок 5.3 Розрахункова схема штуцера

1 – фланець по ГОСТ 12820; 2 – патрубок

Вхідні данні:

Масова витрата рідини $G = 0,45 \left(\frac{\text{кг}}{\text{с}} \right)$;

Швидкість рідини $\omega = 0,5 \left(\frac{\text{м}}{\text{с}} \right)$.

Діаметр штуцерів:

$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot G}{\pi \cdot \omega \cdot \rho_{\text{пл}}}},$$

$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,45}{3,14 \cdot 0,5 \cdot 1050}} = 0,024 \text{ (м)}$$

Приймаємо стандартний штуцер з найближчим діаметром по ГОСТ 12820.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат

ДП 6220. 00.000 ПЗ

Арк.

103

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Вибір загальнозаводського обладнання включає в себе врахування усіх можливих факторів виробничого процесу. Загальнозаводське обладнання для обраної технології має задовольняти вимоги, які забезпечили б неможливість контамінації на стадіях виробничого процесу (підготовка поживного середовища, виробниче культивування, тощо) та асептичність виробництва. Особливої уваги потребують фільтри, насоси та вентиляція, які будуть використані [68].

Стадія підготовки поживного середовища потребує перекачування рідин по трубопроводам. Тому необхідне використання таких насосів, що з одного боку унеможливають викиди поживного середовища у навколишнє середовище, а з іншого, не допускають контамінації (забезпечують стерильність). Дані властивості характерні для відцентрових герметичних (сальникових) насосів типу: ЦГ, ХГ. Їх великою перевагою є те, що при подачі та відводі поживного середовища чи інших рідини, за допомогою даних насосів, неможливе інфікування середовища, завдяки відсутності сальникових і торцевих ущільнень. Вищезазначені насоси вироблені зі спеціальної нержавіючої сталі Х18Н10Т (ГОСТ 20791-83. Электронасосы центробежные герметичные. Технические условия) [69] та цим самим забезпечують стійкість корпусу до вибухів. Продуктивність - від 3 до 200 м³/год. Потужність - від 1,1 до 75 кВт. Температура рідини від -40 до +360 °С.

Велика частина води на підприємстві, приблизно 80%, необхідна для охолодження виробничого обладнання. Ці потреби задовольняються проектуванням системи зворотного водопостачання.

Для підготовки води очищеної використовують систему для очищення води PURELAB Option-R60. Очищення води, яке забезпечується

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						104
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

даною установкою, може використовуватися для таких потреб як, приготування поживних середовищ, приготування розчинів для лабораторних досліджень, вода для роботи різноманітного обладнання стерилізаторів, автоклавів тощо. Продуктивність 60 л/год.

Надійна система вентиляції та пневмотранспорту – важлива складова підготовки підприємств. Щоб задовольнити рух повітряних мас та газових сумішей, що є неагресивними по відношенню до вуглеводневої сталі трубопроводу, перевагу було віддано радіальним вентиляторам ВЦ 14 – 46 (ВР 280-46). Дані вентилятори мають змогу рухати повітряні маси та газові суміші, температура яких не більша +80°C. Продуктивність цього вентилятора становить 18000 м³/год.

Системи очистки повітря – важлива складова роботи біотехнологічного підприємства. У чистих виробничих приміщеннях, де проходять виробничі процеси, повітря має дуже важливе значення і здійснює вплив на якість та властивості виробленої продукції. На підприємстві присутні приміщення таких класів чистоти: В, С, Д. Для них підійдуть фільтри грубої та тонкої очистки. Фільтри класу F7, як фільтри другого ступеня очистки, разом з високоефективними фільтрами HEPA H13-14, забезпечать затримку до 99,995% дрібних мікрочасток з розміром до 3 мкм.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Охорона навколишнього середовища.

Значний розвиток біотехнологічної промисловості потребує великої уваги до організації техніки безпеки, створенню безпечних і безаварійних умов праці на підприємствах галузі. Персонал, котрий приймає участь у виробничому процесі, потенційно піддається впливу різних небезпек, до яких можна віднести високі температура й тиск в апаратах і трубопроводах, контакти з хімічними й агресивними рідинами та ін. Таким чином, основною умовою безпечної роботи є постійний контроль і суворе дотримання технологічної дисципліни, технологічного регламенту, дотримання при цьому правил і норм техніки безпеки й виробничої санітарії.

Виробництво пробіотичного препарату характеризується відносно невеликою кількістю технологічних та вентиляційних викидів в атмосферу, що в свою чергу забезпечує підтримання чистоти навколишнього середовища.

Загальна кількість стоків з виробництва становить до 30 м³/добу.

В даних стоках концентрація забруднень знаходиться в межах ГДК для скидання в мережу каналізацій з подальшим відведенням в міські споруди біологічної очистки.

Проектування виробничої каналізації було здійснено таким методом, щоб було можливим відведення стоків з технологічного обладнання до окремого колодязю міської мережі господарчо-побутової каналізації з можливістю здійснення контролю за складом та концентрацією токсичних речовин.

Характеристика відходів свідчить про екологічну відповідність виробництва пробіотику екологічним нормам

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						106
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат		

Охорона праці

У процесі виробництва пробіотичного препарату використовуються шкідливі, пожежо- та вибухонебезпечні, токсичні, горючі речовини і матеріали. Також має місце застосування електричної, механічної, теплової енергії, вакууму. Транспорт сировини та готової продукції представлений конвеєрами та трубопроводами.

Проект виконано за вимогами охорони праці, пожежної безпеки та екології.

Апарати з перемішувачими пристроями для забезпечення безпечної експлуатації повинні відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003-91, ГОСТ 12.2.007.9-93 і конструкторським документам на апарат даного типу.

Для створення безпечних умов праці слід передбачити засоби захисту від небезпечних та шкідливих факторів [68].

Для зменшення шкідливих виробничих факторів, було передбачено:

1. Зони, де має місце використання шкідливі речовини, передбачені вентиляцією, що забезпечує зменшення вмісту шкідливих речовин в повітрі нижче ГДК, за регламентованими державними стандартами та санітарними нормами;
2. До роботи персонал допускається лише у спец одязі, спецвзутті та з індивідуальними засобами захисту, що регламентовані у виробничій інструкції;
3. Для обладнання, з електропроводом та для силового електрообладнання обов'язково необхідне заземлення чи занурення;
4. На робочих місцях наявні аптечки першої допомоги;
5. Технологічний процес можливий лише за повної справності та працездатності виробничого обладнання та КВП;
6. З метою зменшення шуму на технічному поверсі встановлено вентеляційне обладнання зі звукозахисною ізоляцією.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						107
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>		

Максимально безпечна експлуатація вентиляційних систем забезпечується шляхом врахування наступних технічних рішень: зворотні та вогнезатримуючі клапани на повітроводах згідно з призначенням; централізоване відключення вентиляційних установок при пожежі.

З метою унеможливлення виникнення пожежі чи вибуху та забезпечення пожежної безпеки, приміщення мають бути оснащені наступними проектними та інженерно технічними рішеннями [70,71]:

1. Приміщення, що мають різну пожежну безпеку мають бути розділені протипожежними перегородками з гіпсокартону що заповненні мінеральними плитами (з границею вогнестійкості 1.25 години), та з протипожежними дверима (з границею вогнестійкості 0,6 години);

2. У коридорах на шляхах евакуації для персоналу передбачено протидимові та протипожежні перегородки;

3. На шляхах евакуації персоналу у нішах розмішені пожежні шафи з пожежними кранами;

4. Електропроводка за підвісною стелею має бути виконана з кабелів з мідними жилами у оболонці, для запобігання розповсюдження горіння;

5. Проводка кабелів та дротів крізь стіни виконана з обрізів сталевих труб що закрита вогнетривкою сумішшю.

Існуючи довжина евакуаційних шляхів та ширина дверей відповідає СНиП 2.01.02-85 «Протипожежні норми».

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину обрано продуцент *Bifidobacterium bifidum* № 1, так як зазначений штами володіє вираженими пробіотичними властивостями, проявляє резистентність до антибіотиків, антагоністичний по відношенню до ряду патогенних бактерій.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів пробіотичних препаратів та запропоновано схему отримання продуценту зі застосуванням індукованого мутагенезу. Як мутаген було обрано УФ-випромінювання. Довжина УФ-хвиль складає 260 нм., тривалість обробки – 60 с., виживаність складає 0,1-1%.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Bifidobacterium bifidum* № 1 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі панкреатичного гідролізату казеїну, екстракту пекарських дріжджів, а також визначені раціональні параметри культивування: температура $38 \pm 1^\circ\text{C}$, тривалість 10-16 год, рН в апараті підтримувати в межах 6,8—7,3, аерація відсутня.

4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для приготування поживного середовища з метою культивування продуценту було обрано і розраховано реактор зі змішувачем об'ємом 1000 л. з коефіцієнтом заповнення 0,6 та шестилопатевою турбінною мішалкою, який дозволяє отримати поживне середовище належної якості.

5. Запропоновано використання желатину, сахарози та знежиреного молока, як компонентів захисного середовища, що обумовлюють захист клітин від несприятливого впливу заморожування і зневоднення, а також для отримання необхідної структури сухої біомаси препарату.

					<i>ДП 6220. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпи с</i>	<i>Дат</i>	<i>ВИСНОВКИ</i>		
<i>Розробив</i>	<i>Шевченко Д.А.</i>						
<i>Консульт.</i>							
<i>Керівник</i>	<i>Яловенко</i>						
					<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
					<i>Д</i>	<i>109</i>	<i>117</i>
					<i>КПІ ім. Ігоря</i>		

	<i>О.І.</i>			<i>Сікорського</i> <i>ФБТ</i>
<i>Затвер.</i>				

6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва пробіотичного препарату Біфідумбактерину в флаконах по 5 доз (1 доза – 10^9 КУО/см³), які упаковані в коробки по 10 флаконів.

					ДП 6220. 00.000 ПЗ	Арк.
						110
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпи	Дат		

[illegible]

