

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна бакалаврська робота

на тему: «Технологія отримання Біфідумбактерину»

Виконав: студент 4 курсу, групи ББТ-19
спеціальності 162 Біотехнології та
біоінженерія
Катерина ЛУПАН
Керівник: к.т.н., доц. Ірина ВОЛОШИНА
Рецензент: к.т.н., доц. Олена ОХМАТ

Київ 2023

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра
д.т.н., проф. Олена
МОКРОУСОВА

«_____» _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНИЙ БАКАЛАВРСЬКИЙ ПРОЄКТ СТУДЕНТУ
Лупан Катерини Олександрівни

1. Тема дипломного бакалаврського проекту: **Технологія отримання Біфідумбактерину**

Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом закладу вищої освіти
від «8» листопада 2022 року № 224-уч.

2. Строк подання студентом дипломного проекту _____

3. Вихідні дані дипломного проекту: препарат Біфідобактерин, Bifidobacterium bifidum, наукова сучасна література, характеристика продуценту, технологічна схема, обґрунтування технологічного процесу, методи контролю, матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломного проекту: техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва, характеристика біологічного агенту, опис технологічної схеми, контроль якості цільового продукту, висновки, список використаних джерел.

5. Дата видачі завдання ХХХ.04.2023

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломного бакалаврського проєкту	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1. Техніко-економічне обґрунтування		
3	Розділ 2. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
4	Розділ 3. Характеристика біологічного агента		
5	Розділ 4. Опис технологічної схеми		
6	Розділ 5. Контроль якості цільового продукту		
7	Висновки		
8	Оформлення дипломного бакалаврського проєкту		
9	Подання дипломного бакалаврського проєкту на кафедру для рецензування		
10	Перевірка дипломного бакалаврського проєкту на наявність ознак плагіату		З підписами працівника відділу моніторингу якості підготовки фахівців та аналітичної роботи, наукового керівника, студента
11	Подання дипломного бакалаврського проєкту на затвердження завідувачу кафедри		З підписами завідувача кафедри, наукового керівника і студента

Студент _____ Катерина ЛУПАН
 Науковий керівник _____ Ірина ВОЛОШИНА
 Рецензент _____ Олена ОХМАТ

АНОТАЦІЯ

Катерина ЛУПАН. Технологія отримання Біфідумбактерину.

Дипломний бакалаврський проект за спеціальністю 162 Біотехнологія та інженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023 рік.

Дипломний бакалаврський проект присвячено технології отримання Біфідумбактерину, використовуючи *B.bifidum* BGN4 у якості штаму-продуцента, у відповідності до технічного обґрунтування. Адже цей штам проявляє антагоністичні властивості до патогенних бактерій, резистентність до антибіотиків, має пробіотичні властивості.

У дипломному проекті обґрунтовано технологію виробництва Біфідумбактерину, отриманого на основі *B.bifidum* BGN4. Розраховано кількість виробничих циклів, необхідні об'єми обладнання. Обґрунтовано вибір біологічного об'єкту, поживного середовища, умов та стадій його приготування, технологічного обладнання для реалізації отримання культуральної рідини. Представлено технологічну схему виробництва, яка передбачає допоміжні стадії приготування приміщення, обладнання, поживного середовища, отримання посівного матеріалу та ведення основного біосинтезу. Також описані методи контролю основного біосинтезу.

Ключові слова: біфідобактерії, *Bifidobacterium bifidum* BGN4, модифіковане поживне середовище МРС, біосинтез, контроль якості.

ABSTRACT

Kateryna LUPAN. Bifidumbacterin production technology.

Bachelor's diploma project in specialty 162 Biotechnology and engineering. - Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2023.

The bachelor's diploma project is devoted to the technology of obtaining Bifidumbacterin, using *B.bifidum* BGN4 as a producer strain, in accordance with the technical rationale. This strain shows antagonistic properties to pathogenic bacteria, resistance to antibiotics, and has probiotic properties.

The diploma project substantiates the production technology of Bifidumbacterin obtained based on *B. bifidum* BGN4. The number of production cycles, the necessary volumes of equipment are calculated. The choice of the biological object, nutrient medium, conditions and stages of its preparation, technological equipment for the realization of the production of culture fluid is substantiated. The technological scheme of production is presented, which provides for the auxiliary stages of preparing the room, equipment, nutrient medium, obtaining seed material and conducting the main biosynthesis. Methods of controlling the main biosynthesis are also described.

Key words: bifidobacteria, Bifidobacterium bifidum BGN4, modified MRS nutrient medium, biosynthesis, quality control.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	11
РОЗДІЛ 1. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	13
1.1 Характеристика Біфідумбактерину.....	13
1.2 Потреба у цільовому продукті.....	14
1.3 Розрахунок потужності виробництва.....	16
1.3.1 Розрахунок кількості біфідумбактерину для лікування та профілактики.....	16
1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера.....	17
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА.....	19
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	19
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу.....	27
2.2.1 Обґрунтування вибору ферментера.....	27
2.2.2 Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря.....	29
2.2.3 Вибір миючих та дезінфікуючих засобів.....	30
2.2.3.1 Миючі засоби.....	31
2.2.3.2 Підбір концентрації миючих засобів.....	31
2.2.3.3 Обґрунтування вибору миючого засобу для оброблювальних об'єктів.....	32
2.2.3.4 Дезінфікуючі засоби.....	33
2.2.3.5 Обґрунтування вибору методу дезінфекції.....	33
2.2.3.6 Обґрунтування вибору способу дезінфекції.....	34
2.2.3.7 Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу для оброблювальних об'єктів.....	35
2.2.3.8 Обґрунтування вибору для обробки обладнання.....	36

2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу з наведенням складу поживного середовища...	36
2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	36
2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі.....	37
2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі.....	38
2.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці.....	38
2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу.....	39
2.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	
2.4.1.1 Обґрунтування приготування поживного середовища для колба та інокулятора об'ємом 3 л.....	41
2.4.1.2 Обґрунтування та приготування поживного середовища для інокулятора об'ємом 30 л.....	42
2.4.1.3 Приготування поживного середовища для ферментера об'ємом 0,3 м ³	43
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	44
3.1 Таксономічне положення.....	44
3.2 Морфолого-культуральні властивості.....	44
3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	45
РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	47
4.1 Поетапна блок-схема технології.....	47
4.2 Опис технологічної схеми.....	47
РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	66
5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу.....	66
5.2 Фізико-хімічний контроль.....	69

ВИСНОВКИ.....	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	64
ДОДАТКИ.....	72

ВСТУП

В сьогоденних умовах майже 90% населення України мають порушення кількісного та якісного складу шлунково–кишкової мікрофлори - дисбактеріоз [2]. Основними факторами, що впливають на здорову мікрофлору є нераціональне харчування, кишкові інфекції, стрес, погіршення екології, ферментативна недостатність, зниження імунологічної реактивності та безконтрольне вживання хіміотерапевтичних препаратів, а саме антибіотиків. Це все пригнічує адаптаційні можливості організму, обумовлює нейрогуморальні зміни через дисбаланс продукування нейромедіаторів, та призводить до порушення здорової мікрофлори кишечника.

Нині для лікування таких розладів використовують пробіотики, що є біологічно-активними добавками, де основною діючою речовиною є живі мікроорганізми. З самих перших днів людини біфідобактерії є найчисельнішими представниками здорової мікрофлори - 80-90% від усіх мікроорганізмів кишечника новонародженого. Тож пробіотики на основі біфідобактерій є одними з високоефективних.

Біфідобактерії синтезують біологічно активні метаболіти, пригнічують життєдіяльність патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, стимулюють діяльність імунної системи. Серед біфідобактерій найчастіше застосовують та вивчають: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*. Для виробництва препарату Біфідумбактерин використовуються бактерії *Bifidobacterium bifidum*. Біфідумбактерин відноситься до пробіотиків I покоління, є класичним однокомпонентним пробіотиком, до якого відносяться рідкі чи сухі препарати, що складаються з одного штаму мікроорганізму.

Актуальність даної теми полягає в тому, що потреба в пробіотичних препаратах росте тому, що це найбезпечніший спосіб відновлення

мікрофлори після вживання антибіотиків та незбалансованого харчування. З огляду на це особливої актуальності набуває розробка ефективного пробіотичного препарату, який матиме більш широкий спектр дії, адже пробіотики призначають й для ряду інших захворювань: мігрені, алергії, астмі, цукровому діабеті, бронхіті, пневмонії, фарингіті, гіпоглікемії тощо. Вже починаються дослідження з позитивним результатом, де *B.bifidum* BGN4 покращує когнітивні здібності та здатність пам'яті мишей, ефективно полегшує хвороби Альцгеймера. Пробіотичні добавки з цим штамом покращують розумову гнучкість і зменшують стрес у літніх людей [54]. Дослідження таких препаратів ще проводяться, але будь-яка інновація вже готового продукту наближає нас до ліків майбутнього.

Новизною даного проекту є використання нового штаму *Bifidobacterium bifidum* BGN4, який в порівнянні з іншими має властивості високої адгезивності (рієнь гідрофобності поверхні, тобто адгезивності 93% в порівнянні з іншими штамми *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* [58]), антагоністичності, також показує антиканцерогенний та імуномодельючий вплив [52], [55]. Вибраний нами штам продемонстрував найбільшу антипроліферативну дію на лінії клітин раку товстої кишки людини [58]. Тож є ефективнішим у застосуванні, адже має більший спектр дії. Нещодавно були проведенні нові дослідження, які показали прояви антиоксидантних, протизапальних, протиалергенних властивостей цього штаму [60]. Також було відкрито потенційно терапевтичний потенціал *B. bifidum* BGN4, а саме введення цього штаму мишам ефективно пригнічувало процеси апатозу, амілоїдоз, покращувало синаптичну пластичність, послаблювало когнітивні порушення та порушення пам'яті піддослідним [54].

Метою дипломного проекту є розробка технології отримання Біфідумбактерину в цілях профілактики та лікування людей будь-якого віку та забезпечення українського ринку високоякісним пробіотичним препаратом.

Завданнями для досягнення мети є:

1. Обґрунтування вибору продуценту, аналіз його переваг та опис морфолого-культуральних, фізіологічних властивостей;
2. Вибір та обґрунтування технологічної схеми отримання препарату;
3. Опис технологічної схеми отримання Біфідумбактерину, вибір поживного середовища, умов та параметрів культивування;
4. Опис методів контролю, що застосовуються при отриманні препарату.

РОЗДІЛ 1

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 Характеристика Біфідумбактерину

Біфідумбактерин - це дієтична добавка, що сприяє нормалізації і підтримці нормальної мікрофлори кишечника, яка складається з живих біфідобактерій.

Ми розглянемо лікарський засіб «Біфідумбактерин» від компанії Біофарма.

Латинська назва - *Bifidobacterium bifidum*. В одній дозі препарату міститься не менше $1 \cdot 10^7$ КУО біфідобактерій. Окрім цього Біфідумбактерин містить допоміжні речовини: сахарозу або цукор дрібнокристалічний, желатин, молоко знежирене або згущене нежирне стерилізоване.

Препарат представлений у вигляді порошку (кристалічна або пориста маса) бежевого кольору різної інтенсивності або бежевого кольору з сіруватим відтінком зі специфічним запахом і смаком. При додаванні води утворює гомогенну завись сірувато-бежевого кольору.

Біфідумбактерин належить до антидіарейних мікробних препаратів. Терапевтичний ефект препарату визначають живі біфідобактерії.

Фармакологічна дія полягає у лікуванні та профілактиці кишкових дисфункцій, що виникли на тлі порушень кишкової мікробіоти. При діатезах та інших проявах алергії, при порушеннях кишкових функцій, після перенесення антибактеріальних терапій для відновлення мікробіоти кишечника.

Біфідумбактерин має антагоністичну активність проти широко спектра патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів.

Переваги застосування цього препарату: нормалізація діяльності шлунково-кишкового тракту, стимуляція функціональної діяльності травної системи,

стимуляція функціональної діяльності травної системи, підвищення неспецифічної резистентності організму.

Також Біфідумбактерин використовується в медичній практиці як дієтична добавка до раціону харчування.

1.2 Потреба у цільовому продукті

Майже 90 % населення України має порушення кількісного та якісного складу шлунково–кишкової мікрофлори, що позначаються термінами «дисбактеріоз» або «дисбіоз» [2]. Мікрофлору кишечника складають живі бактерії - патогенні і корисні організми. Основна мікрофлора має контролювати патогенну флору в здорової людини, таким чином утворюючи баланс.

Дисбактеріозами страждають жителі екологічно несприятливих територій, пацієнти практично всіх стаціонарів і амбулаторних служб, порушення нормальної мікрофлори яких формуються в результаті впливу на організм фізичних, хімічних, радіаційних та інших факторів [3].

Для відновлення порушеної мікрофлори людини використовують різноманітні прийоми, перш за все, введення у великих кількостях антагоністичних штамів бактерій – представників нормальної мікрофлори у складі пробіотичних препаратів або функціональних продуктів. Найменші побічні ефекти при тривалому застосуванні виявляють пробіотики, до складу яких входять біфідобактерії. Біфідобактерії є ефективним біокоректором, що володіє багатфакторним регулюючим і стимулюючим впливом на організм.

Відомо, що максимальний позитивний ефект на організм людини виявляють препарати і продукти харчування, що містять живі біфідобактерії у кількості від 10^8 КУО/см³ і більше. Саме кількісний вміст життєздатних біфідобактерій є основним показником якості препаратів і продуктів харчування пробіотичного призначення [4].

Біфідумбактерин - це дієтична добавка, що сприяє нормалізації і підтримці нормальної мікрофлори кишечника, яка складається з живих біфідобактерій.

В організмі кожної людини містяться біфідобактерії, вони становлять 80–90% кишкової флори дітей, які перебувають на грудному вигодовуванні. Але з роками кількість чисельність біфідобактерій поступово зменшується. Для здорової мікрофлори кишечника потрібно підтримувати норму для дорослої людини - 34% [5]. Присутність біфідобактерій у кишечнику корисна для дитини та молодих тварин, тому що біфідобактерії пригнічують розвиток різних гнильних і хвороботворних мікроорганізмів, сприяють перетравленню вуглеводів. У дітей в 1 г фекалій міститься 10^{10} - 10^{11} біфідобактерій, у дорослих — 10^9 - 10^{10} .

1.3 Розрахунок потужності виробництва

1.3.1 Розрахунок кількості біфідумбактерину для лікування та профілактики

Встановлено, що біфідумбактерин вживають до прийому їжі, 3-4 рази на добу по 1-2 флаконам/пакетикам, де міститься 2-3 дози препарату. Його розчиняють в кип'яченій воді, 1 мл містить 10^8 живих біфідобактерій. Курс лікування і профілактики 2-3 тижні [6]. Тобто враховуючи всі умови, за добу доросла людина вживає 2-3 дози біфідумбактерину.

Враховуючи, що за найліпших обставин необхідність в цьому препараті буде лише раз на рік та оптимальний курс - 21 день, розраховуємо кількість біфідумбактерину на рік:

$$N_{\text{bif/рік}} = 21 * 3 = 63 \text{ мл}$$

Згідно даних 90% населення України страждають на шлункові розлади. Для розрахунків візьмемо кількість населення Київської області станом на

2022 рік - 1 795 542 чол. (Київської області) та 2 952 301 чол. (Києва), тобто разом – 4 747 843 чол. [8].

Так як 90% населення України мають шлункові розлади, а Київ та Київська область є найгустіше заселеними регіонами України, то можемо припустити, що в цих регіонах шлункові розлади мають 45% населення, тоді їх кількість становить:

$$N_{вж} = 4\,747\,843 * 0,45 = 2\,136\,529,35 \text{ чол.}$$

Отже, річна потреба населення у біфідумбактерині становить:

$$П = 2\,136\,529,35 * 63 = 134\,601\,349 \text{ мл} = 134\,601,349 \text{ л} = 134\,602 \text{ л}$$

Таким чином, для забезпечення 50% населення вибраної області біфідумбактерином на рік знадобиться 134 602 л.

Так як в основному є 11 фармацевтичних компаній, які виробляють “Біфідумбактерин” - моє підприємство буде 12. Тоді визначимо частину препарату, яку доцільно буде виробляти на рік:

$$134\,602 / 12 = 11\,216,77 \text{ л}$$

Отже, ми будемо виробляти **11 217 л** препарату на рік.

1.4 Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби в цільовому продукті та геометричний об’єм ферментера

Врахувуючи кількість культуральної рідини необхідної для забезпечення річної потреби розрахованої раніше, проводимо наступні розрахунки:

Прийmemo кількість робочих трудоднів 330, тоді 1 цикл займає переважно 7 днів, розрахуємо загальну кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = 330 / 7 = 47,2 \text{ циклів}$$

але округляємо це число до **47** повних виробничих циклів на рік.

Дізнаємось кількість культуральної рідини за один цикл:

$$11\,217 / 47 = 238,65 \text{ л/цикл}$$

Геометричний об'єм ферментера для отримання 239 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,8 має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{крц}} / K_{\text{зап}} = 239 / 0,8 \approx 298,75 \text{ л} = 0,3 \text{ м}^3$$

Отже, нам потрібен ферментер на 300 л, щоб ввести підприємство в експлуатацію.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Промисловим продуцентом для виробництва пробіотику Біфідумбактерин є один вид біфідобактерій - *Bifidobacterium bifidum*. Дану культуру біфідобактерій використовують для нормалізації мікрофлори кишечника та для протидіарейної терапії.

Bifidobacterium є грампозитивними, анаеробними, природними мікроорганізмами, які швидко колонізують товстий кишечник немовлят, що годують грудьми, і ферментативними бактеріями, які отримали комерційний і науковий інтерес. Вони мають кілька корисних для здоров'я властивостей, таких як лікування та профілактика шлунково-кишкових розладів, зниження непереносимості лактози, захист від патогенів, посилення імунної системи та профілактики раку. Крім того, кілька експериментальних моделей *in vitro* або *in vivo* вказали на біобезпеку і переваги *Bifidobacterium*, включаючи посилення функції клітинного бар'єру, імуномодулюючу дію на кишечник, продукцію антимікробних речовин, а також профілактику ожиріння та алергії.

Для вибору біологічного агента було взято декілька високоефективних штамів, що зарекомендували себе в дослідженнях. Головним критеріями для вибору штаму, який використовується для виготовлення Біфідумбактерину, є його властивості, які забезпечують ефективність препарату.

Основні критерії включають:

- Життєздатність та стабільність, а саме стійкість до вищих температур, кислоти тощо.

- Адгезія, здатність прикріплення до клітин кишкового тракту, щоб забезпечити ефективну колонізацію.
- Антагоністична активність, здатність гальмувати ріст умовно-патогенної мікрофлори.
- Антибіотикорезистентність, стійкість до антибіотиків.
- Доступність, надається перевага економічно вигідним та ефективним штамам.

Відомо, що серед усіх мікроорганізмів, заданим вимогам найбільш відповідають штами, що відносяться до родів *Bifidobacterium*. Тож враховуючи головні критерії, ми будемо розглядати та порівнювати наступні штами: *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Bifidobacterium bifidum* 791, *Bifidobacterium bifidum* 1.

Таблиця 2.1

Антагоністична активність біфідобактерій

Біологічні агенти	Діаметр затримки росту патогенних мікроорганізмів (мм)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	6,0	2,5	4,5	2,33	3,2
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 791	4,0	2,7	3,2	1,5	1,1
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	5,2	3,0	5,0	3,5	6,5

У виробництві пробіотиків традиційно використовуються *Bifidobacterium bifidum* 1, *Bifidobacterium bifidum* 791 вже багато років. Але штам *Bifidobacterium bifidum* BGN4 володіє значно вищою антагоністичною

активністю до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, що видно з результатів Табл. 2.1.

Розглянемо безпосередньо штамп *Bifidobacterium bifidum* BGN4. Різні біофункціональні ефекти та потенціал для промислового застосування *B. bifidum* BGN4 були охарактеризовані та доведені в *in vitro* (тобто фітохімічний біокаталіз, клітинна адгезія та антиканцерогенний вплив на клітинні лінії та імуномодулюючий вплив на імунні клітини), *in vivo* (тобто пригнічення алергічних реакцій у моделі миші та протизапальне захворювання кишечника) та клінічні дослідження (екзема у немовлят і дорослих із синдромом роздратованого кишечника). Нещодавно було завершено дослідження секвенування геному, і ці дані потенційно прояснюють біохімічні характеристики *B. bifidum* BGN4, які, можливо, ілюструють його нутрицевтичну функціональність.

Таблиця 2.2

Антагоністичні властивості штаму *Bifidobacterium bifidum* BGN4

Умовно-патогенні мікроорганізми	Кількість клітин <i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4, необхідних для інгібування 50% росту
<i>E. coli</i>	$5,5 \times 10^5$ КУО/мл
<i>S. typhimurium</i>	$7,0 \times 10^5$ КУО/мл
<i>S. aureus</i>	$2,5 \times 10^6$ КУО/мл
<i>Helicobacter pylori</i>	$4,8 \times 10^6$ КУО/мл

Антагоністичні властивості штаму *Bifidobacterium bifidum* BGN4 представлені в табл. 2.2., де вказана необхідна кількість клітин штаму задля інгібування умовно-патогенних мікроорганізмів на 50%.

Серед п'яти ключових функціональних ефектів пробіотиків прикріплення пробіотичних бактерій до поверхні слизової оболонки

шлунково-кишкового тракту вважається важливим для конкурентного виключення патогенів і має відбутися до ефективної регуляції імунної діяльності, що призводить до захисної функції проти кишкових патогенів [9].

B. bifidum BGN4 порівнювали з двадцятьма різними штамами *Bifidobacterium* spp. (тобто *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. infantis* і *B. longum*), відокремлених від зразків фекалій людини для оцінки властивостей клітинної адгезії [10]. Згідно дослідженням, клітинні адгезивні властивості *Bifidobacterium* spp. дуже варіабельні між штамми ідентичного роду [11]. Останні дослідження проілюстрували зв'язування між цілими клітинами BGN4 і чітко окресленими мікрворсинками на Caco-2 за допомогою скануючого електронного мікроскопа. Серед різних штамів *Bifidobacterium*, BGN4 показав найбільшу кількість клітин, зв'язаних із клітинами Caco-2 з найвищою гідрофобністю клітинної поверхні (93%) (рис. 2.1) [10].

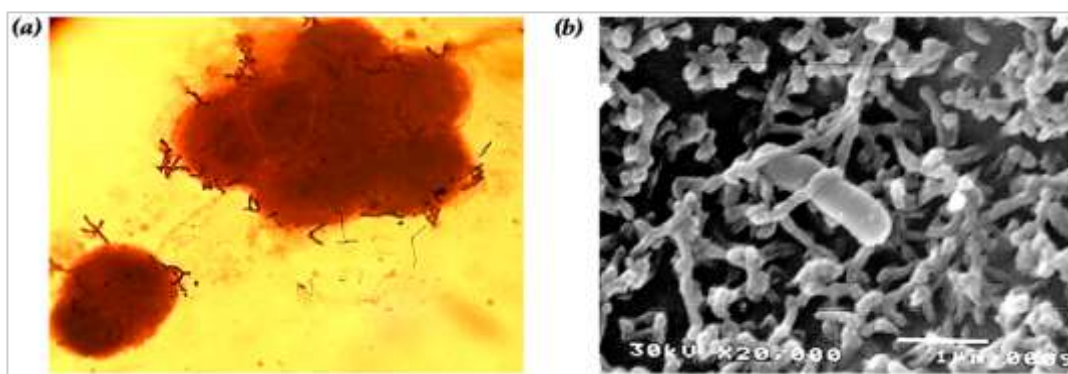


Рисунок 2.1. – Адгезія *B. bifidum* BGN4 до епітеліальної клітини Caco-2 спостерігалася: (а) оптично (збільшення 1000×); та (b) скануюча електронна мікроскопія (збільшення 20000×, взаємодія з мікрворсинками Caco-2 та *B. bifidum* BGN4). Мікробна адгезія в (а) спостерігалася після простого фарбування кристалічним фіолетовим. Панель (b) була адаптована з Kim et al [10].

Також в літературі вказують про значну імунорегуляторну здатність цільноклітинних і безклітинних екстрактів, отриманих з BGN4. У цій роботі, коли макрофаги піддавалися впливу BGN4, спостерігалось активне поділ клітин, більша продукція цитокінів і активна фагоцитарна властивість [12].

Таблиця 2.3

**Вартість поживних середовищ для культивування штамів
*Bifidobacterium bifidum***

Продуценти	Компоненти поживного середовища, г/л	pH поживного середовища	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	Пептон - 10,0	Модифіковане середовище МРС pH 6,4 - 6,8	1320,0	13,20
	Глюкоза - 5,0		55,80	0,279
	Лактоза - 5,0		78,0	0,375
	Цистеїн - 0,2		850,0	0,17
	MgSO ₄ - 2,0		23,10	0,0462
	Лимоннокислий амоній - 8,0		300,0	2,4
	MnSO ₄ - 2,0		43,0	0,086
	K ₂ HPO ₄ - 2,0		146,0	0,292
	Агар - 1,5		1800,0	2,7
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 791		М'ясна вода - 100,0	74,90
Дріжджовий автолізат - 50,0		1110,0	55,5	
Печінковий екстракт - 100,0		40,0	4,0	
Твін-80 - 1,0		325,0	0,325	

	Дистильована вода - 1000,0		12,0	12,0
Вартість за літр поживного середовища - 98,86 грн				
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	Пептон - 10,0	Середовище	1320,0	13,20
/	Лактоза - 10,0	Блаурокка	78,0	0,78
	Цистеїн - 0,1	pH 7,0 - 7,2	850,0	0,085
	NaCl - 5,0		58,50	0,293
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 791	Агар - 1,5		1800,0	2,7
/	Печінковий настій - 100,0		40,0	4,0
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1				
Вартість за літр поживного середовища - 21,06 грн				
	Панкреатичний гідролізат казеїну - 30,0	Середовище Біфідум	2994,0	89,82
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4	Екстракт пекарських дріжджів - 5,0	pH 6,8 - 7,3	14,0	0,07
/	Глюкоза - 2,5		55,80	0,1395
	Лактоза - 7,5		78,0	0,585
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 791	Цистеїн - 0,5		850,0	0,425
/	NaCl - 0,5		58,50	0,029
	MgSO4 - 2,5		23,10	0,058
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	Аскорбінова кислота - 0,5		192,0	0,096
	Ацетат натрію - 0,3		105,0	0,032

	Лимоннокислий амоній - 0,3		300,0	0,09
	Агар - 0,75		1800,0	1,35
Вартість за літр поживного середовища - 92,70 грн				

Посилання на компоненти середовища:

1. Пептон - 1320 грн/кг
<https://www.systopt.com.ua/item-pepton-fermentatyvnyj>
2. Глюкоза - 55,80 грн/кг
<https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza>
3. Лактоза - 78 грн/кг
<https://www.systopt.com.ua/item-laktoza>
4. Цистеїн - 850,0 грн/кг
<https://www.chemsale.com.ua/product/%D1%86%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%B8%D0%BD/>
5. MgSO₄ - 23,10 грн/кг
<https://www.systopt.com.ua/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>
6. MnSO₄ - 43,0 грн/кг
<https://himfarinvest.com.ua/margantsa-sulfat>
7. Агар - 1800,0 грн/кг
<https://www.systopt.com.ua/item-pozhyvnyj-zhyvlynyj-agar-suhyj>
8. Лимоннокислий амоній - 300,0 грн/кг
https://www.covalent.com.ua/shop/ammonium_citrate/
9. Твін-80 - 325,0 грн/кг
<https://prom.ua/ua/p941117259-polisorbat-tvin.html?&primelead=M14zNQ>
10. NaCl - 58,50 грн/кг
<https://www.systopt.com.ua/item-natrij-hlorystyj-hloryd-natriyu-2>
11. Аскорбінова кислота - 192,0
<https://www.systopt.com.ua/item-askorbinova-kyslota>
12. Дріжджовий автолізат - 1110,0 грн/кг
<https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
13. Екстракт дріжджів - 14 грн/кг
<https://flagma.ua/uk/ekstrakt-drizhdzhiv-drozhzhevoy-ekstrakt-011604150.html>
14. Панкреатичний гідролізат казеїну - 2994,0
http://xn--d1aiamasodjd5hxb.com.ua/ua/product_details.php?filter=%26fd26%3D180&item_id=9599
15. Ацетат натрію - 105,0 грн/кг
<https://www.systopt.com.ua/item-natrij-otstovokyslyj-atsetat-natriyu>
16. М'ясна вода - 74,90 грн/кг
<https://index.minfin.com.ua/markets/wares/prods/meat-food/meat/>
17. Печінковий настій - 40 грн/кг
<https://myasko.com.ua/4-pechinka-svinjacha.html>
18. Дистильована вода - 12 грн/л
<https://epicentrk.ua/ua/shop/mplc-distil-ovana-voda-1-l-00000198-1ece0ae8-2d20-606e-97cd-c5dfc680b06d.html>

В даному випадку ми будемо використовувати модифіковане середовище МРС. Це поживне середовище, зазвичай, використовують саме для визначення кількості, тобто концентрації, біфідобактерій. Воно є збалансованим за основними поживними речовинами. І хоча серед трьох порівнянних поживних середовищ воно є найдорожчим (ціна - 98,86 грн), проте культура вирощена з використанням цього поживного середовища проявляє всі основні пробіотично важливі критерії штаму, а саме життєздатність та стабільність, адгезія, антагоністична активність, антибіотикорезистентність, що забезпечують ефективність препарату.

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

2.2.1 Обґрунтування вибору ферментатора

Для проведення ефективного біосинтезу необхідно визначити параметри та умови проведення процесу, вони залежать від особливостей продуценту.

Промислове культивування відбувається за анаеробних умов з подачею азоту при температурі 37 ± 1 °C та рівнем кислотності 6,4-7,0. Враховуючи необхідні умови для накопичення біомаси та потужності виробництва, оптимальним буде періодичне культивування. Оскільки забезпечити строго асептичні умови при безперервному культивуванні неможливо.

Тож нам потрібен ферментер, який буде відповідати основним вимогам культивування бактерій *B.bifidum*. А саме:

- підтримання температури, тиску культивування, необхідного рівня перемішування;
- забезпечувати періодичність процесу, асептичні умови та умови стерилізації; мати в наявності датчики тиску, температури, рН, корозійну стійкість матеріалу;

- бути простим в проведенні ремонтних робіт підготовки до роботи та проведенні контролю ферментації.

Також процес біосинтезу буде здійснюватись з механічним перемішуванням малої ефективності, задля рівномірного розподілення біомаси, азоту та накопичених токсичних продуктів метаболізму. Для цього ми встановимо триярусну лопатеву мішалку. Такий вибір відповідає вимогам та є економічно доцільним. Режим перемішування, згідно технологічного рішення буде 70-100 об/хв. Перемішувальний пристрій будуть вмикати на 2-3 хв після кожної подачі розчину аміаку та перед відбором проб, тобто орієнтовно кожні 3-4 години процесу ферментації.

Враховуючи, всі критерії, вимоги та необхідний об'єм (300 л), вибір ферментера зупинився на ферментері Biostat D 300 від Sartorius (країна виробник - Фінляндія). Ця модель має цифрову систему вимірювань з датчики температури, моніторингу біомаси, рН; можливість керування замкнутими робочими циклами, автоматичного калібрування. Також в оснащення входить система стерилізації, що включає впускні і випускні фільтри та перистальтичні насоси, через які буде подаватись 10%-ий розчин аміаку для балансування кислотності. Програмне забезпечення було розроблено згідно GAMP.



Рисунок 2.2 Приклади ферментерів компанії Sartorius Biostat [15], [16].

Оскільки штам *Bifidobacterium bifidum* BGN4 є obligатним анаеробом, то барботер слугує для створення анаеробних умов, шляхом витіснення повітря, подачею азоту. Азот буде подаватись через магістральний трубопровід у відповідний штуцер в кришці ферментера.

Отже, ферментер Biostat D 300 від Sartorius задовольняє повністю наші вимоги.

2.2.2 Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря

Так як біфідобактерії є obligатними анаеробами - організми, що живуть і ростуть тільки при відсутності молекулярного кисню в середовищі. Натомість вони використовують альтернативні акцептори електронів для клітинного дихання: сульфати, нітрати, залізо, марганець, ртуть, чадний газ (CO). Тож ми будемо закуповувати балони з азотом. Кожен азотний балон оснащений ковпаком, вентиляем і черевиком. В балоні азот знаходиться під великим тиском, тож нам не потрібна буде стадія компресування (стиснення).

Також такі балони можуть використовуватись повторно, але тільки після проходження відповідної атестації. Вони мають бути чорного кольору з жовтим маркуванням [17]. Зберігання азоту потребує дотримання певних умов: помірної температури зберігання та приміщення з хорошою вентиляцією.

2.2.3 Вибір миючих та дезінфікуючих засобів

Для застосування в промисловості миючі засоби мають відповідати певним критеріям:

- Розчинність у воді повинна бути не менше 10% при розведенні 1:200;
- Поверхневий натяг має бути не більше 60 мН/м;

- Піноутворення має бути не більшим ніж 50% від об'єму розчину та стійкістю піни не більше за 0,3 одиниці;
- Легке змивання при ополіскуванні;
- Слабка корозійна активність не більше ніж 2,0 г/м² за рік;
- Вибухобезпечність та безпека довкілля;
- Широкий спектр бактерицидної дії проти умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів;
- Мають бути малотоксичними або нетоксичними.

2.2.3.1 Миючі засоби

Миючі засоби - це сполуки, у склад яких входять поверхнево-активні речовини, які застосовуються для очищення. Миючі засоби класифікуються за:

- Агрегатним станом: пастоподібні, рідкі (гелеподібні), тверді та порошкові (гранульні);
- Видом: дезінфікуючі, лужні, кислотні, нейтральні, синтетичні;
- Кількістю діючих компонентів: однокомпонентні, багатоконпонентні.

Кожен з пунктів класифікації вказує на свої особливості застосування, наприклад, температура, умови, призначення тощо. Також є важливим, щоб миючий засіб не залишав плівку й не потребував великої кількості води для змиву.

Тож вибраний миючий засіб має відповідати певним критеріям, таким як: миюча здатність, універсальність використання, об'єм, економічна доцільність, діапазон температурного використання, екологічні властивості.

2.2.3.2 Підбір концентрації миючих засобів

Концентрація миючого засобу залежить від різних умов та факторів, а саме: технологія очищення, тип обладнання або поверхні, яку треба очистити, тип забруднення тощо.

Зазвичай використовують концентрацію, що вказана в інструкції миючого засобу. Якщо початкова концентрація не має задовільного результату, її поступово збільшують. Концентрація миючого засобу має бути підібрана так, щоб не наносити шкоди оброблювальному об'єкту, але при цьому мати результат, описаний в інструкції цього засобу.

Для приготування мийних, мийно-дезінфікуючих та дезінфікуючих розчинів використовують воду, що відповідає вимогам ДСТУ 7525:2014 "Вода питна".

2.2.3.3 Обґрунтування вибору миючого засобу для оброблювальних об'єктів

Для здійснення санітарної обробки допускаються лише ті засоби, що пройшли відповідний контроль та мають дозвіл уповноважених органів державного нагляду. Також засіб має відповідати усім критеріям вказаним в пунктах 2.2.3 та підпункті 2.2.3.1.

"Біонол" цей миючий засіб є універсальним, адже його можна застосовувати для миття обладнання, поверхонь, устаткування тощо. "Біонол" добре розчиняється у воді, не спричиняє корозії, призначений для очищення виробів з металу, скла, гуми та полімерних матеріалів, має змочувальні, емульгуючі, мийні властивості. Діючою речовиною засобу є алкілбензолсульфонат натрію 4,5-10%, ензими, ПАВ, добавки. Є ефективним при низьких концентраціях (0,5-2,0%), утворює піну у воді будь-якої температури та жорсткості, економічно доцільний (104 грн за 1 кг) [21].

Для застосування "Біонол" розчиняють у воді в пропорціях, вказаних в інструкції, далі розчин наносять на оброблювальні об'єкти, очищують за допомогою щітки або ганчірки, через деякий час ретельно змивають водою. Готовий розчин є придатним протягом 14 діб при зберіганні в герметичному контейнері [22].

Також для здійснення санітарної обробки допускається використання каустичної соди, що являє собою безбарвну кристалічну речовину, яка є гігроскопічною, добре розчиняється у воді. Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). Викликає хімічні опіки при попаданні на шкіру, подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів.

Водні розчини мають лужну реакцію, 1-2 % гарячі розчини каустичної соди добре обмилюють жири, розщеплюють вуглеводи, гідролізують білки. Мийні властивості засобу зменшуються при зниженні температури. Такі розчини кородують об'єкти з алюмінію. Рекомендується використовувати 0,5% розчини при температурі приблизно 45 °С для ручного миття технологічного обладнання або 1-2% розчини при температурі приблизно 55 °С для циркуляційного миття технологічного обладнання.

Отже, для здійснення санітарної обробки ми будемо застосовувати “Біонол”, розчини каустичної соди можна застосовувати приблизно один раз на 3 місяці задля чергування.

2.2.3.4 Дезенфікуючі засоби

Дезінфекційні засоби - це хімічні речовини, біологічні агенти, які дозволяють позбутися патогенних мікроорганізмів або перетворити їх в інертні.

Заходи дезінфекції є дуже важливими на підприємствах, де відбуваються біотехнологічні процеси. Проведення цих процесів запобігає поширенню патогенних бактерій, грибів, вірусів тощо. Зазвичай дезінфікуючі засоби використовуються для оброблення поверхонь обладнання, стін та застосування персоналу.

2.2.3.5 Обґрунтування вибору методу дезінфекції

Є декілька методів дезінфекції: фізичний, біологічний, хімічний та механічний. У кожного з них є свої переваги та недоліки, тож розглянемо їх по окремоті.

Фізичний метод зазвичай є високоефективним, застосовується зазвичай для знезараження обладнання, інструментів і приміщень. Здійснюється за допомогою ультрафіолетового опромінення, кип'ятіння, випалювання, основою методу є термообробка. Проте цей метод є не універсальним, адже потребує спеціальної апаратури.

Біологічний метод здійснюється за допомогою мікробів-антагоністів й полягає у знищенні збудників. Процес має специфічне призначення - очищення біотермічних камер, стічних вод тощо та є дуже трудомістким.

Механічний метод є найпоширенішим та простим. Він працює завдяки зменшенні концентрації мікроорганізмів та заключається в митті рук, вологому прибиранні, пранні, провітрюванні приміщень.

Основним методом є хімічний - широкоживаний у практиці, простий у використанні, універсальний. Працює за допомогою різних хімічних сполук та речовин, що знищують умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми.

Отже, хімічний метод є найефективнішим серед усіх та економічно доцільним.

2.2.3.6 Обґрунтування вибору способу дезінфекції

Існує кілька способів хімічної дезінфекції, а саме:

- Розпилення - для цього використовують обприскувачі та гідропульти, зазвичай знезаражуючі великі поверхні.
- Занурення - застосовується для обробки виробів; канали, великі об'єкти заливають дезінфікуючим розчином.
- Засипання - використовують для знезараження інфікованих біологічних матеріалів.
- Протирання - застосовуються для дезінфекції поверхонь та виробів.

Підбір способу залежить від об'єкту, умов та виробництва. Тож підходящою формою дезінфікуючого засобу готовий розчин або порошок, що потребує розведення.

2.2.3.7 Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу для оброблювальних об'єктів

Для дезінфекції обладнання, поверхонь та приміщення можна використовувати “Санітаб”. Має високу бактерицидну дію широкого спектру грам позитивних та негативних бактерій. Призначений передстерилізаційного очищення, миття, генерального прибирання.

В складі засобу активно-діючою речовиною є дихлорізоціанурат натрію (80-85%), допоміжними компонентами є карбонат натрію та адипінова кислота (15-20%). Засіб відповідає стандарту ДСТУ:ТУ У 24.2-37403360-002:2011 зі змінами №1 й №2.

Засіб є універсальним, зручним, економічним та ефективним у використанні. “Санітаб” продається у формі швидкорозчинних таблеток, добре розчиняється у воді, мають запах хлору. При підвищенні температури робочих розчинів до 40-45 °С, антимікробна дія підсилюється. Розчини не ушкоджують об'єктів, виготовлених з деревини, скла, полімерних матеріалів, корозійностійких металів, гуми, пластмас, лакофарбове, гальванічне і полімерне покриття. Не має мутагенної та сенсibiliзуючої дії [24].

Концентрація залежить від об'єкту обробки, збудника та види забруднення. Зазвичай застосовують концентрацію від 0,01 до 0,3 % за активним хлором, проти спороутворюючих збудників - від 0,5 до 3% за активним хлором. Підходить для таких способів обробки: зрошення, протирання, занурення, заповнення та замочування.

Фасування: 1 кг - 300 таблеток або бочка - 50 кг [25].

2.2.3.8 Обґрунтування вибору апарату для обробки обладнання

Ми зупинили свій вибір на СІР-мийці. Це автоматична станція миття призначена для миття та дезінфекції технологічного обладнання, трубопроводів на підприємствах.

Має ручний та автоматичні режими роботи. На сенсорному екрані пульта відображається концентрація, температура, швидкість потоку, стан клапанів, залишок миючих розчинів тощо. СІР-мийка легко вбудовується в технічну лінію виробництва, зберігає шлях та параметри миття та передає дані на зовнішній комп'ютер. Має широкий функціонал: ополіскування теплою та холодною водою, циркуляційне миття лужними та кислотними розчинами, стерилізація дезінфікуючим розчином або гарячою водою, керування насосами для повернення миючих розчинів.

З найбільших переваг використання такої станції є можливість багаторазового використання миючих розчинів, можливість збору ополіскуючої води, миття декількох об'єктів одночасно, автоматичне підтримання температури, концентрації тощо, архівація операцій і режимів мийки, простота використання.

Отже, використання цього апарату є економічно доцільним, адже дозволяє зменшити кількість води, миючих засобів, часу та є надійним способом миття та обробки технологічного обладнання.

2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу з наведенням складу поживного середовища

2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 240$ л культуральної рідини. Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.} = 300$ л. При коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,8$, він є можливим адже ми будемо заповнювати 20% ферментера азотом та здійснюватимемо

перемішування лише задля рівномірного розподілення азоту по всьому об'єму.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість посівного матеріалу в ферментері становитиме:

$$V_{\text{пм}} = 240 \times 0,1 = 24 \text{ л}$$

Робочий об'єм з вказаним коефіцієнтом заповнення 24 л, тоді об'єм поживного середовища:

$$V_{\text{пс}} = 240 - 24 = 216 \text{ л}$$

Отже, нам потрібен ферментер об'ємом 300 л, де коефіцієнт заповнення 0,8. Робочий об'єм становить 240 л, де 24 л буде посівного матеріалу та 216 л поживного середовища.

2.3.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі

Будемо використовувати інокулятор об'ємом 30 л. Для одержання 24 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу, який становить 10 % від робочого об'єму, перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пм}} = 24 \times 0,1 = 2,4 \text{ л}$$

$$V_{\text{пс}} = 24 - 2,4 = 21,6 \text{ л}$$

Отже, нам потрібен інокулятор об'ємом 30 л, де коефіцієнт заповнення буде 0,8. Об'єм посівного матеріалу складатиме 2,4 л, а об'єм поживного середовища 21,6 л.

2.3.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі

Будемо використовувати інокулятор об'ємом 3 л. Для одержання 2,4 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу, який становить 10 % від робочого об'єму, перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пм}} = 2,4 \times 0,1 = 0,24 \text{ л} = 240 \text{ мл}$$

$$V_{\text{пс}} = 2,4 - 0,24 = 2,16 \text{ л}$$

Отже, нам потрібен інокулятор об'ємом 3 л, де коефіцієнт заповнення буде 0,8. Об'єм посівного матеріалу складатиме 240 мл, а об'єм поживного середовища 2,16 л.

2.3.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Маємо враховувати, що для одержання 240 мл посівного матеріалу робимо подвійну дозу для контролю, тобто:

$$V_{\text{пм}} = 240 \times 2 = 480 \text{ мл}$$

Для цього ми будемо використовувати 2 качалочні колби об'ємом 250 мл, одна з яких буде контрольною. Заповнювати будемо по 240 мл в кожную колбу. Так як біфідобактерії є анаеробами

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 качалочні колби об'ємом 250 мл кожна.

2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

2.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Біфідобактерії є дуже вимогливими мікроорганізмами, вони мають потребу в амінокислотах, солях, пептидах, вітамінах тощо. Тому поживні середовища для культивування біфідобактерій мають складний технологічний процес приготування, стерилізації, а саме необхідність забезпечення анаеробних умов культивування, та містять багато компонентів.

Одержання посівного матеріалу буде відбуватись у 4 етапи: засів у 2 колбах об'ємом 250 мл, в інокуляторі об'ємом 3 л, потім в інокуляторі об'ємом 30 л та засів ферментера об'ємом 300 л.

Вирощування посівного матеріалу та біосинтез біфідобактерій відбувається в середовищі модифікованого МРС. Його склад (г/л):

Пептон - 10,0
Глюкоза - 5,0
Лактоза - 5,0
Цистеїн - 0,2
MgSO ₄ - 2,0
Лимоннокислий амоній - 8,0
MnSO ₄ - 2,0
K ₂ HPO ₄ - 2,0
Агар - 1,5
М'ясна вода - 100,0
Дріжджовий автолізат - 50,0
Печінковий екстракт - 100,0
Твін-80 - 1,0
Дистильована вода - 100,0

Розраховуємо кількість кожного з вказаних компонентів для приготування поживного середовища (табл.2.4.).

Компоненти необхідно готувати та стерилізувати окремо так як у нас є термолабільні та термостабільні компоненти та задля підвищення якості поживного середовища.

Таблиця 2.4.

Компоненти	Об'єм поживного середовища			
	у 2 колбах об'ємом 250 мл	в інокуляторі об'ємом 3 л	в інокуляторі об'ємом 30 л	у ферментері об'ємом 300 л
Пептон	Сухе поживне середовище 30,7 г	Сухе поживне середовище 138,2 г	216,0 г	2 160,0 г
Глюкоза			108,0 г	1 080,0 г
Лактоза			108,0 г	1 080,0 г
Цистеїн			4,32 г	43,2 г
Агар			32,4 г	324,0 г
MgSO ₄			43,2 г	432,0 г
MnSO ₄			43,2 г	432,0 г
K ₂ HPO ₄			43,2 г	432,0 г
Лимоннокислий амоній			172,8 г	1 728,0 г
Твін-80			21,6 г	216,0 г
Дріжджовий автолізат			1 080,0 г	10 800,0 г
Печінковий екстракт			2 160,0 г	21 600,0 г
М'ясна вода	2 160,0 г	21 600,0 г		
Дистильована вода	480 мл	2,16 л	15,410 л	154,084 л
Об'єм поживного середовища	480 мл	2,16 л	21,6 л	216 л

2.4.1.1 Обґрунтування приготування поживного середовища для колб та інокулятора об'ємом 3 л

Оскільки ми будемо отримувати 1, 2 генерації посівного матеріалу, використовуючи готове модифіковане середовище МРС, задля зменшення стадії пристосування та пришвидшення процесу оживлення культури.

Для вирощування культури в колбах та інокуляторі, об'ємом 3л, використовують сухе поживне середовище МРС, де лактоза є джерелом енергії та вуглецю, пептон - джерело азоту в середовищі.

Нам необхідно приготувати 480 мл поживного середовища в колбі загальним об'ємом 1 л та 2,16 л поживного середовища в колбі загальним об'ємом 5 л. Ми беремо колби такого об'єму, щоб попередити контакт вмісту колби з ватно-марлевою пробкою (прямої контамінації), адже будемо проводити стерилізацію в автоклаві. Стерилізація буде в автоклаві при 121 °С, 15-20 хв.

Отже, для цих двох етапів, ми використовуємо готове сухе поживне середовище та стерилізуємо в автоклаві.

2.4.1.2 Обґрунтування та приготування поживного середовища для інокулятора об'ємом 30 л

Вибране поживного середовища є багатоконпонентним й має термолабільні та термостабільні компоненти. Тож для отримання результату процес приготування потрібно розділити на композицію 1 - термолабільну та композицію 2 - термостабільну.

Композиція 1: Пептон, глюкоза, лактоза, цистеїн, агар, м'ясна вода, печінковий екстракт, твін-80, дріжджовий екстракт, дистильована вода.

Композиція 2: MgSO₄, MnSO₄, K₂HPO₄, лимоннокислий амоній, дистильована вода.

Стерилізація буде відбуватись в інокуляторі для композиції 1 при 112°C, 30 хв та в автоклаві для композиції 2 при 131 °C, 40 хв відповідно. Оскільки в середовищі є двозаміщений фосфат калію, він може випадати в осад при реакції з іншими солями. Щоб запобігти утворенню нерозчинних солей, ми доведемо рН розчину до 4-4,5 за допомогою 6% HCl. Але так як таке значення рН не є оптимальним для культивування, тож ми будемо ще додавати 10% (NH)₄OH, щоб вирівняти рН до 6,4-6,8 після стерилізації.

Отже, для цього етапу передбачається розділення процесу приготування на композиції.

2.4.1.3 Приготування поживного середовища для ферментера об'ємом 0,3 м³

На цьому етапі потрібно приготувати 240 л поживного середовища. для цього ділимо компоненти середовища на на композицію 1 - термолабільну та композицію 2 - термостабільну.

Композиція 1: Пептон, глюкоза, лактоза, цистеїн, агар, м'ясна вода, печінковий екстракт, твін-80, дріжджовий екстракт, дистильована вода.

Композиція 2: MgSO₄, MnSO₄, K₂HPO₄, лимоннокислий амоній, дистильована вода.

Стерилізація композиції 1 буде проводитись при при 112°C, 30 хв в ферментері, а композиції 2 при 131°C, 40 хв у збірнику. В процесі ми будемо закислювати середовище в збірнику за допомогою 6% HCl, задля розчинення всіх солей. Після стерилізації будемо вирівнювати рН до 6,4-6,8 в ферментері за допомогою 10% розчину (NH)₄OH.

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічне положення

Вибраний штамм - *Bifidobacterium bifidum* BGN4 відносяться до 2 категорії (грампозитивні, що мають клітинну стінку), до 20 групи (грампозитивні неспороутворюючі неправильної форми палички). За аналізом будови 16S гену рибосомної РНК [13]:

Домен: Бактерії

Тип: *Firmicutes*

Клас: *Actinobacteria*

Порядок: *Bifidobacteriaceae*

Рід: *Bifidobacterium*

Вид: *bifidum*

3.2 Морфолого-культуральні властивості

Біфідобактерії в щільному модифікованому середовищі МРС утворюються колонії невеликого розміру, діаметром 3-5 мм. В рідкому модифікованому середовищі МРС спостерігається ріст у вигляді помутніння або гомогенного осаду від центру до дна посуду, адже біфідобактерії є облигатними анаеробами. В несприятливих умовах (невідповідна кислотність середовища, температура культивування, присутність кисню, нестача компонентів середовища) - біфідобактерії володіють здатністю утворювати набряклі, кулясті форми при розвитку.

На ранніх стадія розвитку в популяції спостерігаються переважно паличкоподібні клітини товщиною $\approx 0,4-0,5$ мкм, довжиною до 8 мкм. Надалі в популяціях переважають ланцюги клітин, частина з подвоєними кінцями,

які продовжують рости в довжину. Довжина і форма клітин залежить від складу середовища, присутністю кисню, віку культури і способу інкубації.

Біфідобактерії є вибагливими до поживного середовища, адже потребують пантотенової кислоти, пуринових й піримідинових основ, цистеїну, біотину, аміноцукрів, вітамінів тощо. Оптимальною температурою для росту біфідобактерій є 37-40 °С, оптимальним значенням рН - 6,4-7,0.

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Біфідобактерії є хемоорганотрофами, їхньою сновною властивістю є здатність до ферментації вуглеводів - зброджують лактозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, рафінозу, мелібіозу з утворенням молочної та оцтової кислот без вуглекислого газу. Типом енергетичного метаболізму є бродіння, тип бродіння - гетероферментативний. Збродження вуглеводів здійснюється за фруктозо-6-фосфатним шляхом. Також вони є облігатними анаеробами, тож можуть рости лише при низькому окисно-відновному потенціалі середовища.

Bifidobacterium bifidum не утворюють каталазу, H₂S, не відновлюють нітрати до нітритів, не розріджують желатин, не володіють уреазною активністю. Для нормального росту й розвитку *Bifidobacterium bifidum* необхідний ряд неорганічних сполук заліза, міді, калію, натрію, йоду, фосфору, магнію, сірки та марганцю, що є мікро- й макроелементами.

Зчасту клітинна стінка біфідобактерій містить відновлюючі цукри та залишки галактози. Так як антигени знаходяться саме в клітинній стінці, то її склад пов'язаний з антигенними властивостями бактерій. Вони можуть конкурувати з патогенами за колонізацію слизової оболонки, модулюючи проникність епітеліальних бар'єрів та змінювати активність імунних клітин. Розмножують шляхом формування поперечних перегородок в клітині, внаслідок чого утворюються ланцюги клітин.

Отже, *Bifidobacterium bifidum* мають високу ступінь антагоністичної активності, це пов'язано з інгубуючою дією молочної та оцтової кислот, лізоциму, бактеріоцинів та конкуренцією за сайти прикріплення; здатні самостійно синтезувати вітаміни групи В та вітамін К: рибофлавін (В2), фолієву кислоту (В9), тіамін (В1), пантотенову кислоту (В5), нікотинову кислоту (В3), піридоксин (В6).

РОЗДІЛ 4

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Поетапна блок-схема технології

Поетапна блок-схема технології складається з допоміжних робіт, основного технологічного процесу. Вона представлена на аркуші формату А 1 (додається).

4.2 Опис технологічної схеми

Технологічна схема отримання біфідумбактерину штамом *B.bifidium BGN4* включає допоміжні роботи, технологічний процес, відвантаження та знешкодження відходів.

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

ДР.1.1. Підготовка персоналу

Виробничий персонал має проходити інструктаж, медичний огляд та відповідати вимогам стандартів щодо персоналу. Так як основним джерелом забруднення мікроорганізмами є обслуговуючий персонал, то до нього є наспульні вимоги: забороняється брати сторонні предмети до виробничих приміщень, необхідно сповіщати керівника про кожен випадок захворювання, персонал повинен бути навчений правилам дезінфекції перед початком роботи. Вхід у виробниче приміщення здійснюється тільки через санпропускники. У виробничому приміщенні знаходиться тільки персонал, зайнятий в технологічному процесі. Вхід не виробничому персоналу і стороннім особам у виробничі приміщення забороняється. У виробничі приміщення допускаються особи, що пройшли спеціальну підготовку та інструктаж з правил поведінки й тільки після належної підготовки для роботи.

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Виробничий персонал має проходити інструктаж вимог роботи на підприємствах. Він проводиться не менше 1 разу на рік. Головною метою

таких навчань є оновлення знань працівників, налагодження робочого процесу, відповідність міжнародним стандартам.

ДР 1.1.2. Медичний огляд

Перш за все, відповідно до ст. 169 КЗпП та ст. 17 Закону №2694 [30] роботодавець зобов'язаний за свої кошти організувати проведення попереднього (при прийнятті на роботу) і періодичних (протягом трудової діяльності) медичних оглядів працівникам. Такі періодично-медичні та бактеріологічне обстеження мають проводитись принаймні 1 раз на рік або за потреби частіше.

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

Основним призначенням одягу є створення бар'єру між продукцією, виробничим приміщенням та персоналом. Це зменшує ризик забруднення та контамінації.

При виході із приміщення проводять операції переодягання. Персонал повинен носити комплект спеціального одягу, передбачений для даного виробничого приміщення. Використаний одяг складають в марковані контейнери і закривають кришкою. Одяг працюючих з живими культурами мікроорганізмів необхідно дезінфекційно обробити перед пранням. Також одяг повинен мати певні властивості: матеріал для одягу має бути щільним, антистатичним та не виділяти волокна чи ворсинки, не бути легкозаймистим.

Отже, для біотехнологічного виробництва найкращим варіантом є захисний одяг з високим вмістом бавовни, він задовольняє раніше перераховані критерії.

ДР.1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР.1.2.1. Підготовка мийних засобів (“Біонол” та каустична сода)

“Біонол” це універсальний миючий засіб. Для приготування робочого розчину цього засобу з концентрацією 0,15% на 10 л, ми будемо розводити 15 г “Біонолу” в 9,985 л води, що відповідає вимогам ДСанПіН 2.2.4-171-10

[31]. Відповідно для приготування 3%-го робочого розчину на 10 л, ми візьмемо 300 г засобу та розведемо в 9,7 л води [32].

Такі розчини готують у промаркованій тарі зі щільною кришкою та використовують протягом 14 діб.

Для приготування 1-2% розчину NaOH на 1 л ми, за допомогою мірного стакану, відміряємо 25 мл 42% NaOH. Відповідно на 10 л спочатку наливаємо 3,250 л ($\frac{1}{3}$ від необхідної кількості) питної води, температурою 40-45 °С. Потім ми відміряємо 250 мл 42% NaOH та додаємо в ємність й доливаємо решту питної води, ретельно перемішуємо та щільно закриваємо кришкою ємність. Термін придатності готового розчину - 24 години.

Для здійснення санітарної обробки допускаються лише ті засоби, що пройшли відповідний контроль та мають дозвіл уповноважених органів державного нагляду.

ДР.1.2.2. Підготовка дезінфікуючих засобів для приміщень

По закінченні робіт технічний персонал проводить прибирання зони роботи, використовуючи спеціальне обладнання і засоби для очищення, які дозволені до використання в цьому приміщенні. Робочі розчини дезінфікуючих та миючих засобів готують у приміщеннях зберігання в маркованій тарі із корозійних матеріалів, з етикеткою, де зазначено назву розчину, концентрацію, дату приготування та виконавця. Для приготування використовують воду, яка відповідає стандартам ДСТУ 7525:2014 “Вода питна. Гігієнічні вимоги і контроль за якістю”. Розчини дезінфекційних засобів мають чергуватись кожні 3 місяці з метою попередження формування й поширення стійких мікроорганізмів.

ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

До початку роботи і під час роботи проводять обробку рук. Спочатку змочують руки питною водою, наливають миючий засіб. Руки миють до ліктів. Змивають водою і висушують насухо далі наносять розчин «Стериліуму» і розділяють по внутрішній і зовнішній поверхні кисті, між

пальцевими проміжками та просторами біля нігтів. Втирають не менше 3 мл засобу в шкіру протягом 30 с.

ДР.1.2.4. Підготовка дезінфікуючих засобів для обладнання

Ми будемо використовувати “Санітаб” для дезінфекції поверхонь обладнання, приміщень, стін тощо. Засіб є універсальним, зручним, економічним та ефективним у використанні.

Концентрація буде залежати від об’єкту обробки, збудника та видів забруднення. Зазвичай застосовують концентрацію від 0,01 до 0,3 % за активним хлором, проти спороутворюючих збудників - від 0,5 до 3% за активним хлором. Тож для приготування робочого розчину якщо нам потрібна концентрація активного хлору 0,1% ми розчиняємо 7 таблеток в 10 л води, якщо 0,3%, то 20 таблеток на 10 л [33]. Готовий робочий розчин макуємо. При підвищенні температури робочих розчинів до 40-45 °С, антимікробна дія підсилюється.

З метою видалення осадків, які могли утворитись на внутрішніх поверхнях технологічного обладнання та трубопроводів, застосовуються кислотні миючі засоби у вигляді розчинених неорганічними та органічними кислотами розчинів. Кислотні миючі засоби використовують після миття обладнання розчинами лужних миючих засобів.

ДР.1.3. Підготовка ферментатора

ДР.1.3.1. Огляд, миття та ополіскування апарату

Спочатку техніку зупиняють, проводять огляд на справність техніки, потім спустошують ферментер та переходять до миття. Є декілька способів миття, ми зупинимось на методі циркуляційної СІР-мийки [34].

На верхню кришку ферментера встановлюється кульова головка апарату з багатьма форсунками. Далі установка СІР підключається до ферментера через трубопроводи. За допомогою дозуючих насосів готуються миючі розчини заданої концентрації. Потім ці розчини подаються насосом під тиском до головки СІР, яка обертаючись з високою швидкістю, очищає

внутрішню поверхню ферментера. Після цього проводиться ополіскування ферментера від миючого розчину, використовуючи очищену воду або воду для ін'єкцій. Закінченням процесу є автоматичне відключення установки СІР. Такий процес миття не тільки є високопродуктивним, але й економічним

Після миття та ополіскування проводять технічний огляд, під час якого перевіряють щільність та цілісність запірної арматури, комунікацій на обладнанні.

ДР.1.3.2. Перевірка на герметичність

Перевірку проводять насиченою парою за допомогою миючого засобу, що добре піниться. Спочатку обмилюють всі фланцеві з'єднання мийним розчином, потім ферментер герметично закривають та подають насичену водяну пару з надлишковим тиском 0,15-0,2 МПа протягом 30 хв. Такий спосіб допомагає швидко виявити пошкодження. Тож якщо десь утворюються бульбашки - герметичність порушена.

ДР.1.3.3. Стерилізація

Процес стерилізації проводиться в декілька етапів. Стерилізацію фільтрів проводять одночасно зі стерилізацією ферментера.

Спочатку ферментер прогрівають за допомогою глухої пари, що подається в сорочку. Це робиться для уникнення деформації конструкції. Коли ферментер прогріли, то починають безпосередню стерилізацію гострою парою при температурі 130-135 °С, з тиском 0,2 МПа протягом 1 години.

ДР.1.4. Підготовка приміщень

Підготовка виробничих приміщень - це комплекс заходів, що складається з волого прибирання, дезінфекційної обробки, за потреби опромінення ультрафіолетом поверхонь приміщень [35]. Таку підготовку проводять відповідно до вимог стандартних робочих процедур підприємства, з використанням в одязі передбаченому для кожного класу виробничих приміщень. Контроль мікробіологічної чистоти поверхонь виробничих

приміщень проводять згідно до Методичних рекомендацій затверджених наказом МОЗ України.

ДР.1.4.1. Щоденне прибирання

Таке прибирання проводить після кожної зміни. Спочатку, за необхідності, видаляють виробничі відходи, тоді прибирають механічні забруднення за допомогою пилососа. Далі проводиться прибирання з використанням теплої води з мийним засобом з розрахунку 100-150 мл/м². Після цього все промивають теплою водою, витирають досуха й проводять дезобробку, починаючи віддаленої від дверей площі. Після закінчення підготовки приміщення, оформляється відповідний протокол, що підписується відповідальними особами за санітарно-гігієнічний стан.

ДР.1.4.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання включає в себе щоденне прибирання, але має ряд додаткових заходів. Проводять миття стелі, очищення та дезінфекційну обробку каналізаційної системи, повітропроводів вентиляційних камер, освітлювального обладнання, зовнішніх поверхонь вікон тощо. Також проводять наведення порядку та прибирання в шафах, стелажах.

ДР 2 Підготовка азоту

ДР 2.1 Очищення азоту від пилу і механічних часток

Це грубе очищення. Азот потрапляє до фільтру грубої очистки, де фільтрується від механічних частинок, пилу. Такий метод забезпечує ступінь очистки 80%. Далі азот проходить через вентилятор до нагрівальної колонки. Нагрівається повітря за допомогою насиченої пари, що рухається по трубопроводу. Після даної стадії конденсат виходить через матеріальний трубопровід.

ДР 2.2 Очищення азоту в головному фільтрі

Далі азот потрапляє у фільтр тонкого очищення, де ступінь очистки забезпечує 99%. Фільтр знаходиться поблизу ферментаційних відділень, тиск на початку дорівнює 80 Па, а в кінці - 450 Па.

ДР 2.3 Надтонке очищення азоту

Для очищення азоту на 99,995% використовують бактерицидні фільтри, які затримують мікрочастинки розміром 0,3 мкм. Очистка азоту проходить в індивідуальних фільтрах з тиском, що на початку дорівнює 140 Па, а в кінці - 600 Па.

ДР 3 Приготування 6% розчину HCl

Приготування композиції 2 вимагає закислення розчину солей задля попередження утворення осаду. Для цього ми будемо використовувати 6% розчин HCl.

Розчин готують окремо в колбі, готовий розчин не стерилізується. Тож для приготування 6% розчину HCl необхідно внести дистильовану воду й додавати кислоту у відношенні 2 мл на 1 л води, при постійному перемішуванні. Приготування має бути саме в такому порядку подачі інгредієнтів задля уникнення сильної екзотермічної реакції. Далі колбу закривають скляною пробкою. Зберігають готовий розчин при температурі не вище 25 °С.

ДР 4 Приготування 10% розчину аміаку - (NH)₄OH

При культивуванні біфідобактерій необхідно підлужнювати рН поживного середовища лугом, адже в процесі культивування біфідобактерії продукують молочну та оцтову кислоти.

Розчин готують у збірнику, масова частка аміаку має складати 25%, густина має бути 0,960 г/см³. Тож для отримання 10% водного розчину (NH)₄OH беруть сухий натрій гідроксиду масою 0,1 кг та розчиняють у питній воді. Далі приготовлений розчин стерилізують у збірнику гострою парою при тиску 0,15 МПа і температурі 121 °С протягом 30 хвилин.

ДР 5. Приготування поживного середовища

У склад модифікованого поживного середовища МРС входять такі компоненти, г/л:

- Пептон - 13,20

- Глюкоза - 5,0
- Лактоза - 5,0
- Цистеїн - 0,2
- MgSO₄ - 2,0
- Лимоннокислий амоній - 8,0
- MnSO₄ - 2,0
- K₂HPO₄ - 2,0
- Агар - 1,5
- М'ясна вода - 100,0
- Дріжджовий автолізат - 50,0
- Печінковий екстракт - 100,0
- Твін-80 - 1,0
- Дистильована вода - 1000,0

Компоненти потрібно готувати та стерилізувати окремо, адже поживне середовище має термолабільні та термостабільні компоненти, які не можна поєднувати. А також для підвищення якості поживного середовища.

ДР 5.1 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах

На цьому етапі ми будемо використовувати вже готове поживне середовище МРС, у вигляді порошку. Потрібно буде приготувати 480 мл поживного середовища.

Беремо колбу загальним об'ємом 1 л. Ми беремо колбу такого об'єму, щоб завадити контакту готового поживного середовища з ватно-марлевою пробкою відповідно контамінації.

Для цього на електронних вагах ми зважуємо 30,7 г порошку. В колбу наливаємо 480 мл дистильованої води туди ж додаємо сухе поживне середовище. Добре перемішуємо та нагріваємо до розчинення. Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізація компонентів відбувається в автоклаві при 121 °С, 15-20 хв. Після охолоджуємо до 45-50 °С. Далі готове поживне середовище розливаємо в 2 колби по 240 мл в асептичних умовах.

ДР 5.2 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3 л

В цьому етапі ми теж використовуємо готове сухе поживне середовище.

Беремо колбу об'ємом 5 л, на електронних вагах зважуємо 138,2 г поживного середовища. В колбу наливаємо 2,16 л дистильованої води, висипаємо сухе поживне середовище, перемішуємо. Нагріваємо до розчинення та закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою.

Стерилізацію проводимо в автоклаві при 121 °С, 15-20 хв, після охолоджуємо до 45-50 °С. Після вміст колби в асептичних умовах переносимо в простерилізований інокулятор об'ємом 3 л.

ДР 5.3 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі потрібно приготувати 21,6 л поживного середовища.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 21,6 л модифікованого поживного середовища МРС

Компоненти	К-сть компонентів для приготування 21,6 л середовища (г)	Композиція	Об'єм композиції (л)
Пептон	216,0	1	18,59
Глюкоза	108,0		
Лактоза	108,0		
Цистеїн	4,32		

Продовження Таблиці 4.1

Агар	32,4		
М'ясна вода	2 160,0		
Печінковий екстракт	2 160,0		
Твін-80	21,6		
Дріжджовий автолізат	1 080,0		
Дистильована вода	12 700,0		
MgSO ₄	43,2	2	3,01
Лимоннокислий амоній	172,8		
MnSO ₄	43,2		
K ₂ HPO ₄	43,2		
Дистильована вода	2 710,0		
Всього			21,6

Так як середовище є багатоконпонентним, воно містить термостабільні та термолабільні компоненти, які не можна стерилізувати разом. Тож ми поділимо середовище на композиції для стерилізації.

Композиція 1: в простерилізований інокулятор наливають $\frac{1}{2}$ дистильованої води від об'єму 1 композиції, туди додаємо компоненти, перемішуємо, нагріваємо до розчинення та починаємо процес стерилізації.

Композиція 2: в колбу об'ємом 5 л наливаємо дистильовану воду, при перемішуванні додаємо сипкі компоненти. Далі починаємо закислювати розчин солей, для цього додаємо 6% HCl. Після починаємо процес стерилізації

Стерилізацію термолабільних компонентів (композиція 1) проводять в самому інокуляторі при 112 °С 40 хвилин. Термостабільні компоненти (композиція 2) стерилізують в автоклаві при 130 °С впродовж 40 хвилин.

Далі при вимкненій мішалці в інокуляторі додаємо вміст колби через факел-дозатор. Таким чином поєднуючи обидві композиції. Останнім кроком буде вирівнювання рН до 6,4-6,8 за допомогою 10% (NH)₄OH та продув підготовленим азотом через трубу перетискання.

ДР 5.4 Приготування поживного середовища для ферментера, об'ємом 300 л

Для вирощування інокуляту в ферментері об'ємом 300 л потрібно приготувати 216 л поживного середовища.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 216 л модифікованого поживного середовища МРС

Компоненти	К-сть компонентів для приготування 2,16 л середовища (г)	Композиція	Об'єм композиції (л)
Пептон	2 160,0	1	185,94
Глюкоза	1 080,0		
Лактоза	1 080,0		
Цистеїн	43,2		
Агар	324,0		
М'ясна вода	21 600,0		
Печінковий екстракт	21 600,0		
Твін-80	216,0		

Дріжджовий автолізат	10 800,0		
Дистильована вода	127 044,0		
MgSO ₄	432,0	2	30,06
Лимоннокислий амоній	1 728,0		
MnSO ₄	432,0		
K ₂ HPO ₄	432,0		
Дистильована вода	27 040,0		
Всього			216,0

Стерилізація композиції 1 здійснюватиметься у ферментері об'ємом 300 л, стерилізація композиції 2 - у збірнику об'ємом 50 л.

Композиція 1: в простерилізований ферментер вливаємо питну воду по трубопроводу, потім додаємо компоненти композиції 1 через об'ємно-ваговий пристрій. Прогріваємо ферментер до 50 °С насиченою водяною парою, яка подається трубопроводом в рубашку. Ми це робимо, щоб попередити деформацію ферментера. Після чого починаємо стерилізацію при 112 °С, 40 хв.

Композиція 2: в простерилізований збірник заливаємо питну воду, вмикаємо мішалку та додаємо сипкі компоненти композиції 2. Після цього ми починаємо закислювати рН - додаємо 6% HCl через факел-дозатор при вимкненій мішалці. Далі починаємо стерилізацію при 130 °С, 40 хв. Готовий розчин охолоджують до 40-50 °С.

Тоді починаємо змішування обох композицій в ферментері за допомогою азоту, що постачається через трубу перетискання. Перемішуємо.

Після змішування всіх простерилізованих компонентів у реакторі відбувається їх гомогенізація та вирівнювання рН до 6,4-6,8. Для цього додають 10% розчин (NH)₄ОН від ДР 4 при перемішуванні. Значення рН контролюється відповідним датчиком у реакторі, додатково відбирають проби поживного середовища для перевірки стерильності.

ДР 6. Зберігання поживного середовища

Готове поживне середовище подається до збірника та зберігається до використання. Допустимий термін зберігання в асептичних умовах - 14 діб.

ДР 7. Підготовка посівного матеріалу

ДР 7.1 Одержання культури I генерації

Беремо 1 ампулу з 3 дозами, концентрацією 10^8 КУО/см³, з ліофілізованою культурою *Bifidobacterium bifidum* BGN4. Для початку ампулу обробляють спиртом та відкривають в асептичних умовах, додаючи фізіологічний розчин (9% NaCl), дозування - 1 см³/дозу. Добре перемішавши розчин з культурою вносять по 1 мл в пробірки з 9 мл поживного середовища з бульйоном МРС та ставлять в анаеростат за температури 37+/-1 °С, залишаючи на 48 годин. Після цього для контролю чистоти культури потрібно висіяти оживлену культуру методом глибинного посіву на агаризоване щільне середовище МРС. Для цього ми наповнимо пробірки агаризованим поживним середовищем, введемо культуральну рідину методом висіву. Інкубація відбувається при температурі 37+/-1 °С, 48 години, у вертикальному положенні. У пробірках не має спостерігатись сторонньої мікрофлори, тому культуру додатково висівають на середовище Сабуро для виявлення грибів, дріжджів та на середовище МПА - сторонніх бактерій.

ДР 7.2 Одержання культури II генерації

За умов, що контроль I генерації, не виявляє сторонньої мікрофлори, то цей посівний матеріал використовують для культури II генерації. Далі до колби об'ємом по 250 мл вносимо по 230 мл стерильного модифікованого середовища МРС від ДР 5.1 переносимо культуру I генерації (10 мл від ДР

7.1), вирощену в пробірках в асептичних умовах. Вирощування культури відбувається в колбах з загальним об'ємом по 240 мл в кожній до накопичення біомаси 10^8 КУО/мл. Так як даний штам є облигатним анаеробом накопичення буде відбуватись без перемішування, 1 раз за добу за для перерозподілу біомаси, в анаеростаті при температурі 37 ± 1 °С протягом 70-72 годин. Методом Коха - висівом на середовище Біфідум, визначаємо концентрацію живих біфідобактерій в 1 см^3 .

ДР 7.3 Одержання культури III генерації

За умов, що контроль II генерації, не виявляє сторонньої мікрофлори та задовольняє умови накопичення, то цей посівний матеріал використовують для одержання культури III генерації. Культивування здійснюватиметься в простерилізованому інокуляторі об'ємом 3 л. В інокулятор вносять за стерильних умов з колби об'ємом 5 л поживне середовище від ДР 5.2 потім додають підготовлений посівний матеріал II генерації в обсязі 480 мл (ДР 7.2). Процес культивування здійснюватиметься при температурі 37 ± 1 °С. Під час процесу контролюється концентрація живих клітин, температура, рН середовища та відсутність сторонньої мікрофлори.

ДР 7.4 Одержання культури IV генерації

За умов, що контроль III генерації, не виявляє сторонньої мікрофлори та задовольняє умови накопичення, то цей посівний матеріал використовують для одержання культури IV генерації. Культивування здійснюватиметься в інокуляторі об'ємом 30 л з коефіцієнтом заповнення 0,8.

Оскільки композиція 1 поживного середовища простерилізована в інокуляторі від ДР 5.3 та оходжена до 45 °С, то композицію 2 ми вносимо в стерильних умовах через факел-дозатор з колб. Перевіряємо та вирівнюємо рН до 6,4-6,8 за допомогою 10% (NH)₄ОН від ДР4.

Далі продуваємо інокулятор азотом від ДР 2 через трубу перетискавання, переносимо посівний матеріал III генерації (ДР 7.3) в асептичних умовах через засівну колбу. Після чого відбувається процес

накопичення посівного матеріалу IV генерації при температурі 37 ± 1 °C протягом 70-72 годин в анаеробних умовах. Температура буде підтримуватись подачею гарячої та холодної води в рубашку інокулятора. Концентрація біфідобактерій має бути не менше 10^8 КУО/см³. Контроль рН на рівні 6,4-6,8, відбудуватиметься за допомогою 10% NaOH або 6% HCl, контроль чистоти культури проводиться методом посіву на середовище МПА та Сабуро у пробірках та мікроскопіюванням.

ТП 8 Виробниче культивування

Культивування відбудуватиметься в ферментаторі об'ємом 300 л з коефіцієнтом заповнення 0,8, посівного матеріалу подаватиметься 10% від об'єму поживного середовища, тобто 24 л.

В ферментері знаходиться композиція 1 об'ємом 185,94 л, охолоджена до 45 °C. Наступним кроком буде додати композицію 2 об'ємом 30,06, яка знаходиться в збірнику об'ємом 50 л, за допомогою азоту, що буде подаватись через трубу перетискання.

Потім необхідно вирівняти рН середовища до 6,4-6,8 за допомогою 10% (NH)₄OH від ДР 4. Далі продуваємо ферментер азотом через трубу перетискання та починаємо вносити культуру IV генерації (ДР 7.4), загальним об'ємом 24 л, з інокулятора. Включаємо мішалку, обидві композиції та культура починають гомонізуватись.

Наступний етап стерильного внесення 24 л посівного матеріалу у виробничий ферментер через об'ємно-ваговий дозатор. Концентрація посівного матеріалу при внесенні має бути 10^8 КУО/см³, але знижується при розведенні з поживним середовищем у ферментері до 10^7 КУО/см³.

Мають дотримуватись основні параметри культивування: анаеробність, асептичність, температура 37 ± 1 °C, яка підтримується подачею гарячої або холодної води в рубашку ферментеру; надлишковий тиск 0,03-0,04 МПа, рівень рН 6,4-6,8 тощо. Вони вимірюються та фіксуються за допомогою датчиків.

Так як біфідобактерії є облігатними анаеробами, то процес вирощування у ферментері відбувається під тиском азоту, який подається через трубопровід. Також у процесі біосинтезу присутнє періодичне механічне перемішування з частотою 70-100 об/хв протягом 2-3 хвилин після подачі розчину 10% аміаку (від ДР 4) до середовища та перед відбором проб, тобто кожні 4-6 годин. Це дозволяє рівномірно збагатити біомасу азотом.

Виробниче культивування відбувається до досягнення концентрації 2×10^7 КУО/мл. В такому процесі біфідобактерії активно розмножуються та розвиваються зі збільшенням концентрації, при цьому збіднюючи поживне середовище, вони знаходяться в стадії експоненціального росту. Отже, об'єм культуральної рідини має складати 240 л.

Для мікробіологічного контролю та концентрації живих клітин кожні 4-6 години з ферментера відбирають проби. Для цього використовують вказані раніше методи: висів культуральної рідини на середовище МПА, Сабуро та визначення концентрації біфідобактерій на середовищі Блаурока за методом Коха.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1 Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи утилізують, направляючи на очисні споруди (від ДР 4, ДР 5). Для цього залишки розбавляють значною кількістю води.

ЗВ 8.2 Знешкодження азоту

Відпрацьований азот, що надходить від ферментера, інокуляторів (від ДР 2, ДР 5, ТП 8) відправляють до системи очищення азоту.

РОЗДІЛ 5

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу

Для промислових підприємств важливим показником якості та безпеки продукції є мікробіологічний контроль виробництва і готової продукції. Визначення концентрації біомаси ми будемо визначати за допомогою датчику BE-2100 для моніторингу біомас. Це безконтактний датчик, що кріпиться до зовнішньої стінки ферментеру. У датчику BE-2100 використовуються інфрачервоні лазери і детектори. Кожна пара лазер-детектор в матриці чутлива до різних діапазонів зміни концентрації біомаси. Також датчик BE-2100 використовує новий метод оптичного моніторингу, який лінійно реагує на біомасу в дуже широкому діапазоні зростання: від менше ніж 0,1 до більше ніж 300 одиниць OD, а за допомогою програмного забезпечення можна калібрувати датчик в будь-яких можливих одиницях (г/л, од/мл) [47].

Визначення кількості життєздатних біфідобактерій є одним із основних показників. Кількість живих біфідобактерій перевіряють паралельно з робочим стандартним зразком біфідумбактерину. 1 мл культури переносять у пробірки, що містять по 9 мл модифікованого середовища МРС та перемішують шляхом 12-15 кратного прокачування, отримуючи при цьому 1 дозу біфідобактерій в об'ємі 10 мл середовища. З цих пробірок роблять послідовні десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-9} . Пробірки з розведеними досліджуваними зразками препарату і робочим стандартним зразком у поживних середовищах поміщають в анаеростат при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ і інкубують протягом 4-х діб. Після закінчення інкубації відмічають розведення, в яких є ріст колоній біфідобактерій.

Дослідження на сторонню мікрофлору Контроль на відсутність сторонніх мікроорганізмів проводять:

1. Методом мікроскопії - здійснюється шляхом перегляду мазків, приготованих із розчиненого препарату та пофарбованих за методом Граму. В мазках повинні бути позитивні поліморфні палички з можливою біфуркацією на одному або двох кінцях, щорозміняться у вигляді скупчень або окремих клітин.

2. Мікробіологічним методом – здійснюється шляхом посіву на м'ясосептонний агар з 5% глюкозою та агаризоване середовище Сабуро. Висівають по 0,5 культуральної рідини мл у пробірки (по 2 пробірки з поживним середовищем). Посівний матеріал розподіляють по всій поверхні поживного середовища погойдуючи пробірку. Посіви на МПА, агаризованому середовищі Сабуро інкубують при температурі $37\pm 1^\circ\text{C}$ (спочатку в горизонтальному положенні (протягом 2 діб), а потім - у вертикальному положенні. Результати посівів враховують через 48 годин , 72 години і через 8 діб. Посіви на агаризованому середовищі Сабуро інкубують при температурі $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 8 діб. Після інкубації посівів протягом вказаних термінів на поживних середовищах МПА не повинно виявлятися росту сторонніх мікроорганізмів, на твердому агаризованому середовищі Сабуро - росту грибів. У випадку виявлення у посівах сторонніх мікроорганізмів контроль повторюють на подвоєній кількості зразків препарату.

- При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіві досліджувану культуральну рідину вважають відповідає вимогам.

- При наявності росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків, хоча б в одній пробірці, серію бракують.

Визначення антагоністичної активності методом агарових блоків. Для цього 1 см^3 культуральної рідини переносять у стерильну чашку Петрі, вносять $15\text{-}20\text{ см}^3$ розплавленого агаризованого середовища, охолодженого до температури $45\pm 1^\circ\text{C}$, ретельно перемішують і залишають чашки на холодній горизонтальній поверхні до затвердіння середовища. Вирощування

здійснюють при анаеробних умовах за температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ впродовж 72 год, після чого агаризований блок вирізають та розміщують у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2 (підійде будь-яке інше придатне для вирощування досліджуваних патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів) і радіально підсівають тест-культури. Засіяні чашки інкубують за температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ впродовж 72 год. Ступінь чутливості оцінюють за розміром зон затримки росту, в мм:

- 5-15 – малочутливі;
- 15-20 – помірно чутливі;
- 30-40 – високочутливі.

Визначення адгезивної активності експрес-методом. Для цього методу використовують 0.1 М фосфатний буфер в ізотонічному розчині хлориду натрію (рН 7,2-7,3) мікроорганізми вирощують у рідкому середовищі МРС впродовж 2 діб за температурою $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Субстратом є формалізовані еритроцити людини, попередньо двічі відмиті буферним розчином з центрифугуванням (300-1000 об/хв.) Використовують суспензію еритроцитів концентрацією 10^8 кл/см³ буфера. Для проведення досліду на предметне скло наносять одну краплину буферного розчину, в якому суспендують по одній краплині (посівною петлею) суспензії еритроцитів та мікроорганізмів безпосередньо з поживного середовища. На одному скельці можна одночасно помістити до п'яти зразків. Предметне скельце з еритроцитами та мікроорганізмами поміщають на чашку Петрі, на 30 хв. За температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Потім препарат сушать за тієї самої температури, фіксують жаром та фарбують метиленовим синім або фуксином. Ступінь адгезії аналізують у світловому мікроскопі. Адгезивні властивості оцінюють за допомогою середнього показника адгезії (СПА) – середньої кількості мікроорганізмів, що прикріплено до одного еритроциту при підрахунку не менш як 25 еритроцитів в одному полі зору. Залежно від значення показника СПА адгезивність вважають:

- нульвою - від 0 до 1,0;
- низькою - від 1,01 до 2,0;
- середньою - від 2,01 до 4,0;
- високою - понад 4,0.

5.2 Фізико-хімічний контроль

Такий контроль передбачає регулювання умов проведення ферментації, хімічного складу поживного середовища та фізико-хімічних властивостей напівпродукту та готового продукту. Кожні 4-6 годин з ферментера відбирається зразки. Регулюються температура, рН середовища протягом всієї ферментації. Контроль здійснюється за допомогою, термометру та рН-метру, що занурені у культуральну рідину. Для контролю рН використовується розчин 10% $(\text{NH})_4\text{OH}$, а для контролю температури сорочка ферментеру. В нашому випадку піноутворення не потребує контролю, адже перемішування здійснюватиметься періодично й тільки для розподілення азоту та поживних речовин в біомасі.

ВИСНОВОК

В даній дипломній роботі для виробництва біфідумбактерину було обрано *Bifidobacterium bifidum* BGN4 як продуцент.

Проаналізувавши фізіологічні-біохімічні властивості штаму-продуценту було обрано вид та склад поживного середовища, а саме модифіковане поживне середовище MPC на основі пептону, дріжджового автолізату, печінкового екстракту тощо, вибраний спосіб приготування та стерилізації. Також були визначенні параметри анаеробного культивування: температура $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, рівень рН 6,4-6,8, що є оптимальним для культивування біфідобактерій та контролюється за допомогою 6% HCl та 10% (NH)₄OH, подача азоту, періодичне перемішування при 70-100 об/хв кожні 4-6 годин.

Після дослідження ринку було прораховано кількість етапів та необхідні об'єми інокуляторів - 3л і 30 л, збірника - 5 л та ферментеру - 300л з коефіцієнтом заповнення 0,8.

Враховуючи всі особливості, характеристики, умови культивування штаму-продуценту було обрано констукцію ферментера, мішалки, подачу азоту (що проходить грубе очищення, головний фільтр і надтонке очищення, а закуповується в готових балонах) тощо та методи підготовки обладнання для використання - СІР- мийка (для внутрішнього миття та ополіскування ферментера), "Біонол" або каустична сода (миючі засоби), "Санітаб" (дезінфікуючий засіб для поверхонь обладнання, приміщень). Задля приготування поживного середовища з найоптимальнішими умовами рН (6,4-6,8) культивування було обрано 10 % (NH)₄OH як підлужнювач середовища та 6% HCl як закислювач композиції солей поживного середовища для їхнього повного розчинення.

Задля забезпечення якості цільового продукту було підібрано методики контролю на стадії біосинтезу, а саме оптичний моніторинг біомаси за

допомогою датчику BE-2100, кількість життєздатних біфідобактерій, як один із основних критеріїв. Дослідження на сторонню мікрофлору перевіряють мікробіологічним методом та методом мікроскопії, за допомогою експрес-методу визначають активність адгезивності. Контроль температури та рівня рН здійснюється термометром та рН-метром, що занурені в культуральну рідину.

Список використаних джерел

1. Капрельянц Л. В., Труфкаті Л. В., Крупицька Л. О. Поживне середовище для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на основі рослинної сировини. // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. Т.3. – №4 (64). – 2015.
2. Бондаренко В. М., Вороб'єв А. А. Дисбіози та препарати з пробіотичною функцією. // Журн. мікробіол. – 2004. – № 1. – С. 8492.
3. Бондаренко В. М., Грачева Н. М., Мацулевич Т. В. Дисбактеріози кишечника у дорослих. // КМК Scientific Press. – 2003. – С. 224.
4. Пребіотики: хімія, технологія, застосування. / Л. В. Капрельянц. – Київ: ЕнтерПринт, 2015. – 252с.
5. Чому так необхідні біфідобактерії? – Спілка молочних підприємств України. Спілка молочних підприємств України. URL: <https://uadairy.com/chomu-tak-neobhidni-bifidobakteriyi/> (дата звернення: 22.02.2023).
6. БІФІДУМБАКТЕРИН -БІОФАРМА, інструкція, застосування препарату БІФІДУМБАКТЕРИН -БІОФАРМА Порошок для орального та місцевого застосування по 5 або 10 доз у флаконах № 10. Нормативно-директивні документи МОЗ України. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=35141> (дата звернення: 01.03.2023).
7. Державний реєстр лікарських засобів України. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&query=> (дата звернення: 07.03.2023).
8. Населення України (1990-2022). Ставки, індекси, тарифи. URL: <https://index.minfin.com.ua/ua/reference/people/> (дата звернення: 18.11.2022).

9. 9. Lebir, S.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, SC Host interactions of surface molecules of probiotic bacteria: Comparison with commensals and pathogens. *National Rev. Microbiol.* 2010, 8, 171–184.
- 10.10. Kim, IH; Park, MS; Ji, GE Characterization of adhesion of *Bifidobacterium* sp. BGN4 to human Caco-2 enterocyte-like cells. *J. Microbiol. Biotechnology.* 2003, 13, 276–281.
- 11.11. Crociani, J.; Grill, JP; Hupper, M.; Ballongue, J. Adhesion of different strains of bifidobacteria to human Caco-2 enterocyte-like cells and comparison with an in vivo study. *Lett. App. microbiol.* 1995, 21, 146-148.
- 12.12. Lee, M.J.; Zang, Z.; Choi, E.Yu.; Shin, HK; Ji, GE Cytoskeletal reorganization and cytokine production by macrophages by bifidobacterial cells and cell-free extracts. *J. Microbiol. Biotechnology.* 2002, 12, 398–405.
- 13.Полтавська О.А, Коваленко Н.К. Біфідобактерії і їх біологічні властивості. *Мікробіологія та біотехнологія* №1. 2008. С. 1-13.
14. Поживне середовище для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на основі рослинної сировини / Капрельянц Л.В. та ін. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького.* 2015. №4, т. 17. С. 47-53.
- 15.Scale-up and tech transfer from 100 L SIP/CIP vessel to the 300 L S.U.F. / ThermoFisher Scientific, Application Note URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BPD/Application-Notes/scale-up-sip-cip-suf-app-note.pdf> (дата звернення: 18.03.2023).
- 16.Biostat D-DCU / Application Note URL: <https://www.sartorius.com/download/10102/broch-biostat-d-dcu-sbi1512-e-data.pdf> (дата звернення: 18.03.2023).
- 17.Купити азотний балон, заправити азот, Ціна в Києві Україна – ФОП Ревенко. | "Балони та Обладнання" (096) 575-16-16. ТОВ «Балони та Обладнання» продаж газових балонів. URL: <http://balon.kiev.ua/shop/gazovye-ballony-srednego-davleniya/azotnyie-ballony/> (дата звернення: 26.03.2023).

18. Lysoform. Lysoform. URL: <https://lysoform.shop/2021/05/05/yak-vybraty-myyuchyj-zasib-dlya-posudu/> (date of access: 18.03.2023).
19. Корисна інформація для споживачів про мийні засоби. Головна. URL: <https://consumerhm.gov.ua/752-korisna-informatsiya-dlya-spozhivachiv-pro-mijni-zasobi> (дата звернення: 18.03.2023).
20. Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів. Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-п#Text> (дата звернення: 18.03.2023).
21. Біонол 1 кг. DLX.UA – все для стоматології – стоматологічні матеріали, інструменти та обладнання. URL: <https://www.dlx.ua/ua/bionol-1kg> (дата звернення: 22.03.2023).
22. Біонол: інструкція, опис | Лізоформ. Lysoform: Комплексні технології в сфері гігієни від ГК "Лізоформ". URL: <https://lysoform.ua/products/bionol/> (дата звернення: 22.03.2023).
23. В. Ч. В. ДЕЗІНФЕКТАНТИ АБО ДЕЗІНФЕКЦІЙНІ ЗАСОБИ. Фармацевтична енциклопедія. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2423/dezinfektanti-abo-dezinfekcijni-zasobi> (дата звернення: 22.03.2023).
24. Методи дезінфекції. Методи якими проводять дезінфекцію. Інтердез. URL: <https://interdez.com.ua/press/metody-dezinfeksii.html> (дата звернення: 22.03.2023).
25. Дезінфекція. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів 5-го курсу медичного факультету з дисципліни “Епідеміологія”/МОЗ. URL: <https://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/28042/1/Чумаченко%20Дез%20інфекція%20№20-347073.pdf> (дата звернення: 25.03.2023).
26. Навчання персоналу мікробіологічних лабораторій | Центр громадського здоров'я. Центр громадського здоров'я України | МОЗ. URL: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/antimikrobn>

- rezistentnist/navchannya-personalu-mikrobiologichnikh-laboratoriy (дата звернення: 25.03.2023).
27. Кодекс законів про працю України | «Дебет-Кредит» - Нормативні документи. «Дебет-Кредит» - Нормативні документи. URL: https://docs.dtkk.ua/doc/1011.23.100?page=5&_ga=2.46199847.1879519557.1680456460-389388961.1680456460#pn790 (дата звернення: 15.04.2023).
28. Про охорону праці | «Дебет-Кредит» - Нормативні документи. «Дебет-Кредит» - Нормативні документи. URL: https://docs.dtkk.ua/doc/1085.154.0?_ga=2.46199847.1879519557.1680456460-389388961.1680456460#pn109 (дата звернення: 15.04.2023).
29. Управління виконавчої дирекції Фонду у Полтавській області. Фонд соціального страхування України. URL: <http://www.fse.gov.ua/fse/control/pol/uk/publish/article/106914;jsessionid=4C8E0E51D482900E93755700733A50E8> (дата звернення: 15.04.2023).
30. Про охорону праці Стаття 17. Обов'язкові медичні огляди працівників певних категорій. Головна - Законодавство України 2019 рік. URL: https://kodeksy.com.ua/pro_ohoronu_pratsi283_new/statja-17.htm (дата звернення: 15.04.2023).
31. Про затвердження Державних санітарних норм та правил "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" (ДСанПіН 2.2.4-171-10) Країна: Україна Тип акта: НаказНомер акта: 400Установа: Міністерство охорони здоров'я УкраїниДата ухвалення: 12 травня 2010 р.
32. Інструкція по застосуванню Біонол, з таблицями. Медтехніка Med-Line. URL: <https://med-line.com.ua/ua/bionol-instr> (дата звернення: 29.04.2023).
33. Методичні вказівки по використанню засобу Санітаб (Sanitab) з метою дезінфекції та достерілізаціоного очищення. Медтехніка Med-Line.

- URL: <https://med-line.com.ua/ua/instrukciya-sanitab> (дата звернення: 29.04.2023).
34. Станція СІР-мийки обладнання КМЗ-СЦМ : веб-сайт. URL: <https://kmbp.com.ua/produktsiya/rishennia-dlia-molochnoi-promyslovosti/stantsiji-cip-mijki/stantsiia-cip-myiky-obladnannia-kmz-stsm> (дата звернення 29.04.2023).
35. ZakonOnline. Наказ № 502 від 14.12.2001 Про затвердження методичних рекомендацій. Аналітично-правова система ZakonOnline. URL: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907___487517 (дата звернення: 20.04.2023).
36. Лобова О.В., Левішко А.С., Гуменюк І.І. Біотехнології : навчальний посібник. Київ, 2021. URL: https://www.agroeco.org.ua/wpcontent/uploads/pdf/cafedra/np_biotechnology.pdf (дата звернення: 20.04.2023).
37. Кафедра аптечної технології ліків – Національний Фармацевтичний Університет. URL: <https://atl.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/09/vimogi-do-vigotovlennja-sterilnih-likarskih-zasobiv-umovah-aptek.pdf> (дата звернення: 27.04.2023).
38. Про погодження методик визначення біологічних речовин. Офіційний вебпортал парламенту України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0004541-04#Text> (дата звернення: 27.04.2023).
39. Практична мікробіологія / Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Широбоков В.П. Тернопіль : “Укрмедкнига”, 2004.
40. Про погодження методик визначення біологічних речовин | «Дебет-Кредит» - Нормативні документи. «Дебет-Кредит» - Нормативні документи. URL: <https://docs.dtkr.ua/download/pdf/1039.5707.1> (дата звернення: 25.04.2023).

41. О. Кочкин, Р.В. Сагайдак-Нікітюк Дослідження методів знешкодження та утилізації відходів фармацевтичних підприємств. Національний фармацевтичний університет. 2020. С. 322-335.
42. Мікробіологічний контроль підприємств. Мікробіологічний моніторинг. Інтердез. URL: <https://interdez.com.ua/mikrobiologicheskij-monitoring-predpriyatij> (дата звернення: 27.04.2023).
43. С.С. Киця Мікробіологічний контроль устаткування на підприємствах харчової промисловості. Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова.
44. Санітарна мікробіологія. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів 1-3 курсів спеціальності «Медицина», «Стоматологія» освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр» / МОЗ. URL: <http://www.kpi.kharkov.ua/archive/microcad/2019/-282.pdf> (дата звернення: 15.05.2023).
45. М.Ю. Ладоня, О.М. Близнюк Удосконалення біотехнології виробництва пробіотику Біфідумбактерину. Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я. Харків, 2019. С. 282.
46. Ящерицин Є.В. Прилади контролю шкідливих та небезпечних факторів : підручник. Харків, 2021. С. 8-75. URL: <https://repository.kpi.kharkov.ua/server/api/core/bitstreams/583e2dc2-d1e6-4a1a-aff3-39f8d8116aae/content> (дата звернення: 29.05.2023).
47. BE2100 Sensor - Non-Invasive Biomass Monitoring System. Toshniwal Technologies Pvt. Limited. URL: <https://www.toshindia.com/products/be2100-sensor-non-invasive-biomass-monitoring-system> (date of access: 29.05.2023).
48. Методи та засоби мікроскопії / Антонюк В. С. та ін. Київ: НТУУ «КПІ», 2013.

49. Антагоністична активність лактобактерій, ізольованих із ферментованих рослинних продуктів із В'єтнаму / Ж.Ю. Сергєєва та ін. Мікробіологія і біотехнологія. 2016. №4. С. 50-59.
50. Визначення антагоністичної активності пробіотичного препарату «Біозапін» / О.М. Чечет та ін. Вісник Сумського національного аграрного університету. 2022. Вип. 2 (57). С. 61-68.
51. Kim CS, Jung S, Hwang GS, Shin DM. Gut microbiota indole-3-propionic acid mediates neuroprotective effect of probiotic consumption in healthy elderly: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial and in vitro study. Clin Nutr. 2023 May 2;42(6):1025-1033. doi: 10.1016/j.clnu.2023.04.001.
52. Kang S, Lin Z, Xu Y, Park M, Ji GE, Johnston TV, Ku S, Park MS. A recombinant Bifidobacterium bifidum BGN4 strain expressing the streptococcal superoxide dismutase gene ameliorates inflammatory bowel disease. Microb Cell Fact. 2022 Jun 7;21(1):113. doi: 10.1186/s12934-022-01840-2.
53. Lee N, Lee S, Jang SW, Shin HS, Park JH, Park MS, Lee BH. Lysed and disrupted Bifidobacterium bifidum BGN4 cells promote anti-inflammatory activities in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. Saudi J Biol Sci. 2021 Sep;28(9):5115-5118. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.05.028.
54. Kim H, Kim S, Park SJ, Park G, Shin H, Park MS, Kim J. Administration of Bifidobacterium bifidum BGN4 and Bifidobacterium longum BORI Improves Cognitive and Memory Function in the Mouse Model of Alzheimer's Disease. Front Aging Neurosci. 2021 Aug 6;13:709091. doi: 10.3389/fnagi.2021.709091. PMID: 34421576; PMCID: PMC8378450.
55. Hong N, Ku S, Yuk K, Johnston TV, Ji GE, Park MS. Production of biologically active human interleukin-10 by Bifidobacterium bifidum BGN4. Microb Cell Fact. 2021 Jan 19;20(1):16. doi: 10.1186/s12934-020-01505-y. PMID: 33468130; PMCID: PMC7814708.

56. Kim CS, Cha L, Sim M, Jung S, Chun WY, Baik HW, Shin DM. Probiotic Supplementation Improves Cognitive Function and Mood with Changes in Gut Microbiota in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021 Jan 1;76(1):32-40. doi: 10.1093/gerona/glaa090.
57. Kim MJ, Ku S, Kim SY, Lee HH, Jin H, Kang S, Li R, Johnston TV, Park MS, Ji GE. Safety Evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI. *Int J Mol Sci*. 2018 May 9;19(5):1422. doi: 10.3390/ijms19051422.
58. Ku S, Park MS, Ji GE, You HJ. Review on *Bifidobacterium bifidum* BGN4: Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 14;17(9):1544. doi: 10.3390/ijms17091544.
59. Yu DS, Jeong H, Lee DH, Kwon SK, Song JY, Kim BK, Park MS, Ji GE, Oh TK, Kim JF. Complete genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium bifidum* strain BGN4. *J Bacteriol*. 2012 Sep;194(17):4757-8. doi: 10.1128/JB.00988-12.
60. Lin Z, Ku S, Lim T, Park SY, Park MS, Ji GE, O'Brien K, Hwang KT. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Recombinant *Bifidobacterium bifidum* BGN4 Expressing Antioxidant Enzymes. *Microorganisms*. 2021 Mar 13;9(3):595. doi: 10.3390/microorganisms9030595.



Науково-практична міжнародна
дистанційна конференція

**МІКРОБІОЛОГІЧНІ
ТА ІМУНОЛОГІЧНІ
ДОСЛІДЖЕННЯ В
СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ**

24 березня 2023 р.,
м. Харків, Україна



Науково-практична
міжнародна дистанційна
конференція
«МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА
ІМУНОЛОГІЧНІ
ДОСЛІДЖЕННЯ В
СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ»

Конференція зареєстрована у ДУ
«Український інститут науково-
технічної експертизи та інформації»,
пасвічення № 544 від 19 грудня 2022 року

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ВІСЬМАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЇ ФАРМАЦІЇ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ

№067

Сертифікат

Цим засвідчується, що

Лупан К.О.

брав(ла) участь у роботі Науково-практичної
міжнародної дистанційної конференції
«Мікробіологічні та імунологічні дослідження
в сучасній медицині»
24 березня 2023 р. м. Харків
Тривалість – 5 годин / 0,15 кредитів ЕКТС

Проректор з науково-педагогічної роботи
(інноваційної та науково-дослідної)
Національного фармацевтичного університету,
доктор фармацевтичних наук, професор

Завідувачка кафедри мікробіології, вірусології та імунології,
доктор медичних наук, професор



І.М. Владимірова

Н.І. Філімонова

метаболітів, що виробляються бактеріальними клітинами. І в результаті наночастки стабілізуються бактеріальними клітинами, які запобігають їх агрегації та стабілізують їх розмір і форму.

Наночастки срібла, синтезовані *L. acidophilus* за рахунок своєї форми та розмірів проявляють свої унікальні властивості. Синтезовані наночастинки срібла (AgNP) за допомогою бактерій мають широкий спектр потенційних застосувань у різних сферах, зокрема: біомедицина, аграрна промисловість, захист та відновлення екологічних ресурсів навколишнього середовища, тощо.

Різноманіття застосування цих біочасток зумовлене їх властивостями, які вони мають. А саме, AgNP здатні проявляти антибактеріальні, протигрибкові та противірусні властивості, що робить їх корисними для розробки медичних пристроїв, ранових пов'язок і систем доставки ліків. Також AgNP можна використовувати як пестицид або фунгіцид, оскільки вони показали позитивний вплив на ріст рослин і можуть пригнічувати ріст шкідливих патогенів у культурах. AgNP також можна використовувати для очищення води шляхом зменшення кількості забруднюючих речовин, що потрапляють у навколишнє середовища при обробці полів різними хімічними речовинами та знищення рівню патогенних мікроорганізмів завдяки їх антибактеріальним властивостям.

Висновки. Зелений синтез наночасток срібла з використанням *L. acidophilus* має ряд переваг перед звичайними хімічними методами як екологічність, завдяки використанню нетоксичних реагентів. Крім того, використання бактеріальних клітин забезпечує можливість для виробництва наночасток контрольованого розміру та форми. Також має ряд властивостей для широкого спектру застосування.

Отже, зелений синтез наночастинок срібла з використанням *L. acidophilus* є багатообіцяючим підходом до виробництва наночасток срібла та має потенційне застосування в різних галузях.

ЗЕЛЕНИЙ БІОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК TiO_2 ЗА ДОПОМОГОЮ ПРОБІОТИКІВ

Лупан К.О., Волошина І.М.

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра Київського національного
університету технологій та дизайну, м. Київ, Україна

wirn@ukr.net

Вступ. Сьогодні альтернативою синтезу наночасток без вторинного забруднення є синтез наночасток мікроорганізмами. Бактерії використовують в синтезі, оскільки вони допомагають у відновленні іонів металів до металевих наночасток. Перевагами є екологічність,

нетоксичність, легка ампліфікація, відтворюваність у виробництві, чітка морфологія та низька вартість.

Поверхні та форми наночасток діоксиду титану (TiO_2NP), синтезовані зеленим методом, характеризуються сферичною формою з дрібними порами і зазвичай знаходиться в кластері, що утворює поверхню пучка.

Серед ряду мікроорганізмів для зеленого синтезу використовують молочнокислі пробіотичні мікроорганізми, які є представниками нормальної мікрофлори людини. Головними характеристиками пробіотиків є їх швидкий ріст, непатогенність, регуляція експресії генів, продукують різноманітні ферменти та білки, що беруть участь у синтезі наночастинок.

Потенційними представниками пробіотиків для зеленого синтезу найчастіше застосовують *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* тощо. Результати досліджень показали, що наночастинок діоксиду титану, синтезовані пробіотиками, мають сферичну форму та середній розмір 81 нм.

Вказані вище пробіотики використовують позаклітинний синтез, тобто синтезують металеві наночастки завдяки легкому генетичному переносу. Такі наночастки мають широкий спектр застосування у різних сферах, таких як: аграрна промисловість, біомедицина (ефективна доставка ліків, електрохімічні біосенсори, індикація цитотоксичних пухлинних клітин), відновлення екологічних ресурсів, очисні споруди (а саме нові інновації в очищенні стічних вод для повторного використання та екологічне очищення повітря), вдосконалення фотоелектричних елементів в сонячних панелях, косметичний напрямок, тощо.

Висновок. Зелений синтез наночастинок діоксиду титану за допомогою пробіотиків має ряд переваг перед звичайними фізичними та хімічними методами, а саме ряд властивостей для широкого спектру застосування, економічність та екологічність. Крім того, наночастки, синтезовані за допомогою зеленого біосинтезу є більш ефективними і безпечними, ніж наночастки синтезовані хімічним або фізичним способами.



II Міжнародна науково-практична
інтернет-конференція

**ПРОБЛЕМИ
ТА ДОСЯГНЕННЯ
СУЧАСНОЇ
БІОТЕХНОЛОГІЇ**

20 травня 2022 р.
м. Харків, Україна

токсичність, може виступити інгібітором холінестераз, що руйнують новокаїн в тканинах та сироватці крові людини.

Кінетичні дослідження інгібування проводили спектрофотометрично на УФ-спектрофотометрі SPECORD 200 (Analytic Jena, Німеччина).

Встановлено, що константа швидкості першого порядку гідролізу новокаїну в системі з сироваткою крові людини при додаванні 100 мкМ силібініну достовірно зменшується від $1,26 \pm 0,07 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ до $0,76 \pm 0,07 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ ($p \leq 0,05$), що підтверджує інгібуючі властивості силібініну. При концентраціях силібініну в системі 25, 50 мкМ константа швидкості достовірно зменшується в 1,2 і 1,4 рази відповідно ($K_n^1_{25} = 1,050 \pm 0,001 \times 10^{-3}$, $K_n^1_{50} = 0,880 \pm 0,006 \times 10^{-3}$) ($p \leq 0,05$).

Висновок: вперше достовірно встановлено кінетичні параметри інгібування силібініном процесу деструкції новокаїну ферментами сироватки крові людини. Комбінація новокаїну і силібініну в одній лікарській формі може бути потенційно застосована для фармацевтичної розробки нового лікарського засобу пролонгованої дії.

Вплив наночастинок срібла на організм людини

Савчук О.М., Лупан К.О., Волошина І.М.

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету
технологій та дизайну, Київ, Україна
i_woloschina@yahoo.com

Наночастинки металів набули широкого застосування у різних сферах, від електроніки до медицини. Наночастинки срібла відомі своєю токсичною дією проти мікроорганізмів та пухлин, а їхні розміри дозволяють проникати та вносити з собою різні речовини в складнодоступні місця організму, тому їх часто застосовують у виробництві ліків. Крім того, наночастинки срібла знайшли своє застосування при виготовленні продуктів харчування та їх пакування завдяки своїм антибактеріальним властивостям. Проте, стає питання, як саме будуть діяти ці наночастинки всередині людського організму. Були

проведені дослідження на щурах і виявлено, що регулярне пероральне вживання наночастинок срібла зменшило популяцію лактобактерій та біфідобактерій та збільшило кількість патогених грамнегативних бактерій. Крім того, наночастинок срібла можуть поглинатися імунними клітинами, які знаходяться в епітелії кишечника та здатні викликати запалення, тоді імунна система організму починає секретувати запальні цитокіни. Інше дослідження було ґрунтоване на прийомі різних концентрацій наночастинок і в результаті здоровий баланс мікробіоти змістився в бік патогеної мікрофлори у кожній групі, а величина зміщення залежала від дози. А при подальшому вживанні наночастинок срібла викликали запалення кишечника. Є припущення, що наночастинок срібла при регулярному потраплянні в організм зв'язуються саме з грамозитивними бактеріями та знищують їх, що дозволяє розвиватись грамнегативним бактеріям. Також, на модифікації наночастинок срібла впливає їжа, яка надходить в організм, та розмір самої наночастинок. В простих системах наночастинок срібла розчиняються, але в справжньому організмі цей процес залежить від багатьох факторів, тому ці процеси потрібно ще ретельно вивчати.

Деякі аспекти властивостей наночастинок срібла,

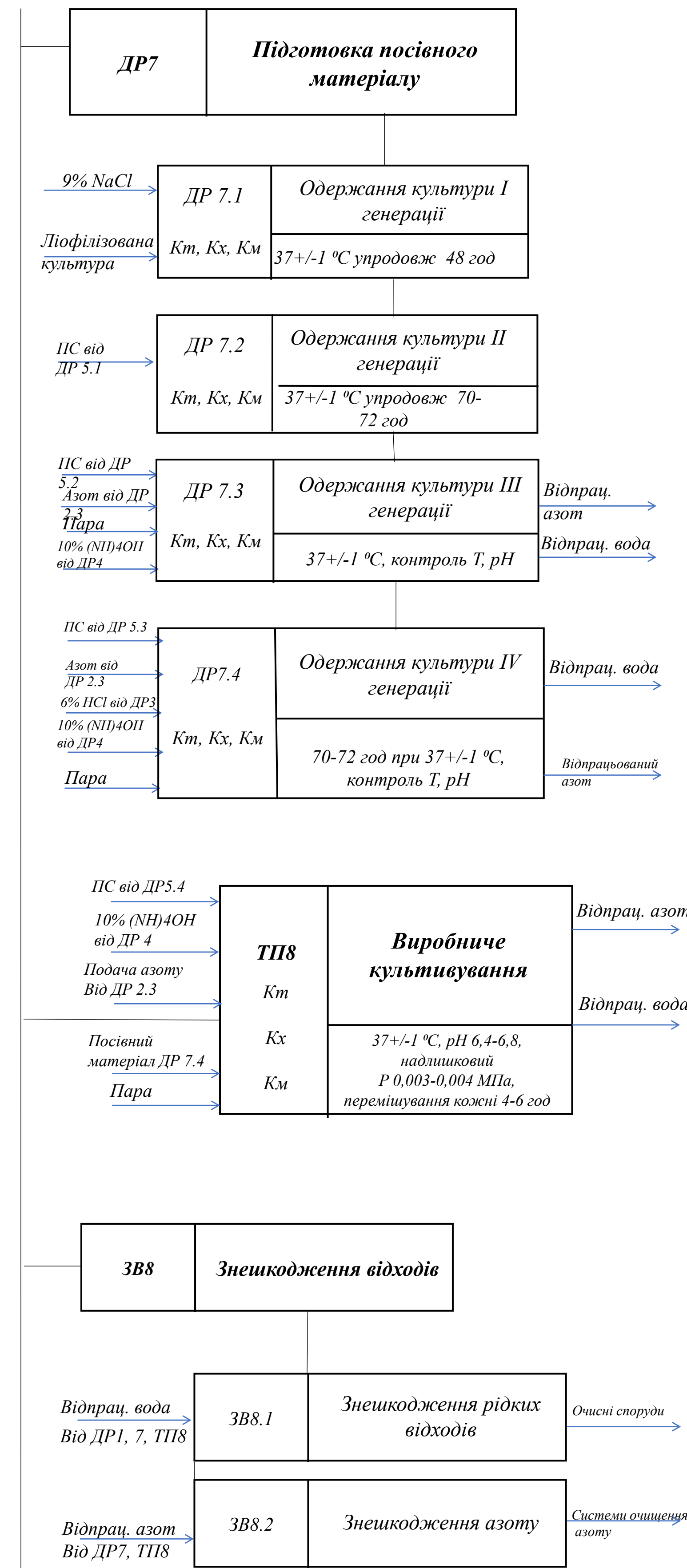
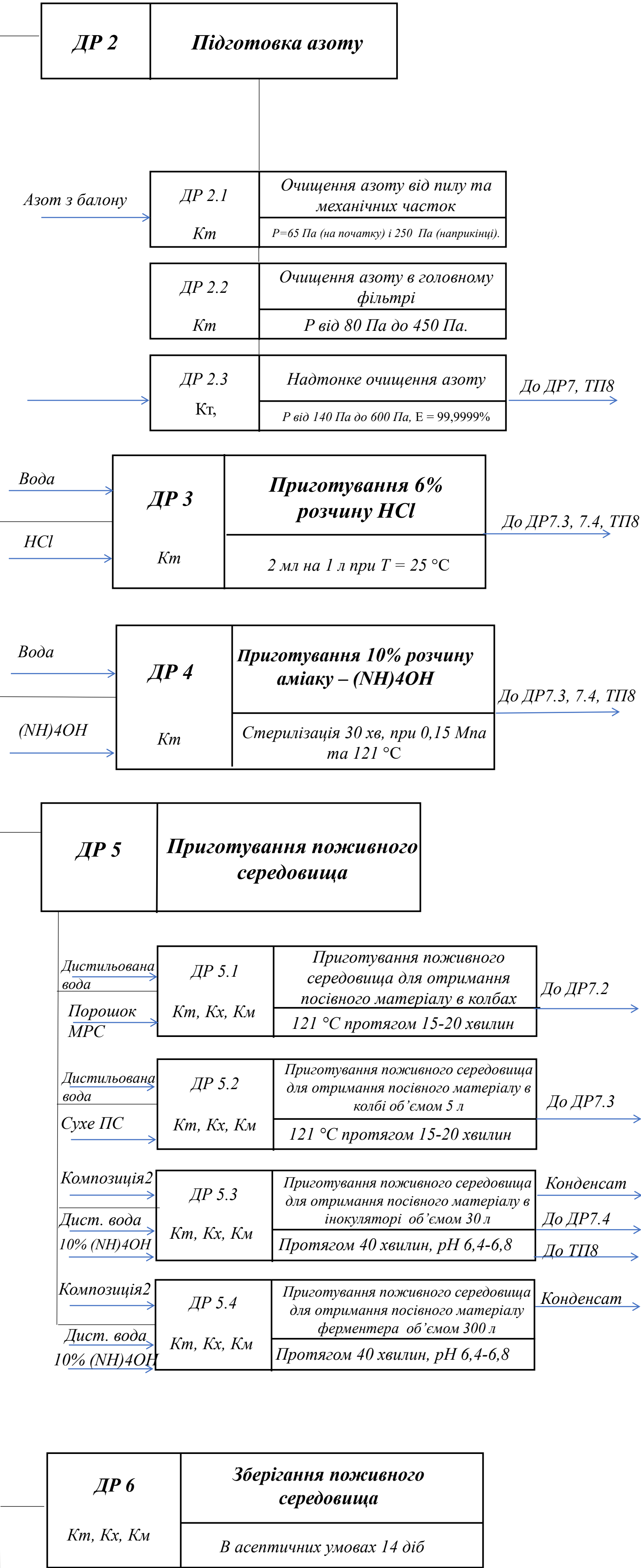
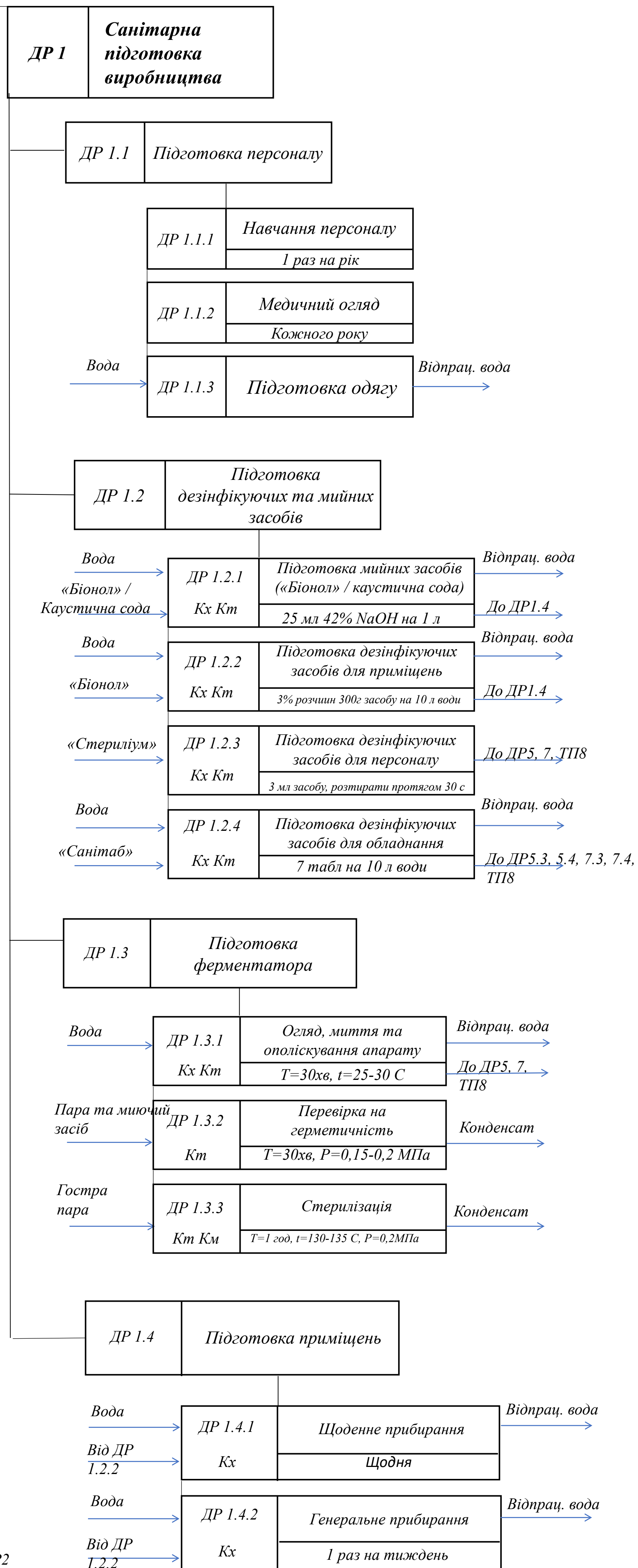
отриманих зеленим синтезом

Савчук О.М., Маліношевська М.О., Шидловська О.А.

Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, Україна

oleksandra.sav2002@gmail.com

Наночастинок металів широко застосовуються у різних галузях науки і техніки, в тому числі в біомедичній, харчовій та косметичній. Використання токсичних для навколишнього середовища відновників та стабілізаторів в хімічних та фізичних методах синтезу обмежують спектр використання наночастинок срібла та інших металів (А. Gour & N. K. Jain, 2019). Зелений синтез із використанням бактерій, рослин і рослинних екстрактів, дріжджів тощо можуть стати джерелом біологічно-активних, безпечних, нетоксичних та



До ДР2

До ДР7

До ЗВ 8

ДБП.ГЧ.162.03														
Зм.	Арх.	№ документа	Підпис	Дата	«Технологія отримання Біфідумбактерину»					Літ.	Маса	Масштаб		
					Д							1:1		
Розробив	Гулан К.О.				Аркуш 1									
Перевірив	Волошин І.М.				Аркуш 1									
Н.Контр.					Блок-схема					КНУТД, ББТ-19				
Затвердив														