

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

---

Факультет: Технології вина та туристичного бізнесу  
(назва факультету, інституту)

---

Кафедра: Біоінженерії і води  
(назва кафедри)

---

Спеціальність: 162 «Біотехнології  
та біоінженерія»

Освітня програма: «Біотехнології  
та біоінженерія»

**КОМПЛЕКСНИЙ ДИПЛОМНИЙ ПРОЕКТ**  
**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЙ ВИРОБНИЦТВА БІОМАСИ МОЛОЧНОКИСЛИХ**  
**БАКТЕРІЙ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ**

**Тема: «Отримання мурамілпептидів із клітинних стінок**  
**молочнокислих бактерій»**

**Виконавець:** студентка 4 курсу СВО «Бакалавр»  
група Біо-49

Коновка Алла Сергіївна  
**Керівник:** к.т.н., доцент Доценко Н.В.

# Одеська національна академія харчових технологій

Факультет Технології вина та туристичного бізнесу

(повна назва)

Кафедра Біоінженерії і води

(повна назва)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код, назва)

Освітня програма «Біотехнології та біоінженерія»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри  
Коваленко О.О.

(підпис)

(ініціали, прізвище)

09 вересня 2019 р

## **ЗАВДАННЯ**

**на дипломний проект**

студенту Коновці Аллі Сергіївні

(прізвище, ім'я, по батькові)

**1. Тема проекту** «Отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій»

затверджена наказом по академії від 09.09.2019 р. № 817-03

**2. Термін здачі** студентом закінченого проекту 10.06.2020 р.

**3. Вихідні дані проекту:** потужність переробки біомаси молочнокислих бактерій 15 кг/добу з отриманням мурамілпептидів.

Впровадження розробленої технології в проект біотехнологічного виробництва

**4. Перелік питань, які повинні бути розроблені**

1. Економічна частина

2. Технологічна частина

3. Інженерно-технічна частина

4. Безпека та економічність рішень проекту

5. НДРС

**5. Перелік графічного (ілюстративного) матеріалу**

План біотехнологічного цеху з повздовжними розрізами

Схема технологічного обладнання (сушильного апарату)

6. Консультанти по роботі, із зазначенням розділів проекту, що стосуються їх

Розділ	Консультант	Завдання видав	Завдання прийняв
Технологічна частина	доц., к.т.н. Доценко Н.В.	09.09.2019 р.	07.06.2020 р.
Економічна частина	доц., к.е.н. Крупіна С.В.	15.05.2020 р.	01.06.2020 р.
Технологічне обладнання	доц., д.т.н. Зиков О.В.	08.05.2020 р.	09.06.2020 р.

4. Дата видачі завдання 09.09.2020 р.

Керівник дипломного проекту

\_\_\_\_\_ (підпис)

Доценко Н. В.

(ініціали, прізвище)

Завдання прийняв до виконання

\_\_\_\_\_ (підпис)

Коновка А.С.

(ініціали, прізвище)

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН-ГРАФІК

№ з/п	Назва етапів роботи та питань, які мають бути розроблені відповідно до завдання	Термін виконання	Позначки керівника про виконання завдань
1	Аналіз ринку біотехнологічних препаратів імуностимулюючих препаратів	05.03 – 20.03	
2	Вивчення методів та умов вирощування біомаси молочнокислих бактерій	20.03 – 28.03	
3	Обґрунтування технології переробки відповідної біомаси	28.03 – 11.04	
4	Розробка технології отримання мурамілпептидів із клітинних стінок	11.04 – 20.04	
5	Підбір і розрахунок технологічного обладнання	20.04 – 25.04	
6	Розрахунок економічних показників і терміну окупності проекту	25.04 – 26.05	
7	Розробка методів охорони навколишнього середовища та заходів з охорони праці для впровадження на біотехнологічному виробництві	26.05 - 01.06	

Керівник

\_\_\_\_\_ (підпис)

Доценко Н. В.

(ініціали, прізвище)

Студент

\_\_\_\_\_ (підпис)

Коновка А.С.

(ініціали, прізвище)

## ЗМІСТ

Анотація .....	
Умовні позначення.....	
<b>1. Економічна частина.....</b>	
<b>2. Технологічна частина.....</b>	
2.1 Літературний огляд за темою проекту.....	
2.1.1 Характеристика посівного матеріалу.....	
2.1.2 Характеристика поживних середовищ.....	
2.1.3 Підготовка поживного середовища, повітря, обладнання, комунікацій.....	
2.2 Опис технології виробництва.....	
2.2.1 Технологічна схема виробництва цільового продукту.....	
2.2.2 Опис технологічних процесів.....	
2.2.3 Схема постадійного контролю отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій.....	
2.2.4 Вимоги до якості готової продукції.....	
2.3 Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій.....	
2.3.1 Визначення графіку роботи цеху з отримання мурамілпептидів....	
2.3.2 Відсотковий розрахунок матеріального балансу.....	
<b>3. Інженерно-технічна частина.....</b>	
3.1 Інженерно-технічне забезпечення технологічного цеху.....	
3.2 Підбір технологічного обладнання.....	
3.3 Розрахунок основного технологічного обладнання.....	
<b>4. Безпека та економічність рішень проекту.....</b>	
4.1 Охорона праці.....	
4.2 Екологічна безпечність виробництва.....	
4.3 Охорона навколишнього середовища.....	
<b>5. НДРС.....</b>	
<b>Список інформаційних джерел.....</b>	
<b>Додатки</b>	

					<i>Дипломний проект</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Студент		Коновка А.С.			<i>Отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій</i>	Літера	Арк.	Аркушів
Конс.		Крупіна С.В.				у		
Конс.		Зиков О.В.						
Керівн.		Доценко Н.В.						
Затв.		Коваленко О.О.						

## АНОТАЦІЯ

Тема комплексного проекту – «Розробка технології виробництва біомаси молочнокислих бактерій та їх використання»

Тема дипломного проекту – «Отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій».

Дипломна робота містить: 5 розділів, 7 ілюстрацій, 12 таблиць, 43 джерела в переліку посилань.

У першому розділі наведено техніко-економічне обґрунтування отримання біомаси молочнокислих бактерій та препаратів на їх основі. комплексної переробки отримання імуностимулюючих засобів із клітинних стінок молочнокислих бактерій.

У другому розділі представлені огляд літератури та існуючі технології комплексної переробки отримання імуностимулюючих засобів із клітинних стінок молочнокислих бактерій. Розроблено технологію виробництва сухого концентрату мурамілпептидів із молочнокислих бактерій.

В розділі третьому здійснено підбір та розрахунок технологічного обладнання виробничого цеху біотехнологічного підприємства.

У четвертому розділі описано вимоги для створення безпечного та зручного місця роботи кожного працівника. Розглянуто норми та заходи з охорони праці на біотехнологічному підприємстві, де планується виробництво мурамілпептидів.

В останньому розділі наведено результати проведення науково-дослідної роботи з розробки поживних середовищ на основі овочевих відварів та визначення умов і режимів для культивування молочнокислих бактерій *Lactobaccillus mesem*.

Ключові слова: автоліз, молочнокислі бактерії, пептидоглікан, мурамілпептиди, імуномодулятори, клітинні стінки молочнокислих бактерій, біополімери.

## **Перелік умовних позначень**

МКБ – молочнокислі бактерії

НК-клітин – клітини-кілери

ГКІ – гострі кишкові інфекції

ААД – антибіотик-асоційована діарея

МДП – мурамілпептид

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота

асРНК – антизмістовна РНК

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЦПМ – цитоплазматична мембрана

ЛПС – ліпополісахариди

ТВІН-80 – полісорбат

УБС – установка безпечної стерилізації

КВП – датчики

ГЦ – гуанін-цитозин

ГДК – гранична допустима концентрація

НАССР – англ. Hazard Analysis and Critical Control Point (система аналізу ризиків, небезпечних чинників і контролю критичних точок)

ВООЗ – всесвітня організація охорони здоров'я

GMP – англ. Good Manufacturing Practice або Належна Виробнича

Практика

ОВНС – оцінка впливу на навколишнє середовище

БАД – біологічно-активні добавки

pH – водневий показник

# 1. ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА

## Вступ

На сьогодні тенденцією в області харчової технології є розробка продуктів харчування з підвищеною біологічною цінністю. Для цього до складу продуктів доцільне введення функціональних інгредієнтів, що мають певні фізіологічні ефекти. Серед різноманіття таких інгредієнтів є пептидоглікани клітинних стінок бактерій – мураміддипептид (МДП) і його похідні, які здатні стимулювати антимікробну активність, протипухлинний імунітет, активувати імунокомпетентні клітини і індукувати синтез ряду цитокінів.

Нині встановлено, що МДП має усі необхідні для патогенноасоційованих молекулярних структур властивостями, що виражаються в стимуляції природженого імунітету і здатності формувати захист від мікробних інфекційних агентів.[1]

Метою економічної частини дипломного проекту є техніко-економічне обґрунтування виробництва імуномодулюючого комплексу мурамідпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій, для використання у фармацевтичній та харчовій галузях.

Для досягнення мети в роботі поставлені та вирішені наступні завдання:

- проведено аналіз ринку;
- доцільність цього проекту з соціальної точки зору;
- розраховано капітальні вкладення у проект;
- розраховано собівартість виробленої продукції;
- розраховано оподаткований прибуток та чистий прибуток;
- розраховано термін окупності капітальних вкладень.

В проекті планується закупка основного устаткування для оснащення лінії з отримання мурамідпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій. В результаті розрахунків підприємство може отримати чистий прибуток – 298, 62 тис. грн., інвестиції у проект потребуються у розмірі – 431,7 тис. грн., строк окупності яких складає 1,5 років.

## 1. Аналіз стану фармацевтичного ринку лікарських засобів України

У сучасній світовій економіці виробництво фармацевтичних товарів є однією з перспективних галузей. Протягом декількох останніх років світовий фармацевтичний ринок демонструє стаке зростання. Основними чинниками приросту ринку є збільшення потужності конкуренції серед виробників генеричних препаратів та збільшення обсягів споживання дешевших лікарських засобів. Генеричні препарати – це лікарські засоби які є еквівалентами оригінальних лікарських засобів, термін дії патентів яких вийшов або їх не було взагалі. Вони містять такі ж активні складові, що й оригінальні лікарські засоби. Генеричні лікарські засоби також еквівалентні до оригінальних препаратів щодо якості, ефективності та безпеки. У звіті «IMS Market Prognosis», який компанія «IMS Health» оприлюднила в травні 2012 року, прогнозується середній щорічний приріст світового фармацевтичного ринку на 5-6%. У міру виходу країн з економічної кризи попит на лікарські засоби постійно зростатиме.

Особливою рисою українського фармацевтичного ринку є те, що він переважно залишається ринком генериків (їх питома вага виробництва на українському ринку досягає 90%). За даними Державної служби статистики України, витрати на медичні препарати займають у витратах середнього українця 4-5 місце та становлять 8,1% від його доходів . Очевидно, що варто очікувати подальшого значного зростання споживчих витрат на лікарські засоби (ЛЗ) внаслідок таких причин, як старіння населення та погіршення екологічних умов. При цьому вимоги до пропозиції та якості препаратів будуть теж постійно зростати. Україна займає четверте місце серед країн СНД щодо споживання медикаментів. У порівнянні з Європою український рівень у 48 дол. на душу населення є на порядок нижчим. Так, у Чехії цей показник становить 331 дол., у Словаччині – 254 дол., у Польщі – 154 дол. З огляду на це можна зробити висновок про суттєвий потенціал зростання обсягів українського фармацевтичного ринку. Ще одним важливим чинником зростання ринку в грошовому вимірі є перехід вітчизняних виробників лікарських засобів на виробництво препаратів із середнього у високий ціновий сегмент, тоді як



історично вони спеціалізувалися на виробництві продукції, що належить до низького цінового сегменту, на відміну від іноземних компаній.[2]

Серед дистриб'юторів (за підсумками 2010-2012 років) є трійка лідерів за обсягами постачань лікарських засобів до аптечних установ – «БАДМ», «Оптима-Фарм» і «Альба Україна». Рівень консолідації в сегменті дистрибуції традиційно залишається найвищим у порівнянні з іншими сегментами ринку і має тенденцію до подальшого зростання. За підсумками 2012 року 10 лідируючих українських дистриб'юторів сумарно акумулювали 91,7% обсягів постачань лікарських засобів в аптечні мережі у грошовому вираженні. Ключовими експортними напрямками українських фармацевтичних підприємств є країни пострадянського простору: Росія, Узбекистан, Білорусь, Казахстан, Азербайджан, Молдова, Грузія, Таджикистан. А серед західних – Німеччина і Словаччина. Частка загального обсягу українського експорту готових лікарських засобів серед перелічених країн становить 94%. Рейтинг українських експортерів готових лікарських засобів очолює компанія «Фармак», друге місце посідає компанія «Артеріум», третє – «Біофарма». За період 2009-2012 років сумарна питома вага українського експорту лікарських засобів збільшилася із 65% до 88%.

Аналіз стану фармацевтичного ринку України дає підстави охарактеризувати його як складну, багаторівневу динамічну систему

Досягнення експериментальної та клінічної імунології, молекулярної біології та фармакології обумовили народження та бурхливий розвиток принципово нової галузі науки – імунофармакології, яка опікується створенням та вивченням фармакологічних засобів управління імунологічними процесами, розробкою ефективних методів імунотерапії.

Адекватне насичення фармацевтичного ринку імуностимулюючими препаратами значною мірою зумовлює своєчасність та успішність лікування багатьох захворювань спричинених порушенням функціонування імунної системи людини.

За даними Державного експортного центру МОЗ України, станом на 01.04.2014 року номенклатура імуностимулюючих лікарських засобів кодом L03 – «Імустимулятори» згідно з міжнародною класифікацією АТХ, складає 112 найменувань, 176 торговельних назв (ТН) ЛЗ зареєстрованих на вітчизняному фармацевтичному ринку. В загалом в Україні свою діяльність проводять 78 підприємств-виробників із 20 країн світу та 83 фірми-заявники імуностимулюючих ЛЗ із 21 держави. (рис. 1.1., 1.2).

28 компаній здійснюють випуск 70 ТН ЛЗ вітчизняного виробництва, що складає 39,8 % усіх найменувань імуностимуляторів. Найбільшими виробниками цих ЛЗ є ПраТ «Біофарма» - 11 ТН ЛЗ, ПАТ «Фармстандарт-Біолік» - виробляє 9 ТН ЛЗ.

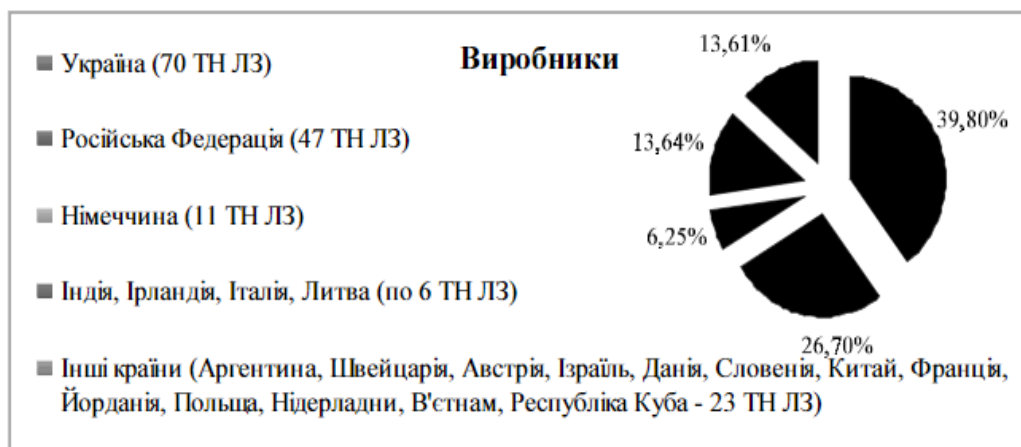


Рис. 1.1 – Розподіл країн-виробників імуностимулюючих засобів

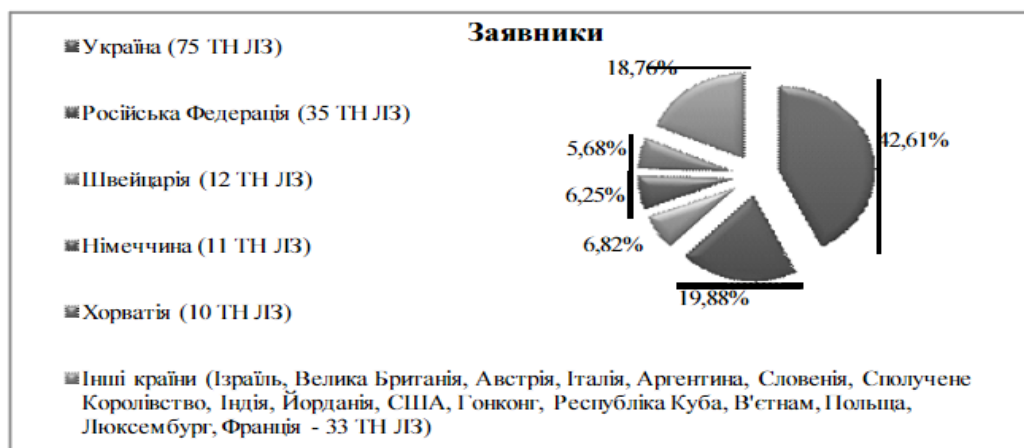


Рис. 1.2 – Розподіл країн-заявників імуностимулюючих лікарських засобів

Фактори, що синтезуються біфідобактеріями (мурамілпептиди, органічні кетокислоти і ін.) є потужними природними імуномодуляторами. При гідролізі

бактеріальної маси утворюється велика кількість біологічно активних речовин. Імуномодулятори мікробного походження застосовуються як у вигляді самих лізатів мікроорганізмів, це такі препарати як: "Бронхомунал", "Иммудон", "ИРС-19", "Постеризан", "Лиастен" так і у вигляді мінімальних біологічно активних фрагментів (глікопептиди мурамилдипептидного ряду), отриманих синтетичним шляхом, наприклад "Ликопид", "Ромуртид", "Мурабутид".[3]

Асортимент імуностимулюючих препаратів на ринку:

1. "Куро-Dophilus 9" (США), 180 капсул - 1 799 грн. Випускається у вигляді капсул. Суміш Куро-Dophilus 9 включає в себе три штами лактобактерій і шість штамів біфідобактерій. Ця суміш дев'яти пробіотиків містить спеціально вирошені штами корисних бактерій.

2. Ther-Biotic Complete Powder, бренд Klaire Labs (США), 60 г - 3 710 грн. Випускається у вигляді порошку. Містить власну суміш колонізації і перехідних пробіотичних бактерій, які забезпечують широкий захист, що дозволяє підтримувати здорове середовище в усьому шлунково-кишковому тракті.

3. "ИРС-19" (Франція), 20 мл №1 - 500.00 грн. Випускається у вигляді аерозоля для інтраназального застосування і містить лізати 19 збудників захворювань верхніх дихальних шляхів, що найчастіше зустрічаються : Streptococcus, Staphylococcus, Neisseria, Klebsiella, Moraxella та ін. "ИРС-19" стимулює специфічні і неспецифічні захисні механізми в дихальних шляхах.

4. "Иммудон" (Франція), 40 пігулок – 500,00 грн, як і "ИРС-19" представляє собою полікомпонентний препарат, до складу якого входять лізати 13 видів бактерій, серед яких рід Lactobacillus представлений 4 видами. "Иммудон" випускається у вигляді пігулок для розсмоктування для місцевого застосування в стоматології. Він активує фагоцитоз, сприяє ефективному утворенню антитіл, оптимізує функціонування імунної системи, стимулює антигенні властивості лізоциму слини, впливає на збільшення кількості імунокомпетентних клітин.[4]

Розробка і впровадження у виробництво синтетичних похідних МДП вимагає великих матеріальних і тимчасових витрат і їх використання як імуноотропних компонентів дієтичних добавок не виправдане. Перспективнішою є розробка імуноотропних компонентів для перорального застосування на основі гідролізату бактерій.

У 2006 році в Україні був зареєстрований препарат "Лиастен" виробництва компанії "Ензим". Діюча речовина препарату - з'єднання глюкозамінілмурамілпентапептид відноситься до групи пептидогліканів і є виділеним та очищеним шляхом ряду складних біотехнологічних процесів.[5]

Стан імунологічної резистентності виступає одним з головних чинників при багатьох хворобах інфекційного та неінфекційного генезу. З огляду на це одним з важливих принципів сучасної терапії вважається її комплексність із застосуванням в разі необхідності диференційованої імунокорекції. В області застосування нових імуномодуляторів відмічається повільний, але неухильний прогрес та відбувається помітне зрушення – перехід від використання препаратів, отриманих хімічним шляхом, в напрямку сполук природного походження або їх аналогів: рекомбінантних цитокінів, моноклональних антитіл та генної терапії. Тому проблема розширення арсеналу таких лікарських засобів та подальше з'ясування відомостей про імуноотропні властивості вже відомих речовин вважається вельми актуальною.[6]

## 2. Техніко-економічне обґрунтування отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій

У дипломному проекті наведені розрахунки для створення виробництва і реалізації комплексу мурамілпептидів із клітинних стінок МКБ, як сировини/напівпродукту для фармацевтичного виробництва лікарських препаратів та харчового виробництва. Опрацьована ситуація на ринку, закордонне та вітчизняне виробництво імуноотропних препаратів.

Мурамілпептиди – отримані ферментолізом пептидоглікану клітинних стінок МКБ. Такий імуномодулюючий препарат використовують для

підвищення імунітету людського організму та захисту від патогенних мікроорганізмів, протистояння пухлинних утворень.[7]

Виробництво мурамілпептидів здійснюється на біотехнологічному виробництві та вважається напівпродуктом для лікарських засобів та біологічно активних харчових продуктів.

Пропонується впровадження виробництва сухого концентрату мурамілпептидів на виробництві біологічно активних продуктів на основі пробіотичних грампозитивних молочнокислих бактерій, та реалізація імуномодулюючих мурамілпептидів як сировину для фармацевтичних виробництв та харчових підприємств. Із аналізу стану фармацевтичного ринку лікарських засобів України лінія виробництва мурамілпептидів планується в Одеській області.

Імуномодулятори мурамілпептидного ряду мікробного походження мають широкий спектр дії на організм людини: підвищують імунний стан, протипухлинний імунітет, стимулюють антимікробну активність. Лінія отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій планується на території біотехнологічного заводу, як прив'язка технологічного цеху у комплексне виробництво біотехнологічних препаратів.

### 3. Розрахунок економічної ефективності проекту

#### 3.1. Розрахунок інвестицій у проект

У загальному вигляді суму інвестицій (I) визначають за формулою:

$$I = I_{\text{БУД}} + V_{\text{УСТ}} + T + M + H + V_{\text{ЗАЛ}} + Д - Л + \Delta O A, (1.1)$$

де  $I_{\text{БУД}}$  – витрати на будівельні роботи,

$V_{\text{УСТ}}$  – вартість придбання устаткування;

$T$  – транспортні витрати по устаткуванню (5 % від вартості придбання устаткування);

$M$  – вартість монтажу устаткування (10 % від вартості придбання устаткування);

Н – невраховані витрати (2 % від вартості придбання устаткування, тис. грн.);

$V_{\text{ЗЛ}}$  – залишкова вартість демонтованого устаткування, тис. грн. Залишкова вартість демонтується обладнання: якщо обладнання має 100% знос, то вона дорівнює 0, якщо немає, то враховується в капітальні вкладення, як недоамортизована вартість в розмірі відсотка зносу, який залишився;

Д – вартість демонтажу, тис. грн. (5 % від первісної вартості демонтованого устаткування);

Л – ліквідаційна вартість демонтованого устаткування. Якщо обладнання, що демонтується продається або здається на брухт, то ліквідаційна вартість розраховується, з урахуванням сплати податку на прибуток від продажу.

ΔОА – приріст власних обігових активів, тис. грн.

Для отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій потрібно таке основне устаткування технологічної лінії:

- Реактор для автолізу “Wise master”, потрібно 1 одиниця, вартість 1 одиниці 25 тис. грн.;

- Центрифуга Rousselet “Robatel RC50”, потрібно 1 одиниця, вартість 1 одиниці 57 тис. грн.;

- Центрифуга “Rousse let Robatel RA 20 Vx” потрібно 2 одиниці, вартість 1 одиниці 36 тис. грн.;

- Сушарка “CC-1.2 GZLS” потрібно 1 одиниця, вартість 1 одиниці 257 тис. грн.;

Вартість обладнання складає:

$$V_{\text{уст}} = 25 + 57 + 72 + 257 = 411 \text{ тис. грн.}$$

За умовами виробників обладнання транспортні витрати по устаткуванню (Т) та вартість монтажу устаткування враховано до вартості придбання устаткування.

Інвестиції, які необхідні на придбання нової технологічної лінії з отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій:  $V_{\text{УСТ}} = 375$  тис. грн.

$$\Delta OA = C_{3AG} * k, (1.2)$$

де СЗАГ – загальна собівартість готової продукції;

k – частка обігових активів (%).

Частка матеріальних витрат у собівартості продукції становить 60-80%.  
Однак для пускової партії планованого обсягу продукції досить 15 – 25% на  
покупку необхідних обігових активів, приймаємо 15 %:

$$\Delta OA = 138,3 * 0,15 = 20,7 \text{ тис, грн}$$

Розрахуємо капітальні вкладення у проект виробництва сухого  
концентрату мурамілпептидів:

$$I = 411 + 20,7 = 431,7 \text{ тис. грн.}$$

### 3.2 Розрахунок виробничої програми

Коефіцієнт використання виробничої потужності розраховують за  
формулою:

$$K_{вп} = \frac{O_{вріч}}{ВП}, (1.3)$$

де  $O_{вріч}$  – річний обсяг виробництва продукції, г

ВП – річна виробнича потужність, г

$$O_{вріч} = O_{вдоб} * \Phi_{факт}, (1.4)$$

де  $O_{вдоб}$  – обсяг виробництва за добу, г

$\Phi_{факт}$  – фактична кількість робочих діб

$$ВП = ВП_{доб} * \Phi_{еф}, (1.5)$$

де  $ВП_{доб}$  – виробнича потужність за добу, г

$\Phi_{еф}$  – кількість можливих робочих діб за рік.

$$\Phi_{еф} = K_d - D_{пр} - D_v - K_R, (1.6)$$

де  $K_d$  – кількість діб в році;

$D_{пр}$  – кількість святкових днів за рік;

$D_v$  – кількість вихідних днів за рік;

$K_R$  – кількість днів на капітальний ремонт за проектом.

Розраховуємо кількість можливих робочих діб за рік:

$$\Phi_{еф} = 366 - 11 - 103 - 30 = 222 \text{ д.}$$

Розраховуємо річну виробничу потужність:

$$ВП = 500 * 222 = 111\ 000 \text{ г.}$$

Розраховуємо річний обсяг виробництва продукції:

$$ОВріч = 300 * 67 = 20\ 100 \text{ г.}$$

З отриманих даних розраховуємо коефіцієнт використання виробничої потужності:

$$Квп = 20\ 100 / 111\ 000 = 0,18$$

### 3.3 Розрахунок чисельності працівників

Технологічна лінія з виробництва мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій працює три місяці на рік, не потребує великої кількості робітників. Щодо розстановки чисельності, плануємо чисельність основних робітників (Чроб) - 2. Робітники третього розряду переходять з іншої лінії виробництва, так як вони є вільними в період виробництва сухого концентрату мурамілпептидів із клітинних стінок МКБ.

### 3.4 Розрахунок собівартості виробництва мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій

Складемо калькуляцію на 300 г виробленої продукції.

Витрати за статтею «Сировина і основні матеріали» наведено у таблиці 3.4.1

Назва	Норма затрат, кг	Ціна за один літр, грн	Загальна вартість, грн
«Біомаса молочнокислих бактерій»,	15	50	750

Витрати за статтею «Допоміжні матеріали» наведено у таблиці 3.4.2.



Таблиця 3.4.2 - Вартість «Допоміжні матеріали»

Найменування	Кількість на 300 г	Ціна за од., грн.	Загальна вартість, Грн
Пакети полімерні, 100 г	3	1,70	5,1
Етикетки, 6х9 см	3	1	3
Всього	–	–	8,1

Витрати за статтею «Паливо і енергія на технологічні потреби» наведено у таблиці 3.4.3:

Таблиця 3.4.3 - Вартість «Паливо і енергія на технологічні потреби»

Найменування	Одиниця вимірювання	Кількість на випуск	Ціна, грн	Загальна вартість, грн
Електроенергія	кВт/год	102	1,84	187,62
Вода	м <sup>3</sup>	0,2	26,52	5,3
Всього	-	-	-	192,98

Розрахуємо заробітну плату основним виробничим робітникам. Для виробництва 300 г сухого концентрату мурамілпептидів потрібна оплата 8 годинного робочого дня робітника, плануємо оплату 33,41 грн за одну годину, тобто:

$\text{Возп} = 33,41 * 8 = 267,28$  грн (заробітна плата робітника від 8018,4 до 8285,68 грн/місяць).

Витрати за статтею «Додаткова заробітна плата» складають 20% від основної:

$\text{Вдзп} = 267,28 * 0,2 = 53,5$  грн.

Витрати за статтею «Відрахування на соціальні заходи» складають 22% від суми основної і додаткової заробітної плати:

$\text{Всз} = (267,28 + 53,5) * 0,22 = 70,6$  грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Витрати на утримання і експлуатацію обладнання».

До витрат входять витрати утримання, амортизація, поточний ремонт обладнання та інструменту, утримання і ремонту обладнання, відшкодування зносу, інші затрати, котрі пов'язанні з утриманням та експлуатацією обладнання. За даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати:  $267,28 * 1 = 267,28$  грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Загальновиробничі витрати», за даними заводу їх норматив складає 100 % від основної заробітної плати:  $267,28 * 1 = 267,28$  грн.

Виробнича собівартість складає суму перелічених витрат, яка дорівнює:  $750 + 8,1 + 192,98 + 267,28 + 53,5 + 70,6 + 267,28 + 267,28 = 1877,1$  грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Адміністративні витрати», які плануємо 5 % від виробничої собівартості:  $1877,1 * 0,05 = 93,8$  грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Витрати на збут», які плануємо 3 % від виробничої собівартості:  $1877,1 * 0,03 = 56,3$  грн.

Розрахуємо витрати за статтею «Інші операційні затрати», які плануємо 2 % від виробничої собівартості:  $1877,1 * 0,02 = 37,5$  грн.

Повна собівартість на 300 г готового продукту.

Таблиця 3.4.4 - Повна собівартість 300 г сухого концентрату мурамілпептидів

Статті витрат	“Сухий концентрат мурамілпептидів”
1. Сировина і основні матеріали	750
2. Допоміжні матеріали	8,1
3. Паливо і енергія на технологічні цілі	192,98
4. Основна заробітна платня виробничим працівникам	267,28
5. Додаткова заробітна платня виробничим працівникам	53,5
6. Відчислення на соціальні потреби	70,6
7. Затрати на утримання і експлуатацію обладнання	267,2
8. Загальновиробничі затрати	267,2
Виробнича собівартість	1877,1
9. Адміністративні затрати	93,8
10. Витрати на збут	56,3
11. Інші операційні витрати	37,5
Повна собівартість	2064,7

Розрахунок калькуляції собівартості 300 г “Висушеного концентрату мурамілпептидів” показав, що повна собівартість складає 2064,7 грн., собівартість на 100 г “Висушеного концентрату мурамілпептидів” складає 688,2 грн. Тобто собівартість 1 кг дорівнює 6888,2 тис. грн.

За даними маркетингових досліджень було виявлено, що середня ціна складає в середньому на рівні 2,2 – 6,18 тис. грн. (за 100 грам).

Плануємо ціну “Висушеного концентрату мурамілпептидів за 1 кг = 25 тис. грн.

Розрахуємо ціну “ Висушеного концентрату мурамілпептидів” на весь обсяг.

Таблиця 3.4.5 - Розрахунок собівартості реалізованої продукції

Найменування Продукції	Річний обсяг виробництва, кг	Собівартість 1 кг, грн	Собівартість виробленої продукції, тис. грн
1	2	3	4
“Висушеного концентрату мурамілпептидів ”	20,1	6882	138,33

Розрахуємо обсяг виробленої продукції, яку планується виробляти (таблиця 3.4.6.):

Таблиця 3.4.6 - Розрахунок обсягу виробленої продукції

Найменування продукції	Обсяг продукції, г кг	Дійсна оптова ціна, тис. грн. за 1 кг	Обсяг виробленої продукції, тис. грн
1	2	3	4
“Висушеного концентрату мурамілпептидів ”	20,1	25	502,5

### 3.5 Розрахунок прибутку та чистого прибутку

Розрахуємо прибуток від виробництва та реалізації продукції “Висушеного концентрату мурамілпептидів ”.

Оподаткований прибуток від збільшення обсягу виробництва продукції визначимо за формулою:

$$П = ВП - С, \quad (1.7)$$

де П - прибуток за рік, тис. грн.,

ВП - обсяг виробленої продукції, тис. грн.,

С - собівартість виробленої продукції, тис. грн.

$$П = 502,5 - 138,33 = 364,17 \text{ тис. грн}$$

Розрахуємо чистий прибуток за формулою:

$$ЧП = П - Пп, \quad (1.8)$$

де П – оподаткований прибуток за рік, тис. грн.

Пп - податок на прибуток (з 01.01.2019 року - 18%).

$$\text{ЧП} = 364,17 - (364,17 * 0,18) = 298,62 \text{ тис грн.}$$

### 3.6 Розрахунок терміну окупності інвестицій

Розрахуємо термін окупності капітальних вкладень.

Термін окупності капітальних вкладень визначаємо за формулою:

$$T = I / \text{ЧП}, \quad (1.9)$$

де  $I$  – інвестиції у проект, тис. грн.;

ЧП - чистий прибуток, тис. грн.

$$T = 431,7 / 298,62 = 1,5 \text{ року.}$$

З економічних розрахунків отримуємо термін окупності виробництва “Сухого концентрату мурамілпептидів” – 1,5 років.

Таблиця 3.6.1 - Техніко-економічні показники проекту виробництва “Сухого концентрату мурамілпептидів ”

Найменування показників	Значення показників
1. Виробнича потужність, кг	111
2.Обсяг виробленої продукції, кг	20,1
3.Обсяг виробленої продукції, тис. грн.	502,5
4. Собівартість виробленої продукції, тис. грн.	138,33
5. Прибуток, тис. грн.	364,17
6. Чистий прибуток, тис. грн.	298,62
7. Чисельність працюючих, люд.	2
8. Середньорічний виробіток одного працівника, тис. грн.	251,25
9. Інвестиції, тис. грн.	431,7
10. Строк окупності інвестицій, років	1,5

### ВИСНОВКИ

В результаті установки технологічної лінії для виробництва “Сухого

концентрату мурамілпептидів” обсяг виробленої продукції цеху виробництва “Сухого концентрату мурамілпептидів” складе 20,1 кг, що в грошовому вираженні складає 502,5 тис. грн.

Собівартість виробленої продукції складає 138,33 тис. грн. Прибуток після установки цеху складає 364,17 тис. грн., з якого чистий прибуток складає 298,62 тис. грн. інвестиції у проект необхідні у сумі 431,7 тис. грн., строк окупності яких складе 1,5 року, що є у межах нормативного терміну.

Всі розраховані показники дозволяють стверджувати, що виробництво лінії “Сухого концентрату мурамілпептидів” на комплексному біотехнологічному заводі є економічно вигідним.

## 2. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 2.1 Літературний огляд за темою проекту

Першим з дослідників, який припустив, що деякі бактерії не зовсім згубні для людини, а навпаки, можуть надавати позитивний вплив на здоро-в'я, був відомий російський вчений Ілля Ілліч Мечников. Ще на самому по-чатку ХХ в. він провів дослідження по можливості відновлення кишкової мікрофлори за допомогою молочнокислої палички. В даний час відомі різноманітні позитивні ефекти молочнокислих пробіотичних бактерій, підтверджені численними клінічними дослідженнями [8].

Незважаючи на те, що ще на початку минулого століття І. І. Мечников припустив, що молочнокислі бактерії (МКБ) здатні підвищувати стійкість організму людини до різних захворювань, лише в останні десятиліття була доведена теорія про імуномодулюючий вплив цих мікроорганізмів. Було встановлено, що деякі штами молочнокислих бактерій здатні надавати імуностимулюючу дію, сприяючи виробленню в кишечнику цитокінів, антитіл, стимулювати синтез інтерферону гамма лімфоцитами, а також підвищувати активність фагоцитів і природних клітин-кілерів (НК-клітин). Таким чином, була доведена здатність пробіотиків посилювати стійкість організму людини до певних захворювань. Так молочнокислі пробіотичні бактерії ефективні для профілактики широко поширених зимових інфекцій, обумовлених різними респіраторними вірусами [9].

Людському організму постійно доводиться адаптуватися у відповідь на зміни, пов'язані з впливом чинників навколишнього середовища і способу життя. Прийом молочнокислих пробіотичних бактерій ефективний і при діареї. Так, в восьми рандомізованих плацебо-контрольованих дослідженнях із загальним числом учасників 988 осіб була вивчена ефективність продуктів харчування, що містять *L. rhamnosus* GG, при гострих кишкових інфекціях (ГКІ) [3]. Ще одним напрямком, при якому доведена ефективність МКБ, є антибіотик-асоційована діарея (ААД), яка виникає при порушенні складу та активності нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини [10].

Молочнокислі пробіотичні бактерії позитивно впливають на рівень холестерину в сироватці крові - в деяких дослідженнях показано, що при їх вживанні відбувається зниження загального холестерину і ліпопротеїнів низької щільності, поліпшення функції печінки [11].

Останнім часом усе більшу увагу науковців привертає питання лізису мікробних клітин із метою отримання біологічно активних складових їхніх клітинних стінок [12]. У цьому аспекті молочнокислі бактерії є вельми перспективним субстратом, оскільки накопичено значний досвід їх культивування; окрім того, вони мають статус цілком безпечних інгредієнтів [13].

З мікроорганізмів виділено велику кількість полісахаридів з різними будовами – від найпростіших гомополісахаридів до складних біополімерів, що містять крім вуглеводів залишки амінокислот і ліпідів. Представником полісахаридів клітинної стінки бактерій є мурамін (від лат. – стінка). Цитоплазматичні мембрани МКБ мають складні антигенні структури, які містять два типи тейхових кислот – рибіттейхової кислоти (основний ланцюг кислоти складається з залишків гліцеролфосфату, полісахаридів та муреїнів (пептидогліканів, глікопептидів), що діють на клітинні та гуморальні механізми імунної системи організму людини. Ці антигенні структури МКБ захищають організм людини від патогенних мікроорганізмів, а також знижують ризик виникнення злоякісних пухлин товстого кишечника та затримують ріст і поширеність пухлинного процесу.

Імуномодуючу дію мають препарати із живих мікроорганізмів, висушених, заморожених або вбитих шляхом нагрівання, а також і дезінтегрована біомаса МКБ. Мурамілпептид(МДП) активує лімфопрولیферентивну відповідь на Т- та В-клітинні мутагени стимулює генерацію цитотоксичних Т-лімфоцитів та продукцію імуноглобулінів [14].

Ферментативні методи гідролізу пептидогліканів клітинних стінок бактерій є більш м'якими порівняно з хімічними. Як правило, ферментоліз проводять за фізіологічних значень температури та рН середовища. Ферменти



– специфічні каталізатори, які, на відміну від кислот і лугів, діють тільки на певні групи сполук та зв'язків. Для руйнування пептидогліканів бактеріальних клітинних стінок використовують протеолітичні ферменти, здатні розщеплювати пептидні зв'язки їхніх макромолекул [15].

Фармацевтичне виробництво має більш суворі вимоги до виготовлення лікарських засобів ніж біотехнологічне виробництво харчової промисловості. Лікарським препаратам приділяється особлива увага при їх виробництві: мікробіологічна чистота, визначення здатності таблеток і капсул розпадатися в межах певного часу, виявлення побічних ефектів – алергічна, канцерогенна, мутагенна дії на організм людини.

Препарати імуномодулюючої дії, як і всі лікарські засоби, містять у своєму складі діючі та допоміжні речовини. При розробці складу лікарського засобу головним є вибір дозування діючої речовини, яка повинна забезпечувати заданий виробником терапевтичний ефект.

При малому дозуванні діючої речовини до складу лікарського препарату (капсули) додають допоміжні речовини, які є біологічно нешкідливими і біосумісними. Їх додають для гранульованості та спресованості таблетованих форм чи капсул (розріджувачі, зв'язуючі речовини); для впливу на фармацевтичні властивості препарату, його фізичної і хімічної стабільності, а також покращення споживчої властивості (розпилювачі, барвники, ароматизатори та ін.). [16]

У дипломній роботі розглядається технологія отримання комплексу біополімерів – мурамілпептидів із клітинних стінок пробіотичних молочнокислих бактерій. Пропонується виготовлення і реалізація активної речовини, яка може застосовуватись для виготовлення лікарських засобів. Мурамілпептиди мають характеристику імуномодулюючих речовин, про що свідчать численні наукові дослідження в медичній галузі.[17] Тому ці біологічно активні речовини можуть застосовуватись як для виготовлення препаратів фармацевтичного виробництва, так і у харчовій промисловості, при

розробці інноваційних продуктів харчування з підвищеною біологічною цінністю, які спроможні впливати на фізіологічні процеси в організмі людини.

У зв'язку з цим, розробка технології отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій на сьогодні є актуальною.

### 2.1.1 Характеристика посівного матеріалу

Лактобацили (рід *Lactobacillus*) є представником великого сімейства молочнокислих бактерій (лактобактерій). Вони являють собою грампозитивні анаеробні паличкоподібні мікроби, активно ферментують цукри з утворенням, переважно, молочної кислоти. Найважливішою властивістю лактобацил є їх безпека для здоров'я людини, переконливо доведена не тільки медичними дослідженнями, але й багатовіковим використанням лактобацил в приготуванні різних харчових продуктів (зквашеного молока, сиру, квашених овочів, хліба, вина та ін.).

Лактобацили широко поширені в складі нормальних мікробних спільнот, що населяють тіло людини. Вони виявляються в усіх органах травного тракту, починаючи з ротової порожнини й завершуючи прямою кишкою, є домінуючою флорою жіночої сечостатевої системи, присутні в грудному молоці здорових матерів-годувальниць. Наприклад, в товстій кишці концентрація лактобацил досягає 10 мільярдів клітин в одному грамі вмісту.

Лактобацили здатні стимулювати імунітет; виробляти ферменти, що покращують травлення; прискорювати регенерацію слизових оболонок; синтезувати вітаміни та інші сполуки, що сприяють нормалізації обмінних процесів; продукувати метаболіти, що попереджають зростання багатьох патогенних бактерій, вірусів і грибів.

Сьогодні лактобацили є найбільш поширеним компонентом не тільки різноманітних кисломолочних продуктів, але й пробіотиків, що обумовлено їх постійною присутністю в складі симбіотичної мікрофлори людини та виявленим у них величезним спектром корисних властивостей.

Молочнокислі бактерії, що містяться в кефірі, йогурті, ряжанці та ін., виконують функцію закваски, і їх роль зводиться до перетворення молока на кисломолочний продукт з хорошими споживчими характеристиками (смаком, запахом, консистенцією). «Людські» штами лактобацил істотно відрізняються від заквасочних культур. Оскільки їх традиційним місцем існування є кишечник та інші порожнисті органи тіла людини, вони погано розвиваються в молоці та не можуть його швидко сквашувати.[18]

**Морфологія лактобацил.** Серед роду *Lactobacillus* зустрічаються бактерії з різною морфологією. Більшість представників роду мають форму прямих паличок із закругленими кінцями, зібраних в ланцюжки різної довжини, розташовані поодинокі або попарно. Серед лактобацил зустрічаються короткі кокковидні й звиті форми, а також довгі, ниткоподібні палички завдовжки від 0.7-1.1 до 3.0-8.0 мкм, розташовані поодинокі або зібрані в ланцюжки. Довжина паличок і величина вигину зазвичай залежать від умов зростання: складу поживного середовища, температурного режиму, аерації, а також віку культури. У деяких видів культура завжди представлена сумішшю коротких і довгих паличок. Лактобацили не утворюють ендоспор. По Граму забарвлюються позитивно, стають грамнегативними з віком і при підвищенні кислотності. При забарвленні по Граму або метиленовим синім у деяких штамів виявляються біполярні тільця, зернистість або лінійна покреслена цитоплазми.

Більшість лактобацил нерухомі. Рухливість значною мірою залежить від поживного середовища і віку культури; часто вона виявляється тільки при виділенні лактобацил і втрачається після декількох пересівів.

**Культуральні властивості лактобацил.** На щільних поживних середовищах лактобацили формують колонії сферичні, часто сочевицеподібні, гладкі, непрозорі, іноді блискучі, опуклі, з рівними чіткими контурами. Зазвичай колонії дрібні, але у деяких видів їх розмір може перевищувати 4 мм в діаметрі. Колонії як правило не пігментовані, білі або злегка кремового кольору, іноді - жовтуваті або червонясті. Деякі види утворюють шороховаті колонії. На середовищах з білками або ліпідами зони просвітлення навколо

колоній зазвичай не утворюються. Проте, більшість лактобацил мають слабку протеолітичну активність (за рахунок протеаз, що секретуються пов'язаних з клітинною стінкою, і пептидазою) та слабку ліполітичну активність (завдяки внутрішньоклітинним ліпазам).

При глибинному посіві на тверде поживне середовище утворюються щільні колонії у вигляді правильних лінз, трикутної і неправильної форми або ніжні, сніжинку, що нагадують, або грудочку вати. Якщо в середу була додана крейда, то навколо колоній внаслідок накопичення молочної кислоти утворюється зона розчинення крейди

При зростанні на рідких поживних середовищах лактобацили найчастіше викликають рівномірне помутніння, незабаром після припинення зростання осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчастого осаду, ніколи не утворюючи плівок на поверхні середовища.

**Фізіолого-біохімічні властивості лактобацил.** Лактобацили надзвичайно різноманітні за своїми біохімічними і фізіологічними властивостями. Проте вони усі мають метаболізм бродильного типу, при цьому щонайменше половина вуглецю кінцевих продуктів бродіння доводиться на лактат. Залежно від того, які продукти утворюються в результаті бродіння, молочнокислі бактерії прийнято підрозділяти на 2 групи: гомоферментативні і гетероферментативні.

Гомоферментативні види утворюють в результаті бродіння переважно молочну кислоту (85% і більше) і у край невеликі кількості fumarової і бурштинової, летких кислот, етилового спирту і вуглекислого газу.

Вони використовують шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз) для утворення 2 молей лактату з кожного моля глюкози.

При цьому синтезується 2 молекули АТФ.

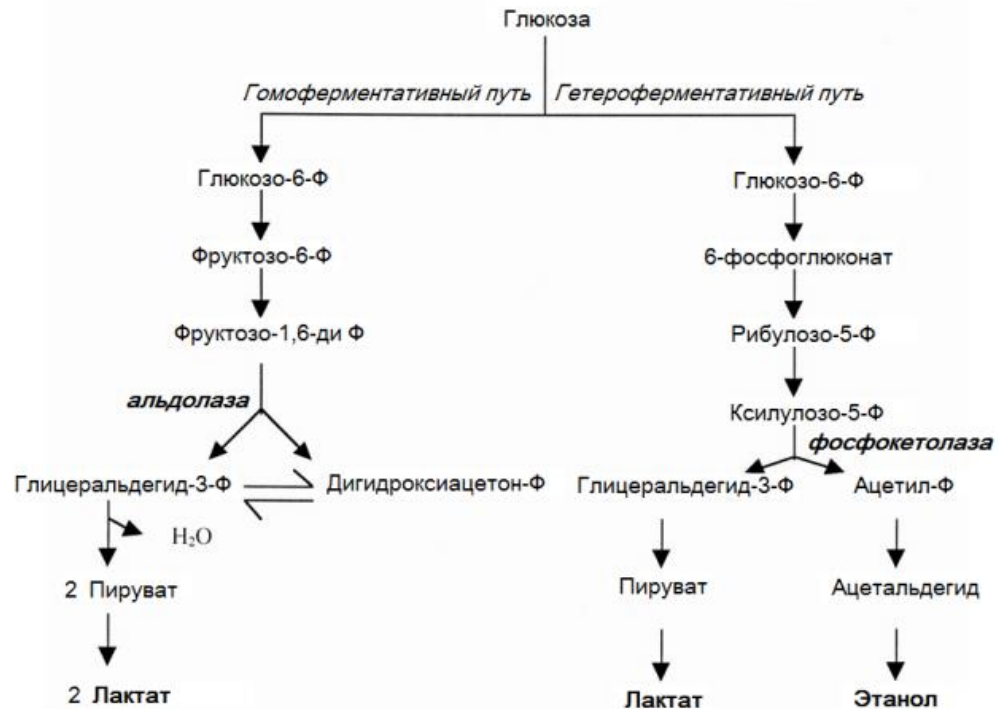


Рис. 2.1.1 – Схема збродження глюкози лактобацилами

Гетероферментативні види утворюють з 1 моля глюкози окрім 1 моля молочної кислоти, 1 моль етилового спирту (чи оцтової кислоти) і 1 моль вуглекислого газу, використовуючи окислювальний пентозофосфатний шлях розщеплювання глюкози. Енергетичний вихід складає 1 молекулу АТФ на 1 моль витраченої глюкози, проте деякі гетероферментативні види переводять ацетилфосфат частково або повністю в оцтову кислоту, що супроводжується утворенням ще однієї молекули АТФ.

Майже усі лактобацили - мезофіли. Температурний оптимум розвитку лежить в межах 30-40°C. Верхньою температурною межею (максимумом) для них є 40°C, проте зустрічаються термофільні види, які добре ростуть і мають активний метаболізм при температурі біля 45°C. Психрофільні види також зустрічаються. Температурний діапазон зростання 2- 53°C.

Лактобактерії - факультативні анаероби, іноді - мікроаерофіли. Хоча більшість штамів аэротолерантні, оптимальними для зростання являються анаеробні і мікроаэрофільні умови. Лактобацили зазвичай слабо ростуть на повітрі, краще - при пониженому вмісті кисню. Підвищена концентрація

вуглекислого газу ( $\approx 5\%$ ) може стимулювати зростання; у строго аеробних умовах, як правило, зростання сповільнюється. Деякі види є строгими анаеробами.

Фізіологічною особливістю лактобактерій є їх кислотостійкість. Для зростання лактобацил найбільш сприятливі середовища, що злегка підкисляють, з початковим рН 5.4-6.4, причому зростання культури сповільнюється досягнувши рН 3.6-4.0 залежно від виду і штаму.

Ще одна відмітна особливість цієї групи мікроорганізмів - це їх спиртостійкість. Вони здатні розвиватися в поживних субстратах при високих концентраціях етилового спирту (18-24% о.).[19]

**Хімічний склад грампозитивної бактеріальної клітини.** Бактерійна клітина на 80-90% складається з води і тільки 10% припадає на частку сухої речовини. Вода в клітині знаходиться у вільному або зв'язаному стані. Вона виконує механічну роль в забезпеченні тургора, бере участь в гідролітичних реакціях. Видалення води з клітини шляхом висушування призводить до призупинення процесів метаболізму, припинення розмноження, а для багатьох мікроорганізмів згубно. В той же час особливий спосіб висушування мікроорганізмів у вакуумі із замороженого стану (ліофілізація) забезпечує збереження життєздатності більшості мікроорганізмів. Ліофілізація використовується для приготування проб, придатних для тривалого зберігання. У сухій речовині бактерій 52% складають білки, 17% - вуглеводи, 9% - ліпіди, 16% - РНК, 3% - ДНК і 3% - мінеральні речовини.

Білки є ферментами, а також складовою частиною клітини, входять до складу цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) і її похідних, клітинної стінки, джгутиків, спор і деяких капсул. Деякі бактерійні білки є антигенами і токсинами бактерій. До складу білків бактерій входять відсутні у людини D-амінокислоти, а також діамінопімелінова кислота. Вуглеводи представлені у бактерійній клітині у виді моно-, ди-, олігосахаридів і полісахаридів, а також входять до складу комплексних з'єднань з білками, ліпідами і іншими з'єднаннями. Ліпіди або жири входять до складу ЦПМ і її похідних, клітинної

стілки грамнегативних бактерій, а також служать запасними речовинами, входять до складу ендотоксину грамнегативних бактерій, у складі ЛПС формують антигени.

У бактеріальних жирах переважають довголанцюгові (C14-C18) насичені жирні кислоти і ненасичені жирні кислоти, що містять один подвійний зв'язок. Складні ліпіди представлені фосфатидилінозитом, фосфатидилгліцерином і фосфатидилетаноламіном.

В бактеріальній клітці присутні всі типи РНК: іРНК, транспортна РНК (тРНК), рРНК, менш відома антисенс РНК (асРНК). Молекули асРНК поки не виявлені в клітинах еукаріот. Інформація про асРНК записана в хромосомі, в так званих антисенс-генах. АсРНК бере активну участь у регуляції різних клітинних процесів, у тому числі реплікації ДНК бактерій. асРНК являє собою коротку молекулу, комплементарну певної ділянки іРНК, і, з'єднуючись з нею, блокує процес синтезу білка. При цьому в клітці подібні комплекси можуть накопичуватися, і при дисоціації асРНК і іРНК одночасно починається синтез білка на великому числі однотіпних матриць. Штучні молекули асРНК намагаються використати для боротьби з бактеріями за рахунок пригнічення ними синтезу в клітині певних життєво важливих білків.

Пуринові і піримідинові нуклеотиди – це ті будівельні блоки, з яких синтезуються нуклеїнові кислоти. Крім того, пуринові і піримідинові нуклеотиди входять до складу багатьох коферментів і служать для активації і перенесення амінокислот, моносахаров, органічних кислот.

ДНК виконує в бактеріальній клітці спадкову функцію. Молекула ДНК побудована з двох полінуклеотидних ланцюжків. Кожен нуклеотид складається з азотистої основи, цукру дезоксирибози і фосфатної групи. Азотисті основи представлені пуринами (аденін, гуанін) і піримідину (тимін, цитозин). Кожен нуклеотид має полярність. У нього є дезоксирибозний 3'-кінець і фосфатний 5'-кінець. Нуклеотиди з'єднуються в полінуклеотидний ланцюжок допомогою фосфодієфірних зв'язків між 5'-кінцем одного нуклеотиду і 3'-кінцем іншого. З'єднання ланцюгів забезпечується водневими зв'язками між

комплементарними азотистими підставами: аденіну з тиміном, гуаніну з цитозином. Нуклеотидні ланцюги антипаралельні: на кожному з кінців лінійної молекули ДНК розташовані 5'-кінець одного ланцюга 3'-кінець іншого ланцюга. Процентний вміст ГЦ-пар в ДНК визначає ступінь спорідненості між бактеріями і використовується при визначенні таксономічного положення бактерій.

Мінеральні речовини виявляються в попелі, отриманої після спалювання клітин. У великій кількості представлені N, S, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, а також мікроелементи Zn, Cu, Co, Ba.

Азот входить до складу білків, нуклеотидів, коферментів. Сірка входить у вигляді сульфгідрильних груп в структуру білків. Фосфор у вигляді фосфатів представлений в нуклеїнових кислотах, АТФ, коферментах. В якості активаторів ферментів використовуються іони Mg, Fe, Mn. Іони K і Mg необхідні для активації рибосом. Ca є складовою частиною клітинної стінки грампозитивних бактерій. У багатьох бактерій є сідерохроми, які забезпечують транспортування іонів Fe всередину клітини у вигляді розчинних комплексних сполук.

**Клітинна стінка лактобацил.** Бактеріальна клітинна стінка відрізняється від інших тим, що її основним компонентом є пептидоглікан, шар якого розміщується за межами цитоплазматичної мембрани. Пептидоглікан відповідає за твердість стінки і придання форми клітині. Він відносно пористий і не заважає потоку розчинних молекул крізь нього. Існує два основних типи бактеріальних клітинних стінок, за цією ознакою бактерії поділяються на грам-негативні і грам-позитивні. Грам-позитивні бактерії характеризується присутністю дуже товстого шару пептидоглікану, який відповідає за утримання фарбника кристал-віолет протягом процедури фарбування за Грамом. В клітинну стінку грам-позитивних бактерій вбудовані полімерні спирти, тейхоева кислота, деякі з яких зв'язуються з ліпідами, формуючи ліпотейхоеву кислоту. Ці речовини відповідають за з'єднання пептидоглікану з цитоплазматичною мембраною. Тейхоева кислота надає клітині негативний



електричний заряд завдяки наявності фосфодіестерних зв'язків між мономерами тейхоєвої кислоти.

Основним компонентом клітинної стінки бактерій є пептидоглікан (глікопептид, мукопептид, муреїн). Пептидоглікан виявлено тільки у прокариот. Винятком є еубактерії, що не мають клітинної стінки (мікоплазми, Lформи), та архебактерії — деякі метаноутворювальні та галофіли.

Специфічний гетерополімер пептидоглікан складається:

- із залишків N-ацетилглюкозаміну та N-ацетилмурамової кислоти, з'єднаних між собою  $\beta$ -1,4-глікозидними зв'язками. N-ацетилглюкозамін є похідною сполукою глюкози, в якій гідроксильна група при другому атомі вуглецю заміщена на аміногрупу. N-ацетилмурамова кислота — це ефір N-ацетилглюкозаміну та D-молочної кислоти (рис. 2.1.2);

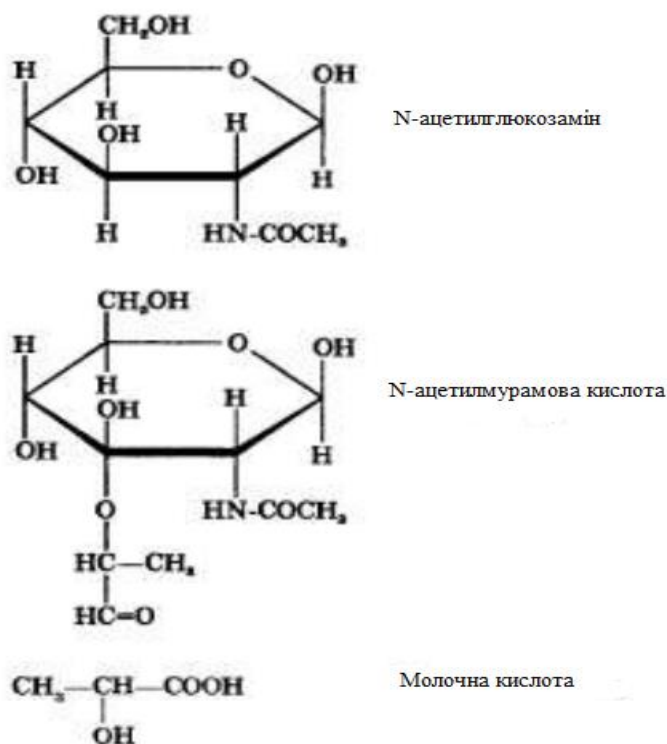


Рис. 2.1.2 - Основні складові гетерополімеру пептидоглікану

- із діамінокислот, з яких найчастіше зустрічаються мезодіамінопімелінова кислота, LL-діамінопімелінова кислота, лізин, орнітин. Наявність таких амінокислот з двома аміногрупами має принципове значення для просторової організації пептидоглікану. Вони забезпечують утворення двох пептидних зв'язків між пептидними угрупованнями в молекулі;

- з інших амінокислот (D- та L-аланін, D-глутамінова кислота, Lсерин, гліцин).

За допомогою пептидних місточків гетерополімерні ланцюги зв'язані між собою в мішкоподібну гігантську молекулу — муреїновий мішок (муреїнова сітка). Муреїновий мішок виконує функцію опорного каркаса клітинної стінки.

Клітинна стінка грампозитивних бактерій. У грампозитивних бактерій частка муреїнової сітки становить 30—70 % сухої маси клітинної стінки (завтовшки 40 шарів). Замість мезо-діамінопімелінової кислоти часто міститься LL-діамінопімелінова кислота або лізин. У клітинній стінці грампозитивних бактерій полісахариди, якщо вони є, зв'язані між собою ковалентно. Вміст ліпідів і білків невисокий. У білках клітинних стінок грампозитивних бактерій набір амінокислот менший (4-12), ніж у грамнегативних (містяться практично всі амінокислоти, з яких складаються білки).

Характерною особливістю грампозитивних бактерій є наявність у клітинній стінці тейхоевих кислот. Тейхоеві кислоти — це ланцюги, які складаються з 8—50 залишків гліцерину чи рибітолу, зв'язаних між собою фосфатними місточками. У молекулі тейхоевої кислоти поліол може містити моносахариди як замісники. Деякі з тейхоевих кислот містять еритритол чи маніт. Припускається, що тейхоеві кислоти зв'язані з муреїном через фосфат за типом амідів. У складі тейхоевих кислот деяких грампозитивних бактерій містяться жирні кислоти, які утворюють ефірні зв'язки з гліцерinovими залишками, їх називають ліпотейхоевими кислотами. Тейхоеві кислоти містяться в клітинах у значних кількостях. У деяких бактерій вони становлять більше половини маси клітинної стінки.

Функції тейхоевих кислот:

- фосфатні групи тейхоевих кислот є місцем зв'язування катіонів магнію, необхідного для багатьох ензиматичних і фізико-хімічних процесів, що проходять на цитоплазматичній мембрані;

- тейхоєві кислоти беруть участь у регуляції активності автолітичних ферментів;

- було показано, що цукрові компоненти тейхоєвих кислот є відповідальними за зв'язування фагів з клітинною стінкою. Якщо тейхоєва кислота з будь-яких причин втрачає глікозильні замісники, то бактеріальна клітина стає фагорезистентною (фагостійкою);

- ліпотейхоєві кислоти беруть участь в імунологічних реакціях.[20, 21]

**Крива росту лактобацил. Особливості окремих фаз.** Під поняттям ріст розуміють гармонійне збільшення всіх хімічних компонентів, з яких складається бактеріальна клітина. Ріст бактерії залежить насамперед від того, чи є в середовищі вода, поживні речовини, фізіологічно активні речовини тощо. Ріст бактерій завершується їхнім розмноженням, яке виявляється у збільшенні кількості особин мікробної популяції на одиницю об'єму. Найчастіше бактерії розмножуються поділом. Період від поділу до поділу клітини називається онтогенезом, або клітинним циклом бактерій.

За вирощування бактерій в рідкому живильному середовищі методом періодичного культивування в оптимальних умовах умовно виділяють фази росту бактеріальної популяції, які відображають загальну закономірність росту і розмноження бактеріальної клітин.

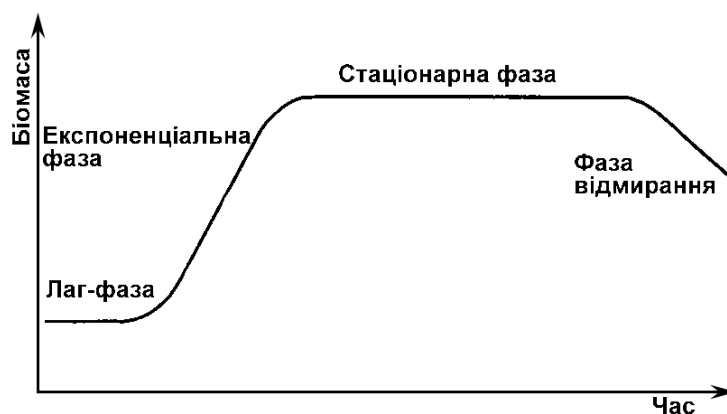


Рис. 2.1.2 - Крива росту лактобацил

1. Початкова фаза, або лаг-фаза охоплює проміжок часу від моменту висівання бактерій у живильне середовище й до досягнення максимальної швидкості росту. В цей період бактерії пристосовуються до умов

культивування. Тривалість цієї фази залежить від зовнішніх умов, віку і видової специфічності бактерій.

2. Експоненціальна, або лог-фаза. В цей період розмноження бактерій відбувається з найбільшою швидкістю. Кількість клітин збільшується в геометричній прогресії. Внаслідок інтенсивного розмноження клітин відбувається швидке поглинання поживних речовин із живильного середовища і нагромадження в ньому шкідливих продуктів обміну. Це, своєю чергою, сповільнює розмноження культури і лог-фаза переходить у наступну фазу.

3. Стаціонарна фаза настає тоді, коли кількість клітин перестає збільшуватись. У цей період кількість новоутворених клітин дорівнює числу відмерлих, а тому кількість живих клітин деякий час залишається незмінною. Разом з цим стаціонарна фаза характеризується максимальною величиною біомаси, максимальною життєдіяльністю мікробної популяції.

4. Фаза відмирання. У цій фазі відмирання бактерій переважає над розмноженням, зростає гетерогенність культури тощо. Такий стан бактеріальної популяції зумовлюється зміною фізико-хімічних властивостей поживного середовища та іншими несприятливими чинниками.[22]

### 2.1.2 Характеристика поживних середовищ

Для культивування бактерій роду *Lactobacillus* за допомогою класичної мікробіології використовують середовища, багаті поживними речовинами (дріжджовий екстракт, гідролізат молока, пептони, ТВІН-80), різними солями, в тому числі ацетатом натрію, і з низьким вмістом рН (4,5-6,2).

Із спеціальних поживних середовищ найбільш широке поширення отримало середовище MPC (MRS) - середовище de Man, Rogosa, Sharp. Середовища багаті поживними речовинами і ростовитих факторів, містять дріжджовий і м'ясний екстракти, глюкозу, пептони, ацетат натрію, цитрат амонію і ТВІН-80 – джерело жирних кислот, необхідних для метаболізму лактобактерій.

Вибір поживного середовища для культивування залежить від властивостей мікробів (типу харчування, дихання) і мети культивування. У мікробіологічній практиці використовують велику кількість поживних середовищ. Класифікують їх за походженням сировини, консистенцією, складом і призначенням.

За походженням сировини поживні середовища бувають натуральні і синтетичні. Натуральні середовища виготовляють зазвичай із сировини тваринного походження: м'яса (головним чином із яловичини), яєць, молока, риби; а також рослинного: соєвих бобів, гороху, рису, ячменю, моркви, картоплі, буряку. Синтетичні середовища готують із хімічно чистих органічних і неорганічних сполук відповідно до встановленого дозування. За консистенцією (щільністю) розрізняють середовища рідкі, напіврідкі і щільні. Напіврідкі і щільні середовища виготовляють із рідких, додаючи до них агар-агар або желатин.

Основу поживних середовищ для культивування мікроорганізмів складають джерела вуглецю. Виняткова різноманітність мікроорганізмів робить число таких з'єднань майже необмеженим, так як існують культури, здатні при здійсненні біосинтезу споживати вуглець тільки з високоорганізованих молекул, наприклад білків і пептидів. Крім вуглецю клітини мікроорганізмів у процесі росту відчують необхідність в джерелах азоту, фосфору, макро- і мікроелементів. Всі речовини такого роду знаходяться в поживних середовищах у вигляді солей, винятком являються лише середовища, де азот і фосфор можуть засвоюватися зростаючими культурами з органічних джерел, наприклад автолізатів або гідролізатів мікробного чи тваринного походження. В більшості випадків у промислових середовищах для культивування заздалегідь містяться всі необхідні елементи живлення, окрім кисню і, в деяких виробництвах, вуглецю, якщо останній вводиться у вигляді газоподібного зв'язку ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , та ін.)

Вимоги, що пред'являються до живильних середовищ. Живильні середовища повинні:

- Утримувати необхідні для харчування мікроба поживні речовини.
- Мати реакцію рН, оптимальну для вирощуваного виду мікроба.
- Мати достатню вологість, так як мікроби харчуються за законами дифузії і осмосу.
- Володіти ізотонічністю
- Бути стерильними, забезпечуючи тим самим можливість вирощування чистих культур мікробів.

Відділення приготування поживних середовищ на сумісному мікробіологічному виробництві представляє собою, як правило, цех, обладнаний ємностями для зберігання твердих та рідких речовин, засобами їх транспортування і апаратами з перемішувачами для приготування розчинів, суспензій або емульсій. При цьому поживні солі зберігаються, в основному в твердому вигляді, а приготовані їх суміші із заданим співвідношенням компонентів виготовляються в апараті з мішалкою, куди подаються безпосередньо тверді компоненти у необхідній кількості і далі проводиться їх розчин, або з'єднуються заздалегідь приготовані в спеціальних апаратах розчини кожного або декількох компонентів і проводиться лише їх кінцеве змішування і гомогенізація.

Виключно доступним і досить дешевим джерелом вуглеводів для культивування *Lactobaccillus mesem* є рослинні відходи. Будь-яка рослина містить різноманітні цукри. Целюлоза – полісахарид, що складається з молекул глюкози та геміцелюлоза, що складається з залишків арабінози, галактози, маннози, фруктози. На сьогодні доцільно створювати нові основи для поживних середовищ на основі рослинних відходів. Поживні середовища рослинного походження отримують з картоплі, гороху, сої, томатів, моркви, капусти. На природних середовищах мікроорганізми розвиваються добре, але вони малопридатні для вивчення фізіології обміну речовин мікроорганізмів, і мають не достатню кількість потрібних елементів для харчування мікроорганізмів. Тому відвари і відходи рослинної сировини концентрують і використовують як основи поживних середовищ. В якості субстратів

досліджені багатотонні відходи харчових виробництв: відходи виробництва крохмалю з картоплі та кукурудзи (сокова вода), вичавки з переробки томатів, відходи консервних виробництв.

Рідкі та тверді джерела вуглецю звичайно вводять у вже готове поживне середовище безпосередньо перед ферментацією, так як це ліквідує небезпеку зараження сторонньою мікрофлорою, ймовірність якого, різко підвищується при зберіганні готової поживної суміші.

### 2.1.3 Підготовка поживного середовища, повітря, обладнання, комунікацій

Біотехнологічні процеси, як правило, проводять в асептичних умовах. Асептика – це сукупність заходів, спрямованих на попередження потрапляння у середовище сторонніх речовин. Використання асептики в біотехнології забезпечує можливість застосування біологічного агента (продуценту біологічно активної речовини) і запобігти попаданню сторонніх інших мікроорганізмів. Асептика включає в себе: вологе прибирання приміщення; обробку антисептичними речовинами; ультрафіолетовим випромінюванням; використання стерильних інструментів; подача стерильного повітря у ферментери та інші. Існує механічний, фізичний та хімічний захист біооб'єктів. Механічний захист – це видалення механічних домішок (наприклад, із повітря, що подається на аерацію, за допомогою фільтрів. Фізичний захист – це обробка повітря або поверхонь апаратів ультрафіолетовим випромінюванням, кип'ятіння, теплової стерилізація. Хімічний захист – обробка антисептичними речовинами (хлор, хлорамін, хлорне вапно, озон, перекис водню, формалін). Антисептики – це хімічні сполуки, які згубно діють на мікроорганізми, їх дія зветься бактеріостатичною, коли затримується ріст та розмноження і бактерицидною, коли викликає загибель бактерій.[23]

**Стерилізація поживного середовища.** В залежності від жорсткості прийнятих в цьому відношенні рішень виявляється необхідність у створенні

заданого значення рН, що пригнічує сторонню мікрофлору, або у стерилізації усіх поданих у біореактор потоків і самого біореактора.

Рідинні потоки стерилізують різноманітними методами, із яких практичний інтерес представляють термічний, радіаційний, фільтраційний і частково-хімічний. Самий розповсюджений у промисловості термічний метод стерилізації.

На вибір оптимального режиму стерилізації впливають гетерогенність рідкого середовища, її фізико-хімічні властивості, якісний і кількісний склад. Якщо середовище не містить твердих часток і являє собою гомогенний розчин поживних речовин, то тривалість стерилізації за інших рівних умов може бути менше, ніж для середовищ, що містять тверді частки, тому що для їхнього прогрівання потрібно більше часу. Більший час стерилізації потрібно й у випадку, якщо в середовищі є ліпіди й вона має високий вміст сухої речовини. При наявності в складі середовища цукрів, що редукують, особливо глюкози й вільних амінокислот, стерилізацію вуглеводної й амінокислотної фракцій варто вести окремо, щоб уникнути втрати цукрів у результаті меланоїдиноутворення.

Стерилізацію поживних середовищ можна вести двома способами: періодичним і безперервним. Періодичний спосіб використовується при роботі з невеликими обсягами, наприклад у лабораторних ферментаторах і при стерилізації середовища для посівних апаратів. У цьому випадку процес ведуть у кілька етапів:

- 1) стерилізація ферментатора й всіх комунікацій гострою або глухою парою;
- 2) затока прогрітого гомогенізованого середовища;
- 3) нагрівання середовища до температури стерилізації;
- 4) витримування при цій температурі протягом часу, необхідного для загибелі всіх мікроорганізмів;
- 5) охолодження стерильного середовища в цій же ємності.

Цей спосіб стерилізації досить тривалий, і тому щоб уникнути істотних змін у складі середовища процес ведуть при надлишковому тиску 0,05- 0,1 МПа,



при температурі 110- 120°C на протязі 1 -1,5 год з моменту досягнення граничної температури. Але цей спосіб малоефективний, тому що ферментатори використовуються нераціонально, і через тривалість термічної обробки відбуваються розкладення й зміна ряду компонентів середовища. Крім того, при періодичному способі стерилізації високі енергетичні витрати й витрата води.

При безперервній стерилізації використовують більш високі температури (140-145°C) і меншу тривалість витримування (1 -10 хв) при цій температурі. Запропоновано кілька конструкцій безперервних стерилізаторів. Загальним для всіх апаратів цього типу є розділення процесу на три етапи й проведення кожного з них у потоці в окремому апараті. Перший апарат, у якому середовище нагрівається до температури стерилізації, називається стерилізатором, нагрівальною колонкою або колонкою для стерилізації поживного середовища. Другий апарат, де стерилізуєму масу витримують при певній температурі стерилізації, називається витримувачем. Він призначений для продовження часу стерилізації й досягнення максимальної загибелі мікрофлори. Апарат може бути виконаний у вигляді циліндричної ємності, колони з полками або тарілками, що забезпечують найбільш рівномірний прогрів всієї маси середовища, або у вигляді спірального теплообмінника. Третій апарат - це теплообмінник, призначений для охолодження стерильного поживного середовища до температури оптимальної для засівання.

Широко застосовуються установки безперервної стерилізації (УБС), у яких стерилізація ведеться при 140 °С на протязі декількох хвилин. Вони мають продуктивність від 5 до 50м<sup>3</sup> стерильного середовища в годину. Такі установки складаються з ємності для нестерильного поживного середовища, насосів, нагрівача-стерилізатора, витримувача, охолоджувача й системи автоматичного керування. Використовуються також роторні стерилізатори безперервної дії й ряд інших установок.

**Стерилізація апаратури та комунікацій.** При поверхневому культивуванні стерилізують апаратуру для приготування посівного матеріалу

(ємності для засівання, кювети, ємності для води, для готування посівної суспензії, посівні комунікації), а також виробничі кювети. Стерилізація кювет і скляного посуду у посівному відділенні проводиться сухою парою при температурі 160°C не менше 60 хв. Апаратуру й комунікації стерилізують гострою парою при температурі 105-120 °C і надлишковому тиску 0,05-0,1 МПа. Приміщення, особливо посівні бокси, стерилізують опроміненням за допомогою спеціальних бактерицидних ламп.

Стерилізація апаратів і комунікацій має велике значення й при глибинному способі культивування. Сама ретельна стерилізація може не дати ефекту, якщо порушено герметичність устаткування. Створено спеціальні прилади, наприклад галоїдні струмошукачі, для виявлення навіть незначних порушень герметичності.

При стерилізації обладнання є небезпека навіть при високих температурах не домогтися стерильності в результаті того, що в процесі теплової обробки внутрішніх порожнин апаратів відбувається конденсація пари біля стінок. Повітря, що виділяється з парогазової суміші, покриває стінки апарата повітряною плівкою, у результаті чого умови нагрівання стінки погіршуються. Погано піддаються стерилізації різні патрубки і люки, тому що в них утворюються повітряні пробки. Для поліпшення умов стерилізації при конструюванні апаратури варто скорочувати число швів, збільшувати діаметр і зменшувати висоту відводячих і підводячих штуцерів. Усі вентиля перед установкою перевіряють гідравлічним опресуванням при тиску 0,3 МПа. Для герметизації фланців і вентилів використовують особливі прокладки з параніту, обробленого графітом, для герметизації кришок апаратів застосовують шнур із прогумованої тканини діаметром до 19 мм, а для завантажувальних люків - гуму товщиною 14 мм. Герметичність з'єднань перевіряють при надлишковому тиску пари 0,15- 0,2 МПа. Перед поданням середовища ретельно перевіряють сальникове ущільнення мішалки, тому що в процесі стерилізації щільність насадки може змінитися.

Особлива увага приділяється стерилізації апаратури й комунікації для подачі піногасника. Стерилізацію цих вузлів проводять при 125-135°C на протязі 1,5-2 год. На стадії стерилізації ведеться постійний мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища, подаваного у ферментатор повітря, піногасника й т.п. На мікробіологічну чистоту перевіряють відділення стерилізації, його стіни і підлогу, апаратуру, комунікації, а також руки працюючих. [24]

Сучасна ферментаційна апаратура обладнується мобільними або стаціонарними установками для миття ферментерів (CIP-модулями). Принцип дії цих систем полягає в тому, що мийні розчини (лужні або кислотні) під великим тиском подають на спеціальні розбризкувальні головки, що є нерухомими (для менш відповідальних процесів) або обертаються, висуваються і втягуються (для процесів одержання фармацевтичних субстанцій). Завдяки високому напору мікроструменів відбувається ретельне очищення ферментаційної апаратури. Після очищення на головки подають водопровідну воду для ополіскування. Контроль ретельності ополіскування здійснюють за електропровідністю змивань.[25]

**Очищення та стерилізація повітря.** Переважна більшість продуцентів ферментів являються аеробами, і для їх нормального розвитку в процесі культивування необхідно подавати в достатній кількості стерильне повітря. Повітря після аерації зростаючої и культури може містити спори чи клітини мікроорганізму - продуцента, тому перед викидом у навколишнє середовище воно також вимагає очищення. Таким чином, потрібне очищення як подаваного у виробничі апарати і приміщення, так і видаляемого із них повітря. Особливо високі вимоги до стерильності пред'являються при підготовці повітря для аерації глибинної культури.

Існує кілька способів очищення й стерилізації повітря, заснованих на двох принципах: умертвіння мікроорганізмів і їхнє механічне відділення. Перший принцип лежить в основі методів впливу високих температур, ультрафіолетового або іонізуючого випромінювання, фенол- і ртутьмістких

агентів, пропущення повітря через 10%-й розчин лугу або 15-20%-й розчин кислоти в спеціальних вежах. Використання хімічних агентів, що стерилізують, неприпустимо, тому що сліди їх в апаратах і середовищах можуть впливати негативно на розвиток мікроорганізмів-продуцентів. Використання методу впливу сухого тепла для стерилізації повітря при температурі до 300°C ефективно вбиває мікрофлору, але економічно не виправдано.

Найбільше поширення у мікробіологічній промисловості одержала стерилізація повітря методом фільтрування через волокнисті або зернисті фільтруючі матеріали. На ефект стерилізації повітря методом фільтрування впливає ступінь засміченості повітря, оскільки самі мікроорганізми мають розміри від 0,01 до 25 мкм, але вони осідають на частки пилу, і ступінь уловлювання залежить від розмірів цих часток. Вміст бактеріальних забруднень у повітрі в середньому становить 1000- 1500 клітин в 1 м<sup>3</sup> . Крім мікроорганізмів у повітрі є пил органічної й неорганічної природи, пара води, і загальна кількість сторонніх часток може досягти 10<sup>9</sup> в 1 м<sup>3</sup> . Мікроорганізми, що перебувають у повітрі, звичайно стійкі до відсутності вологи й дії природних ультрафіолетових променів. Кількість мікроорганізмів в атмосферному повітрі убуває зі збільшенням висоти над рівнем землі; мікробна засміченість повітря у вологих районах або районах із сильними вітрами й ґрунтами, що порошать, значно вище. Кількість мікроорганізмів у повітрі міняється залежно від пори року; найменша кількість мікроорганізмів у повітрі спостерігається в зимовий час.

У приміщення й апарати повітря подається потужними компресорами; проходячи через них, повітря засмічується механічними включеннями від деталей і крапельками мастил при використанні поршневих компресорів. При фільтрації повітря відбувається також його очищення від цих механічних домішок.

Апаратне оформлення стадії підготовки й очищення повітря залежить від способу культивування продуцента. При поверхневому культивуванні вимоги до стерильності повітря менш тверді, чим при глибинному, і навіть

допускається рециркуляція аеруємого повітря. Підготовка повітря для аерації при поверхневому культивуванні проводиться у відділенні кондиціонування повітря, що звичайно розташовується над ростовими камерами.

Підготовка повітря для глибинного культивування має деякі відмінності – замість головного вентилятора використовують компресори. Потужність компресора підбирають із таким розрахунком, щоб забезпечити подачу повітря через всю систему очищення у ферментатори й щоб у процесі культивування підтримувався надлишковий тиск 0,01-0,03 МПа. На шляху проходження від компресора до ферментатору повітря переборює опір: у системі апаратів і комунікацій (близько 0,03 МПа); у фільтруючому шарі (близько 0,02 МПа); опір стовпа рідини у ферментаторі (0,04-0,06 МПа); при виході з барботажного пристрою в результаті розширення (0,01-0,02 МПа).

Для стиснення й нагнітання повітря можна використовувати поршневі компресори або турбокомпресори. Поршневі компресори мають високий КПД, вони прості в роботі, але мають невелику продуктивність і забруднюють повітря маслом. Щодо цього кращими технологічними характеристиками володіють турбокомпресори, у яких стиснення повітря відбувається під дією відцентрової сили. Вони більш складні в обслуговуванні, але мають високу продуктивність (від 100 до 1000 м<sup>3</sup> /хв) і не забруднюють повітря маслом. Недоліком цих компресорів є те, що вони можуть ефективно працювати лише при певному протитиску системи й високої продуктивності. При падінні тиску в системі й зниженні продуктивності ККД різко падає.

Широке поширення у якості фільтруючого матеріалу головних фільтрів одержали волокнисті матеріали. Волокнисті фільтри є фільтрами об'ємної дії, тому що вони розраховані на вловлювання й нагромадження часток не тільки на поверхні фільтруючого матеріалу, але й у глибині шару. Для фільтруючого матеріалу з певним діаметром волокна характеристики очищення можна змінювати, збільшуючи щільність упакування волокна у фільтрі або товщину шару матеріалу. Найбільш оптимальним є застосування багат шарової конструкції однорідної волокнистої насадки з різною щільністю шарів, що дає

значне збільшення пилоємності й терміну служби фільтра при порівняно невеликому опорі потоку повітря, високої ефективності фільтрування й невеликих габаритів фільтра.

На підприємствах біотехнологічної промисловості в головних фільтрах знайшов застосування фільтруючий матеріал з базальтових волокон. Основною перевагою базальтового волокна є висока паростійкість (більша ніж скляного волокна. Базальтове волокно не піддається гниттю й горінню.

Для очищення більших обсягів повітря застосовуються нетканинні фільтруючі матеріали з різних волокон: поліамідних, поліефірних, віскозних, металевих, а також різних сумішей волокон

Підготовка повітря для аерації виробничих приміщень. Стерильні виробничі приміщення аеруються стерильним повітрям, кондиційованим за температурою й вологістю. Якісно підготовка повітря в цих умовах нічим не відрізняється від підготовки повітря для аерації зростаючої культури. Відмінність може полягати лише в параметрах кондиціювання, але не в зниженні вимог до стерильності повітря. Стерильні приміщення повинні мати повітряні шлюзи, приміщення для зберігання захисного стерильного спецодягу. Стіни, підлоги, стелі приміщень повинні бути вологонепроникні й придатні для мийки і обробки дезінфікуючими речовинами. Для забезпечення постійної стерилізації повітря, наприклад, у боксах широко застосовується ультрафіолетове опромінення, а також вентиляція їх стерильним повітрям.

Система аерації виробничих приміщень із метою створення нормальних умов для роботи обслуговуючого персоналу менш складна в технічному відношенні, тому що вимоги до забрудненості повітря тут менш жорсткі. Кратність обміну повітря рівняється 5-12. Подаване у виробничі приміщення повітря повинне мати вологість близько 60 % і кімнатну температуру. Сухе повітря викликає подразнення слизуватих, збільшує сприйнятливність організму до інфекції, але разом з тим має високу здатність видаляти вологу, що виділяється. При розрахунку вентиляції виробничих приміщень передбачається рециркуляція повітря. Осушення повітря

здійснюється шляхом пропущення його через шар зернистого осушувача, колону з насадкою чи розпилювач із рідиною, що володіє високою спорідненістю до води. До твердих осушувачів ставляться силікагель із зернами величиною 1-4 мм, активований глинозем, безводний сульфат кальцію й деякі інші матеріали. З рідин, що володіють високою спорідненістю до води, можна відзначити гліколі (гліцерин, ди- і триетиленгліколь) і концентровані розчини солей.[26]

## 2.2 Опис технології виробництва

### 2.2.1 Технологічна схема отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій

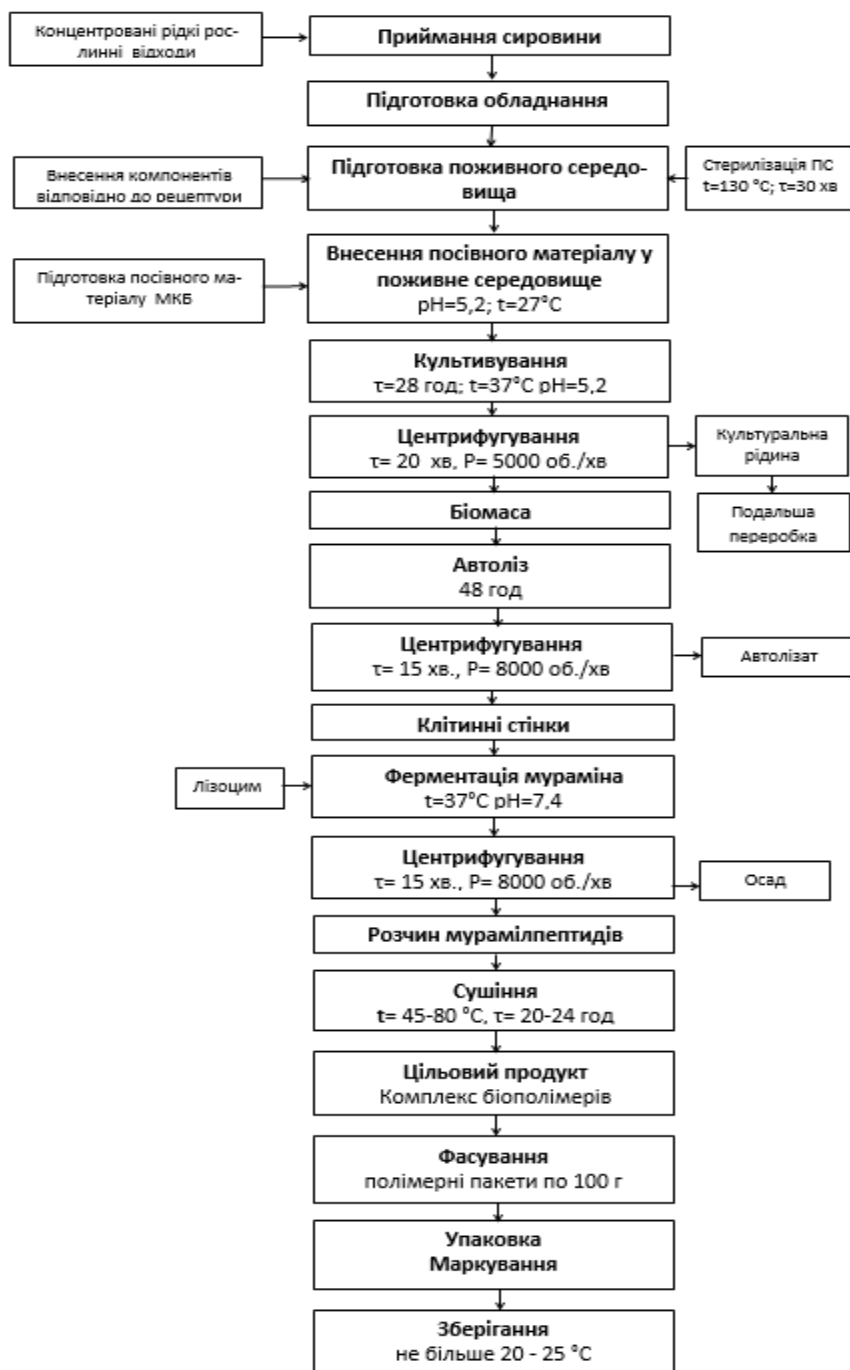


Рис. 2.2.1- Схема отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій



## 2.2.2 Опис технологічних процесів

### Передферментаційні процеси

Біотехнологічне виробництво, умовно розділено на декілька блоків, що визначається послідовністю їх виконання та дозволяє виявити існуючі між ними зв'язки. Ця послідовність покладена в основу технологічної схеми виробництва і представляє собою блок – схему.

До таких блоків відносять:

- роботи підготовчого характеру (передферментаційні процеси) до цих робіт відносяться стадії санітарної підготовки виробництва, підготовки поживного середовища, підготовка обладнання та комунікацій, підготовки аераційного повітря та інше;

- роботи основного виробництва, до цих робіт відносяться підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез, виділення цільового продукту (біологічно-активної речовини) та інше;

- в окремий блок виділені роботи по пакуванню маркуванню та відвантаженню готової продукції;

- роботи екологічного забезпечення до цих робіт відносяться роботи по знешкодженню повітряних та рідких викидів та роботи по використанню відходів виробництва.

Невід'ємною частиною підготовчих робіт на біотехнологічних підприємствах є проведення робіт санітарно-гігієнічного призначення. Основним спрямуванням санітарної підготовки виробництва є забезпечення мінімальної кількості контамінантів у всіх учасників виробничого процесу: в поживному середовищі, технологічному аераційному повітрі на поверхнях обладнання, яке контактує з культуральною рідиною, забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика пливають на якісні показники продукції. Роботи санітарно-гігієнічного призначення суттєво впливають на створення безпечних умов праці і охороні здоров'я працівників підприємства. Санітарна підготовка виробництва реалізується виконанням робіт по

щоденному позмінному та генеральному прибиранні виробничих приміщень та централізованою підготовкою обладнання.

Для забезпечення необхідного рівня санітарного стану виробництва проводиться комплекс робіт з всіма учасниками технологічного процесу:

- складовою частиною санітарної підготовки є підготовка персоналу, як можливого джерела контамінації, при цьому персонал проходить навчання та контроль знань;

- готуються виробничі приміщення, які обробляються мийними, дезінфікуючими та мийно-дезінфекційними засобами для зниження рівня загального забруднення та мікробної контамінації;

- готують обладнанням, яке проходить багатостадійну обробку, що включає – миття, дезінфекцію, ополіскування та стерилізацію;

- готують комунікації, які миються, стерилізуються;

- складовою частиною підготовки обладнання є перевірка його на герметичність та ефективність проведеної стерилізації.

В якості дезінфікуючих засобів використовуються загальноновизнані в біотехнологічній практиці речовини: розчин хлораміну, каустична сода та інші дезінфектанти та детергенти.

#### Опис технологічної схеми

Приймання сировини керується ретельним оглядом маркування сировини і перевіркою її відповідності нормативній документації. В якості сировини для поживного середовища використовуються відходи харчових виробництв: відходи виробництва крохмалю з картоплі(сокова вода), відходи виробництва кукурудзяного крохмалю, вичавки з переробки томатів та ін. Перед прийманням рідких концентрованих рослинних субстратів, проводять зважування. При отриманні сировини в автоцистернах або машинах проводять перевірку маси шляхом зважування автоцистерн або машин на автомобільних вагах з сировиною і без неї. На кожній партії сировини повинна бути прикріплена табличка із зазначенням найменування продукту, номера партії, підприємства-виробника, дати виготовлення і надходження.

Якість рослинних субстратів перевіряє виробнича лабораторія, відбираючи пробу сировини, відповідно до діючої нормативної документації.

Підготовка обладнання проводиться шляхом миття, ополіскування та стерилізації виробничого ферментера. Через технологічне обладнання пропускають миючий засіб. З'ємні частини (вузли) обладнання вимиваються в розчині миючого засобу при температурі 70 – 80 °С. Обробку ферментера проводять після кожного культивування. Ополіскування проводиться дистильованою водою. З'ємні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо стикаються з виробничою сировиною, слід зняти, розібрати і ретельно вимити при температурі 36 °С упродовж 30 хв. Відпрацьована вода йде до знешкодження відходів. Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,5 – 0,6 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (за манометром) не знижується, обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,5 до 0,6 МПа. Під паровим тиском перевіряють всі матеріальні, посівні і конденсатні вентиля та трубопроводи. Після перевірки герметичності обладнання, утворюється конденсат, який також відправляється на знешкодження відходів. Перевіряють усе обладнання та комунікації на справність, підключення світла, подачу води та повітря.

При стерилізації найважливішою умовою її ефективності є можливість створення в усіх точках внутрішніх порожнин необхідної температури і підтримки її протягом заданого часу. У виробничих умовах виконання цієї вимоги пов'язано зі значними труднощами через наявність у ферментері численних областей і зон, які є важкодоступними для пари. Найбільш важко стерилізуються ділянки розташування теплообмінників, барботерів, штуцера (місця введення трубопроводів, датчиків КВП), завантажувальні люки, а в сварках трубопроводів - стикові місця, які утворюються на відгалуженнях і в місцях приєднання до апаратів. Стерилізацію ферментера проводять шляхом

подання гострої пари при температурі 131 °С і тиску 0,2 МПа протягом 2-х годин.

Підготовка поживного середовища починається із завантаження ферментера концентрованим рослинним відвар. Проводять стерилізацію при температурі 140 °С. Подають додаткові підготовлені компоненти (відповідно до рецептури продуктів). Підтримується оптимальна кислотність (рН=5,2). Стерилізацію готового поживного середовища проводять при температурі 130 °С протягом 30 хвилин.

Сухі компоненти для приготування поживних середовищ зберігаються в спеціальному складському приміщенні. Для зберігання використовують резервуари, збірники, мішки. На завод сировина надходить в цистернах, мішках, коробах, бочках. Для зважування сировинних матеріалів використовують ваги харчової та хімічної промисловості: від лабораторних електронних ваг до ваг, розрахованих на зважування сировини у тоннах. Транспортування сипких продуктів до бункерів реакторів змішувачів здійснюють вручну. При глибинному способі культивування цех приготування середовища ізолюється від інших виробничих приміщень, щоб запобігти попаданню нестерильної, забрудненої мікроорганізмами сировини в основне виробництво. У цеху приготування поживного середовища передбачаються спеціальні місткості, забезпечені мішалкою, сорочкою для обігріву, введенням гострої пари, а також різними введеннями з дозуючими пристроями для внесення в місткості компонентів середовища. Так як потужність підприємства невелика, готують середовище в одній місткості, де буде проходити культивування, при певній послідовності операції.

Для засіву ферментера посівний матеріал вирощують у лабораторії на качалочних колбах при 180-200 об / хв . Вирощування проходить у колбах по 750 мл при температурі 37 °С на протязі чотирьох діб (48 год). Культура, що виросла в колбах, стерильно переносять в малий, а потім у великий інокулятор.

Посівний матеріал, вирощений в інокуляторі, подається для засіву живильного середовища виробничого ферментера. Внесення посівного матеріалу здійснюється при температурі 27°C поживного середовища, яке перед внесенням охолоджують, також підтримується рН середовища - 5,2 . Вносять посівний матеріал, дотримуючись вимог асептики. Контролюють оптимальну кислотність (рН=5,2).

Культивування у ферментері проходить 28 год при температурі 37 ° С з постійним рН середовища - 5,2. Нарощення біомаси контролюється по збільшенню кількості клітин, концентрації розчинених речовин (зменшенню глюкози).

Опис технологічних процесів лінії з отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій

Біомаса молочнокислих бактерій надходить з ферментаційного відділення Брагар Олесі Ігорівни. Після стадії культивування мікроорганізмів-продуцентів проводиться технологічний етап – виділення із культуральної рідини та очищення кінцевого продукту. Культуральна рідина – це складна багатофазна система, що вміщує від 1 до 5% та більше сухої речовини у вигляді окремих мікробних клітин , продуктів біосинтезу та залишків живильного середовища. Для виділення кінцевого продукту із такої складної суміші можна використати метод центрифугування. Центрифугування проходить протягом 20 хв при 5000 хв<sup>-1</sup>, культуральна рідина надходить у збірник для подальшої переробки.

Отриману біомасу перекачують до реактору для автолізу. Біомасу у реакторі витримують 48 год при температурі 55 °С і рН середовища - 5. Контроль за протіканням автолізу проводять по наявності клітин (за допомогою мікроскопу) та за мутністю розчину, визначенням амінного азоту рефрактометричним методом, по накопиченню аміноз.

Після проходження повного автолізу біомаса із зруйнованими клітинами піддають центрифугуванню задля отримання клітинних стінок та відділення рідкої фази. Центрифугування проходить протягом 15 хв.

8000 хв<sup>-1</sup> Клітинні стінки переходять до наступного етапу для створення комплексу біополімерів.

Відділена рідка фаза (автолізат) виступає вторинним продуктом і також йде на фасування, як безклітинний ферментний препарат (у рідкому вигляді), який має лікувальні властивості. Рідка фаза містить у собі білкові речовини-ферменти, амінокислоти, ліпіди, пуринові і піримідинові нуклеотиди, вуглеводи, мінеральні речовини.

Автолізат фасують у склянні флакони по 10 мл, який може зберігатися при температурі від +2 °С до +8 °С.

Автолізат молочнокислих бактерій, який має високий вміст нативних біологічно-активних речовин має перспективи у сучасній промисловості. Безклітинний автолізат можна використовувати при виробництві молочнокислих продуктів, збагачення різних продуктів харчування, а також створення пробіотиків у формі лікарських препаратів і БАДів (біологічно-активних добавок).

Автолітичні процеси біомаси не призводять до деструкції клітинних стінок і отримання низькомолекулярних мурамілпептидів, тому проводять ферментоліз пептидоглікану клітинних стінок МКБ.

Для дезінтеграції клітинних стінок проводиться ферментація мураміна. Ферментація проводиться у присутності ферменту лізоциму при температурі 37 °С та рН середовища – 7,4.

По закінченню ферментаційного процесу проводиться центрифугування протягом 15 хв при 8000 хв<sup>-1</sup> задля відділення осаду та розчину мурамілпептидів.[27]

Для отримання сухої форми продукту, як найбільш привабливої для реалізації планується застосовувати сушіння. Сублімаційне сушіння отриманого концентрованого комплексу мурамілпептидів проводиться протягом 20 - 24 год при температурі 45 - 80 °С. Концентрований розчин клітинних стінок розливають по 50 мл у колби об'ємом 100 мл.

Заморожування проводиться при  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 18 год та вакуумне зневоднення при температурі полиць -  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Спосіб такого сушіння біопрепарату включає введення в розчин цього біопрепарату перед ліофілізацією захисного середовища, яка запобігає падінню його біологічної активності при ліофілізації і зберіганні. Для цього використовують сахарозо-желатинове середовище. Захисна дія пов'язана з тим, що в ході охолодження розчину біопрепарату після первинної кристалізації води залишається концентрований розчин, що містить 15-30% "незамороженої" води, який при подальшому охолодженні переходить в некристалічний твердий стан. В результаті сублімації не зв'язана вода вивільняється з маси замороженого матеріалу, препарат переходить з твердого стану (замороженого) в сухий (пориста маса, що майже не змінюється в об'ємі. [28]

Сублімаційне сушіння також називається ліофілізацією або сублімацією. Даний процес широко застосовується в харчовій галузі промисловості, в фармацевтиці для сушіння вакцин і біологічно активних добавок. При ліофілізації заморожені продукти в умовах вакууму нагріваються до  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , таким чином лід випаровується, а всі корисні речовини залишаються в продукті.

Фасування готового препарату здійснюється у полімерні пакети масою по 100 г. Полімер – високомолекулярна сполука, речовина з великою молекулярною масою. Використання полімерних матеріалів у різних галузях виробництва зумовлено низкою специфічних та фізикохімічних властивостей для кожної галузі окремо, у тому числі і для фармацевтичної.

Полімерні матеріали, які використовуються у фармацевтиці, повинні відповідати ряду додаткових санітарно-гігієнічних вимог:

- мінімальне виділення в навколишнє середовище газоподібних продуктів, що не перевищує гранично допустиму концентрацію (ГДК);
- нерозчинність у миючих розчинах;

- можливість стерилізації дезінфікуючими розчинами, газами, УФ-опроміненням,  $\gamma$ -випромінюванням.

Для полімерних матеріалів існують певні переваги при виготовленні тари для біопрепаратів, лікарських засобів, такі як:

- 1) легкість;
- 2) можливість декоративного оформлення;
- 3) низька вартість;
- 4) привабливий товарний вигляд;
- 5) зручність користування.

Полімерні пакети для фасування готової продукції є практичні та безпечні при вмілому їх використанні, забезпечують ефективні експлуатаційні властивості.[29]

Після проводиться ручне маркування упакованої продукції. Зберігається готовий продукт у складському приміщенні при температурі не вище 20-25 °С в герметичній тарі при відносній вологості до 50%.

### 2.2.3 Схема постадійного контролю отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій

Система аналізу небезпек і критичних точок контролю забезпечує контроль на всіх етапах виробництва харчових продуктів, будь-якій точці процесу виробництва, зберігання та реалізації продукції, де можуть виникнути небезпечні ситуації. При цьому особлива увага направлена на критичні точки контролю, в яких всі види ризиків, пов'язані з використанням харчових продуктів можуть бути попереджені, усунені або знижені до припустимих рівней в наслідок цілеспрямованих заходів контролю. Для запровадження системи НАССР виробники зобов'язані не лише досліджувати свій власний продукт та засоби виробництва, але й використовувати цю систему та її вимоги до постачальників сировини, допоміжним матеріалам, а також системи оптової та роздрібної торгівлі. Система НАССР не є



системою відсутності ризиків. Вона розрахована на зменшення ризиків, що викликані можливими проблемами з безпекою харчовою продукцією.

На всіх етапах виробництва активного препарату здійснюється контроль якості за технологічними процесами його виготовлення.

В таблиці 2.2.3.1 наведена схема постадійного контролю отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій.

Таблиця 2.2.3.1 – Контрольні точки технологічного виробництва мурамілпептидів

№ п/п	Об'єкт контролю	Засоби та методи контролю	Контролюючі параметри	Регламентовані нормативи
КТ-1	Конденсат	Мікрокопіювання	Стерильність	–
КТ-2	Поживне середовище	pH-метр, мікрокопіювання	pH, стерильність	7,2 од. pH, стерильна
КТ-3	Поживне середовище з добавками	pH-метр, мікрокопіювання	pH, стерильність	7,2 од. pH, стерильна
КТ-4	Поживне середовище з введеним посівним матеріалом	Підрахунок клітин у камері Горяєва	Кількість клітин, в мл Наявність сторонньої мікрофлори	1*10 <sup>6</sup> Відсутня
КТ-5	Готова мікробна маса	Термометр опору, pH-метр, мікрокопіювання, УФ спектрометр, підрахунок клітин у камері Горяєва	T, °C pH Стороння мікрофлора Оптична щільність Кількість клітин, в мл	30±1 5,6 од. pH, Не міститься Не менше 2 ед.
КТ-6	Автолізат	Наявність клітин Мікроскоп Мутність розчину	Кількість клітин, в мл Наявність сторонньої мікрофлори	Не міститься

Продовження табл. 2.2.3.1 – Контрольні точки технологічного виробництва мурамілпептидів

№ п/п	Об'єкт контролю	Засоби та методи контролю	Контролюючі параметри	Регламентовані нормативи
КТ-7	Концентрат мурамілпептидів	Визначення за різницею в масах до і після висушування	Вміст вологи в продукті	До 30 % вологи в продукті
КТ-8	Сухий концентрат мурамілпептидів	Визначення за різницею в масах до і після висушування	Вміст вологи в продукті	До 5-7 % вологи в продукті

Система аналізу небезпек і критичних точок контролю (англ. HACCP Hazard Analysis Critical Control Point, HACCP) — є науково-обґрунтованою системою, що дозволяє створити на підприємстві умови для виробництва безпечної продукції шляхом визначення (ідентифікації) і контролю небезпечних чинників.[31]

#### 2.2.4 Вимоги до якості готової продукції

Для забезпечення виготовлення високої якості продукту Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) у 1968 р. затвердила «Вимоги до практики якісного виробництва при виготовленні і контролі якості ліків і до спеціалістів у сфері фармації»

GMP — це єдина система вимог з контролю якості лікарських засобів з початку переробки сировини до виробництва готових препаратів, включаючи загальні вимоги до приміщень, обладнання і персоналу.

Стосовно виробництва лікарських засобів вказано, що воно має ґрунтуватися на принципі чіткого додержання методів ведення технологічного процесу згідно з нормативно технічною документацією з метою одержання продукту необхідної якості і згідно з дозволом на його виготовлення і продаж. По можливості уникати будь-яких відхилень від методик або інструкцій.

За наявності таких відхилень необхідно погодження, дозвіл і підпис призначеної відповідальної особи, а за необхідності залучення служби відділу контролю якості.

Операції з різними продуктами не повинні виконуватись в одному і тому ж приміщенні, поки не буде усунений ризик перемішування або перехресного забруднення.

Доступ у виробничі приміщення можуть мати лише особи, які зайняті на виробництві. Уникати виготовлення немедичної продукції у зонах і на обладнанні, призначеному для виготовлення фармацевтичної продукції. При роботі з сухими матеріалами і продуктами необхідно дотримуватися правил техніки безпеки для попередження виникнення, накопичення і розповсюдження пилу, що може призвести до перехресного забруднення продуктів, що виготовляються, або до їх мікробного забруднення. Мікроби можуть потрапляти у повітря і на частинки пилу із інших матеріалів і продуктів при їх виготовленні, із забруднених обладнання і одягу, шкіри працюючих. Запобігти цьому можна шляхом виготовлення кожного цільового продукту в роздільних зонах.

Необхідно перевіряти правильність і надійність з'єднання трубопроводів й іншого обладнання, яке використовується для транспортування продуктів (матеріалів) з однієї зони в іншу. Дистильована або деіонізована вода, яка надходить по трубах, має відповідати санітарно-мікробіологічним нормативам. Операції з технічного обслуговування або ремонту не мають впливати на якість продукції.

Контроль якості продукції стосується процесу забору проб, проведення досліджень, документації та ін. Всі дослідження мають проводитися згідно з затвердженими інструкціями для кожного матеріалу або продукту. Забір проб здійснюють таким чином, щоб не забруднити їх або не піддати небажаному впливові, який позначиться на якості продукту або, навпаки, щоб матеріал, який відбирається, не був токсичним (шкідливим) для здоров'я оператора. Для кожної партії продукту до випуску має бути лабораторна документація з

підтвердженням відповідності кінцевого продукту специфікаціям. Із кожної партії цільового продукту залишають проби на зберігання терміном, який перевершує на рік строк придатності продукту. Проби мають зберігатись у такій кількості, щоб можна було за необхідності провести щонайменше два повторних дослідження.

Додержання правил GMP забезпечує випуск якісних продуктів і гарантує безпеку споживачам.

Імуностимулятори утворюють групу лікарських засобів, дія яких спрямована на посилення імунної відповіді. До них можуть належати не лише фармакологічні форми, але й харчові добавки, адьюванти та інші агенти, які прискорюють або збільшують інтенсивність імунних процесів.

Імуностимулюючі препарати вимагають високої якості та ретельного контролю на усіх процесах виробництва. На біотехнологічних виробництвах проводять контроль на кожному процесі: від приймання сировини до реалізації. Для біопрепаратів важливе значення мають: контроль початкового матеріалу, контроль сировини та особливо контроль критичних точок.

Контрольні операції проектуються і нормуються в процесі розробки технологічного процесу та заносяться до технологічної карти. Для складних контрольних операцій створюються карти контролю.[32]

Мікробіологічний контроль біотехнологічного виробництва є обов'язковою і важливою стадією загального контролю і управління технологічного процесу. Мікробіологічний контроль включає декілька компонентів:

1) мікробіологічну характеристику рідких і повітряних потоків (визначення інфікованості вхідних потоків; визначення санітарного стану виробничого обладнання та приміщень );

2) мікробіологічну характеристику виробничої культури ( визначення чистоти посівної культури; визначення показників фізіолого-біохімічного стану культури );

3) мікробіологічну характеристику якості готового продукту;

4) санітарно-мікробіологічний контроль ( стан робочої зони, стан вихідних потоків і навколишнього середовища.

Сухий концентрат мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій фасують у полімерні пакети по 100, для перевезення автомобільним транспортом пакують у картонні коробки. Режими зберігання при температурі не більше 20 - 25 °С.[33]

### **2.3 Продуктовий розрахунок і матеріальний баланс отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій**

Вихідні данні для розрахунку

Випуск сушеного концентрату мурамілпептидів отриманих із клітинних стінок пробіотичних молочнокислих бактерій буде здійснюватися протягом 3 місяців (березень – травень), при потужності переробки біомаси обсягом 15 кг.

2.3.1 Визначення графіку роботи цеху з отримання мурамілпептидів із клітинних стінок МКБ

Таблиця 2.3.1.1 - Визначення графіку роботи цеху

Назва продукту, препарату	Кількість робочих днів цеху без вихідних		
	Березень	Квітень	Травень
Висушений концентрат мурамілпептидів	24	22	21
Загальна кількість робочих днів:	67		

Отже, отримання сушеного концентрату мурамілпептидів за визначеним графіком здійснюється протягом – 92 днів, з яких робочих днів – 67, вихідних днів – 25.

### 2.3.2 Відсотковий розрахунок матеріального балансу

Сировиною для отримання мурамілпептидів із клітинних стінок є нарощена біомаса молочнокислих бактерій. Задана потужність їх виробництва 15000г/добу. Наведемо розрахунок матеріального балансу (табл.2.3.2.1).

1. Після ферментера надходить 15 000 г біомаси на розділення її на клітинну фракцію і культуральну рідину. При центрифугуванні відділяється культуральна рідина, втрати з якою складають 60%:

- на центрифугування поступило 15 000 г
- втрати при першому центрифугуванні 9000 г (60%)

2. Далі біомаса поступає на автоліз, при якому відбувається руйнування клітин і вивільняється їх вміст, рідка фракція яких видаляється при повторному центрифугуванні:

- кількість біомаси, що поступає на автоліз – 6 000 г
- втрати при другому центрифугуванні 3750 г (25%)

3. Наступним етапом отримання препарату є ферментативний гідроліз оболонки з використанням лізоциму:

- кількість біомаси, яка поступає на ферментативний гідроліз – 2250 г
- втрати на останньому етапі центрифугування та фасування перед сушінням - 450 г (3%)

4. Для отримання сухої форми готового препарату його концентрують та висушують:

- кількість вологих клітинних стінок, що поступає на сублімаційне сушіння – 1800 г
- втрати при сублімаційному сушінні – 1500 (10%)

5. Поступає 300 г готового висушеного біопрепарату

Таблиця 2.3.2.1 – Матеріальний баланс на один цикл

№ з/п	Використано		Отримано				
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, г	Назва кінцевого продукту	Кількість, г	Назва відходів та втрат	Кількість, %	Кількість, г
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Центрифугування</b>							
1.	Біомаса після культивування	15000	Біомаса	6000	Культуральна рідина	60	9000
<b>Центрифугування після автолізу</b>							
2.	Біомаса	6000	Вологі клітинні стінки	2250	Автолізат	25	3750
<b>Центрифугування після ферментації мураміна</b>							
3.	Вологі клітинні стінки	2250	Клітинні стінки без осаду	1800	Осад	3	450
<b>Сушіння</b>							
4.	Концентровані клітинні стінки	1800	Висушені клітинні стінки	300	Волога	10	1500

З технологічної лінії «Отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій» кількість готового продукту висушеного концентрату мурамілпептидів складає 300 г за один виробничий цикл.



### 3. ІНЖЕНЕРНО-ТЕХНІЧНА ЧАСТИНА

#### 3.1 Інженерно-технічне забезпечення технологічного цеху

##### Архітектурно-будівельна частина проекту виробництва

Каркас одноповерхового промислового будинку - основна несуча конструкція, що являє собою систему поперечних рам, які складаються з колон, жорстко зароблених в окремо стоячі фундаменти і жорстко зв'язаних з ригелями у виді балок покриття, по верхнім поясам яких створюють настил під покрівлю.

Основні обгороджуючі конструкції покриття: настили, пароізоляція, теплоізоляція, вирівнюючий шар асфальту чи цементного розчину.

Настил проектують з залізобетонних ребристих плит, що укладаються на верхні пояси балок і кріпляться до них зварюванням закладних деталей.

Пароізоляційний шар захищає теплоізоляцію від зволоження водяними парами, у покриття проникаючими з приміщень, його виконують з 1-2 шарів руберойду, що наклеюється на бітумну мастику.[34]

Зовнішні стіни в будинку з повним каркасом ніякого навантаження крім власної ваги не несуть; тому називаються самонесучи. Вони виконують тільки обгороджуючу функцію. Такі стіни проектують з крупнорозмірних стінових панелей довжиною 6 м. Стійкість торцевих стін забезпечується колонами фахверка (вітровими). Колони виконують сталевими з прокатних профілів, ригеля з залізобетону.

Колони фахверка встановлюють з нульовою прив'язкою, між колонами основного каркаса з кроком 6 м. Для поділу внутрішніх обсягів будинку на окремі виробничі, допоміжні, складські й інші приміщення застосовують перегородки. Їх виготовляють із крупнорозмірних залізобетонних, гіпсобетонних і гіпсожужільних панелей товщиною 80-100 мм.

Панельні перегородки кріплять до стін і елементів каркаса за допомогою анкерів. Внутрішні стіни і перегородки розміщують по розбивчим осям, у разі потреби - між осями. Розміри і розміщення віконних прорізів визначають

відповідно до вимог раціональної організації природного висвітлення, аерації прим

У внутрішній обробці приміщень панельних стінах передбачають тільки замірку швів. В основних виробничих приміщеннях, мийних відділеннях, лабораторії, душових, туалетах нижні частини стінових панелей, перегородок, а також поверхні залізобетонних колон на висоту 1,8 м облицьовують глазурованою плиткою. В інших приміщеннях передбачають масляні панелі на висоту 1,8 м. Конструкції, що утворюють стелі, затирають цементним розчином.

Стіни вище панелей і стелі білять чи офарблюють клейовими фарбами світлих тонів. У холодильних камерах стелі затирають, стіни штукатурять по ізоляційному матеріалу і роблять вапняну побілку. Заповнення віконних і дверних прорізів офарблюють олійною фарбою 2 рази. [34]

Побутові приміщення підприємства вимагають особливого санітарного режиму і відноситься до IV групи. До складу побутових приміщень цієї групи входять: гардеробні для збереження вуличного і домашнього одягу і гардеробні для збереження робочого одягу, душові, умивальні, убиральні, а також спеціальні приміщення: кімната медичного огляду, санпіст, приміщення для особистої гігієни жінок.

При головному вході у виробничий корпус і допоміжні приміщення передбачають вестибуль.

Гардеробні приміщення для збереження вуличного, домашнього і спеціального одягу проектують зального типу (без коридорів). Входи в гардеробні, розташовані суміжно з вестибулем, передбачають через тамбур. Проектуючи гардеробні блоки, виключають можливість перетинання потоків руху працюючих.

Гардеробні, призначені для збереження робочого одягу, розміщують ізоляційно від приміщень, де зберігається вуличний одяг і домашній. Одяг зберігається закритим способом (у шафах).

Кількість шаф приймають рівним загальній кількості працюючих у всіх змінах. Розміри стандартних шаф - глибина 50 см, висота 165 см, ширина 33 см (для збереження вуличного і домашнього одягу). Шафи для збереження робочого одягу мають ширину 25 см при звичайному складі.[34]

Душові розміщують суміжно з гардеробними. При них розташовують переддушеву та туалет. Душові кабінки відокремлюються одна від іншої вологостійкими перегородками висотою 1,6 м, що не доходять до підлоги на 0,2 м.

Переддушева обладнана лавами шириною 0,3 м з розрахунку 0,4 м на одну людину, з розрахунком трьох місць на одну душову сітку. Відстань між рядами лав дорівнює 1,0 м.

Умивальні розміщують суміжно з гардеробними робочого одягу. Відстань від умивальників до шаф - не менш 2 м. Застосовують групові круглі умивальники - 90 см на 5 місць і 140 см на 8 місць. Ширина проходу між рядами умивальників не менш 2,0 м, а між крайніми рядами умивальників і стіною - 1,5 м. Ширина проходу між груповими круглими умивальниками і стіною дорівнює 0,9 м, між умивальниками 1,2 м. Кількість кранів в умивальниках установлюють по числу працюючих у найбільш численну зміну. Відстань між осями кранів умивальників у ряді дорівнює 0,65 м. На виробництві IV групи один кран на 10 чоловік, що працюють у найбільш численній зміні.

Вхід у вбиральні встановлюють через тамбури з дверима, які самі закриваються. Кількість унітазів і пісуарів у вбиральнях залежить від числа людей у найбільш численній зміні з розрахунку 15 чоловік на один прилад. Кількість унітазів не більш 16 штук.

Двері в кабінах повинні відкриватися назовні, перегородки по висоті рівні 1,8 м і на 0,2 м не доходять до підлоги. [34]

## Опалення, вентиляції та кондиціонування повітря виробничих приміщень

Опалення призначене для забезпечення температурних умов у приміщенні відповідно до вимог санітарних норм у холодну та перехідну пори року.

Опалюватись може все приміщення, а також окремі робочі місця.

Системи вентиляції, опалення і кондиціонування повітря у комплексі з технологічними заходами щодо зменшення шкідливих виробничих речовин разом з архітектурно-планувальними та конструктивними рішеннями будівель і приміщень забезпечують метеорологічні умови і вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони виробничих приміщень у відповідності до нормативних вимог.[35]

### Водопостачання, каналізації та очистки виробничих стічних вод

Водопостачання підприємств повинно проводитися приєднанням їх до централізованої мережі водопроводу. Якість води, використовуваної для технологічних, питних і господарсько-побутових потреб, має відповідати вимогам санітарних правил і норм (СанПіН 2.1.4.1074-01 «Питна вода. Гігієнічні вимоги до якості води централізованих систем питного водопостачання. Контроль якості» або СанПіН 2.1.4.544 -96 «Гігієнічні вимоги до якості питної води при нецентралізованому водопостачанні»). Артезіанські свердловини і запасні резервуари повинні мати зони санітарної охорони не менше 25 м. За їх санітарно-технічним станом і за якістю води, що подається в резервуари і виробничі цехи, повинен бути встановлений систематичний контроль у строки, встановлені органами держсанепіднагляду (хімічний аналіз проводиться не рідше одного разу на квартал, бактеріологічний - не рідше одного разу на місяць). Залежно від епідеміологічної обстановки кратність аналізів може бути змінена, незалежно від джерела водопостачання. При цьому приміщення водяних баків для запасної води повинні бути ізольовані.[36]

Пристрій системи каналізації підприємства повинен відповідати вимогам СНиП "Каналізація. Зовнішні мережі та споруди »,« Внутрішній водопровід і каналізація будинків ".

Для видалення виробничих і господарсько-побутових стічних вод підприємства повинні бути приєднані до загальноміської каналізації або мати самостійну каналізацію та очисні споруди.

Внутрішня система каналізації виробничих та господарських побутових стічних вод повинна бути роздільної з самостійним випуском в дворову мережу.

Забороняється скидання у відкриті водойми виробничих і побутових вод без відповідного очищення, а також пристрій поглинаючих колодязів.[36]

### 3.2 Підбір технологічного обладнання

Машинно-апаратурна схема лінії виробництва мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій

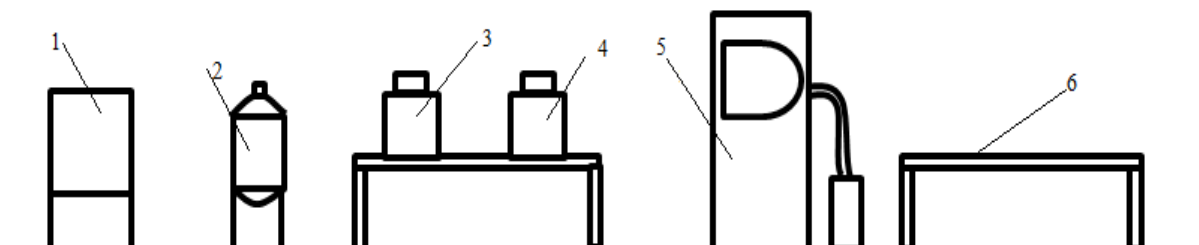


Рис. 3.2.1 Машинно-апаратурна схема виробництва мурамілпептидів із клітинних стінок МКБ:

1 – центрифуга; 2 – реактор для автолізу; 3,4 – центрифуги; 5 – сушарка; 6 – пакувальний стіл.

Для виробництва 300 грам сухого концентрату мурамілпептидів необхідно переробити 15 кілограмів біомаси молочнокислих бактерій. Виробництво лінії починається з пропускання 15 кг біомаси через центрифугу 1, продуктивність якої складає 34 кг. На виході центрифуги 1 отримують 6 кг біомаси та 9 кг культуральної рідини. 6 кг біомаси в ручну завантажують у реактор для автолізу 2 із продуктивність 10 л, і додають тільки на початку

процесу фермент лізоцим. 6 кг біомаси після реактора 2 пропускають через центрифугу 3 із продуктивністю 3,45 кг. На виході із установки 3 отримують 2,25 кг вологих клітинних стінок та 3,75 кг автолізу. Із 2,25 кг клітинних стінок ферментують мурамін, додаючи фермент лізоцим, та пропускають через центрифугу 4. На виході центрифуги 4 отримують 1,8 кг розщеплених концентрованих клітинних стінок. У сублимаційну сушарку 5, вручну завантажують 1,8 кг продукту, де сушіння проходить 20 год. Висушений продукт переміщують на пакувальний стіл 6, де вручну пакують готовий продукт у полімерні пакети по 100 г та маркують.

Відповідно даним параметрам для отримання мурамілпептидів із клітинних стінок МКБ обираємо наступне технологічне устаткування із каталогу для цеху виробництва:

1. Реактор для автолізу об'ємом на 10 л, виробництва «Wise master», Україна.

Технічні характеристики:

- тип ємності: циліндрична ємність з сорочкою нагріву
- основні розміри: 800х300х900
- робоча температура: 90 град С
- робочий об'єм: 10
- характерне якість матеріалу: Нержавіюча харчова сталь AISI 304
- внутрішній корпус: AISI 304
- зовнішня сорочка: AISI 304
- кількість оборотів мішалки: 98 об / хв.

Для лінії виробництва сушеного концентрату мурамілпептидів приймаємо одну одиницю даного устаткування.

2. Центрифуга виробництва Rousselet Robatel RC50, Росія, з вертикальною віссю.

Рама встановлена на віброізоляторах (моніторинг вібрації). Все, що змочуються частини виготовлені з нержавіючої сталі AISI 316 (L & Ti).

Жорсткий тип центрифуги, приводиться в дію боковим мотором, сполученим з частотним перетворювачем. Відкривання кришки на 90 градусів.

Технічні характеристики:

- діаметр барабана: 500 мм
- висота барабана: 320 мм
- регульована швидкість барабана: 2250 – 5000 об / хв
- сила G при макс. Швидкості: 1,414
- корисний об'єм: 34 л
- корисне завантаження: 41 кг
- фільтруюча площа: 0,50 м<sup>2</sup>

Для лінії виробництва сушеного концентрату мурамілпептидів приймаємо одну одиницю даного устаткування.

3. Центрифуга виробництва Rousselet Robatel RA 20 Vx, Росія.

Лабораторна центрифуга, з вертикальною віссю. Всі частини, що контактують з продуктом, виготовлені з нержавіючої сталі AISI 316 (L & Ti). Зовнішній каркас, який утворює корпус, виготовлений з нержавіючої сталі, з трубою виведення фільтрату (Ø 3/4 "BSP або трікламп 1").

Технічні характеристики:

- діаметр барабана : 280 мм
- висота барабана: 100 мм
- обсяг барабана: 3,45 кг
- обороти: 3000 – 8000 об/хв
- довжина: 480 мм
- ширина - без спускной труби: 400 мм
- висота: 463 мм
- маса: 55 кг

Для лінії виробництва сушеного концентрату мураміл пептидів приймаємо дві одиниці даного устаткування.

4. Сублімаційна сушарка, модель СС-1.2, Росія.

Технічні характеристики:

- площа полиць: 1,2 м.кв.
- робоча глибина вакууму: 15-112 Па
- температура на поверхні сублиматора - 40 °С
- температура полиць: + 90 °С
- час технологічного циклу: 24 - 48 годин
- встановлена потужність: 9 кВт / год
- напруга живлення: 380 В
- маса: 1000 кг
- максимальний рівень шуму : 75 дБ
- габарити: 1400x1000x2000 мм

Для лінії виробництва сушеного концентрату мурамілпептидів приймаємо одну одиницю даного устаткування.[37]

Підбір основного технологічного обладнання для виробничого цеху з отримання сушеного концентрату мурамілпептидів наведено в таб. 3.2.1.[38]



Таблиця 3.2.1 - Підбір технологічного обладнання

Найменування обладнання	марка об-я	продуктивність		кількість об-я	габарити,м			потуж. ел.-дв., кВт	витрати			маса ,кг
		лінії,кг /год	машини		L	B	H		ел-гії, кВт/год	води, м <sup>3</sup> /год	пари ,кг/год	
Лінія отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій												
1. Реактор-ферментер	ТМ «ПРОМ ВІТ		1250	2	1,7	1,5	2,5	2,2	-	-	-	750
2. Реактор	ТМ «ПРОМ ВІТ	136	250	1	1,2	0,9	1,8	2,2	-	-	-	-
3. Лабараторний реактор	УПЕС-0.02 / 1.1	13	20	1	1	0,3	0,7	1,1	-	-	-	-
4. Реактор для автолізу	Wise master	6	10	1	0,8	0,3	0,9	1,1	-	-	-	-
5. Центрифуга	Rousselet Robatel RC50	15	34	2	1,2	0,8	1,4	4	-	-	-	1760
6. Центрифуга, 1	Rousselet Robatel RA 20 Vx	3	3,45	1	0,5	0,4	0,5	-	-	-	-	55

Продовження Табл. 3.2.1 - Підбір технологічного обладнання

Найменування обладнання	марка об-я	продуктивність		кількість об-я	габарити, м			потуж. ел.-дв., кВт	витрати			маса, кг
		лінії, кг/год	машини		L	B	H		ел-гії, кВт/год	води, м <sup>3</sup> /год	пари, кг/год	
Лінія отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій												
7. Сушарка	CC-1.2 GZLS	1,8	5	1	1,4	1	2	5	9	-	-	1000
8. Центрифуга, 2	Roussel Robatel RA 20 Vx	2,25	3,45	1	0,48	0,4	0,5	-	-	-	-	55

Обладнання для отримання мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій задовольняє всім вимогам, необхідним для дезінтеграції клітин та ферментації мураміна. Система контролю технологічних параметрів побудована на базі промислових систем автоматизації для забезпечення необхідної стабільності, гнучкості і ремонтпридатності.

### 3.3 Розрахунки основного технологічного обладнання

Головна галузь застосування сублімації сушіння в нинішній час - виробничі процеси виготовлення ліків, заквасок, екстрактів лікарських рослин, ферментів і інших продуктів, де потрібно максимально зберегти всі корисні властивості на тривалий час. Консервування лактобактерій, мікроорганізмів і біопрепаратів найбільш якісним виходить саме при використанні сублімації сушіння.

Особливо важливим в фармацевтиці є те, що через мінімальний вміст вологи готового продукту (всього до 5%), він може довго зберігатися навіть при температурах до 25 градусів, що дуже важливо для лікарських засобів.

У харчовій промисловості продукти, висушені даним методом, не тільки зберігають всі корисні речовини, але і здатні дуже довго зберігатися (до 5 років) не втрачаючи аромату і смакових якостей навіть при температурі, що змінюється в межах  $\pm 50$  ° С. При цьому навіть усадка продукту при сушінні мінімальна, через що при додаванні води можна легко відновити структуру продуктів, які в процесі сублімації набувають пористу структуру.

Процес ліофілізації складається з попереднього заморожування препарату, первинного висушування, досушування, закупорювання ампул (флаконів), пакетів з висушеним препаратом. Для збереження вихідних властивостей препаратів або високої життєздатності мікроорганізмів в процесі ліофілізації і подальшому зберіганні використовують різні захисні середовища (стабілізатори). Попереднє заморожування матеріалу проводять в морозильних камерах при  $t$  від  $-40$  до  $-60$  °С. Заморожений матеріал в ампулах або флаконах швидко переносять в сушильну камеру (субліматор), в якій створюється глибокий вакуум і підтримується знижена температура (до  $-40$  °С). В результаті сублімації вільна вода видаляється з поверхні замороженого матеріалу, препарат переходить з твердого (замороженого) стану в сухе (пориста маса, майже не змінена в обсязі). Досушування об'єкта проводять в цій же камері при  $t$  до  $20$  °С і вище. При цьому з препарату видаляється зв'язана вода. Після закінчення ліофілізації вакуумний насос вимикають і в камеру через фільтр подають стерильне сухе повітря або азот.[39,40]

У дипломній роботі розробляється технологія отримання сухого концентрату мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій. Готовим продуктом є сухий концентрат мурамілпептидів у вигляді порошку, який планується реалізовувати в якості сировини або напівпродукту у фармацевтичному виробництві та харчовій галузі. Вимогами готового продукту є вміст вологи у межах 5-7 %, збереження корисних властивостей та відсутність сторонньої мікрофлори.

Розраховуємо сублімаційну сушилку СС-1.2

Параметри для розрахунку сублімаційної сушилки:

ДИПЛОМНИЙ ПРОЕКТ

Арк.

- температура полиць - 40 °С;
- температура сушіння 45-80 °С;
- час заморожування 18 год;
- кінцева температура матеріалу 25 °С;
- швидкість нагрівання на етапі сушки 4 – 6 °С/год;
- загальний час вакуумного зневоднення 20 год;
- кількість продукту до сушіння 1800 г;
- кількість продукту після сушіння 300 г;
- початкова вологість продукту 30 %;
- кінцева вологість продукту 5-7 %;
- насипна щільність продукту 700

1. Розраховуємо кількість видаленої вологи за формулою:

$$W = G_1 - G_2, (3.1)$$

де  $G_1$  – початкова маса продукту;  $G_2$  – кінцева маса продукту

$$W = 1800 - 300 = 1500 \text{ г.}$$

2. Розрахунок площі полиць.

Розраховуємо площу завантаження продукту за формулою:

$$F_{\Pi} = \frac{G_1}{\rho \cdot h_m}, (3.2)$$

де  $\rho$  – насипна щільність продукту

$h_m$  – висота шару матеріалу (приймаємо 0,001 – 0,01м)

$$F_{\Pi} = \frac{1,8}{700 \cdot 0,01} = 0,25 \text{ м}^2$$

Поверхня теплообміну. Розраховуємо кількість теплоти на процес сублімації за формулою:

$$Q_{сб} = 0,9 \cdot W \cdot r_{сб}, (3.3)$$

$$Q_{сб} = 0,9 \cdot 1,500 \cdot 2758 = 3723,300$$

де  $r_{сб}$  – теплота сублимації = 2758000 Дж/кг.

Розраховуємо кількість теплоти на видалення залишкової вологи за формулою:

$$Q_{об} = 0,1 \cdot W \cdot r_{п}, \quad (3.4)$$

$$Q_{об} = 0,1 \cdot 1,500 \cdot 2277 = 341,550$$

де  $r_{п}$  – теплота пароутворення = 2277000 Дж/кг

Розрахуємо витрати тепла на сушіння за формулою:

$$Q = (Q_{сб} + Q_{об})/\tau, \quad (3.5)$$

$$Q = (3723,300 + 341,550)/72000 = 56,000 \text{ Вт}$$

де  $\tau$  – час сушіння, с

Розраховуємо поверхню нагрівання сублиматора за формулою:

$$F = \frac{Q}{k \cdot 4,9 \cdot \varepsilon_{пр} \left[ \left( \frac{T_1}{100} \right)^4 - \left( \frac{T_2}{100} \right)^4 \right] H}, \quad (3.6)$$

$$F = \frac{56,000}{1,2 \cdot 4,9 \cdot 0,87 \left[ \left( \frac{273 + 40}{100} \right)^4 - \left( \frac{273 - 10}{100} \right)^4 \right] H}$$

$$= 0,220 \text{ м}^2$$

Площа поверхності нагрівання сублимаційної сушилки є більшою ніж розрахована площа вище, тому така сушильна камера задовольняє вимогам і може забезпечити необхідну продуктивність у технологічній лінії виробництва сухого концентрату мурамілпептидів.

## 4. БЕЗПЕКА ТА ЕКОЛОГІЧНІСТЬ РІШЕНЬ ПРОЕКТУ

### 4.1 Охорона праці

Згідно зі ст. 15 Закону «Про охорону праці» така служба обов'язково повинна бути створена на підприємстві з кількістю працюючих 50 і більше осіб у відповідності з Типовим положенням про службу охорони праці. Також має бути розроблено Положення про службу охорони праці цього підприємства, визначено структуру такої служби, її чисельність, основні завдання, функції та права її працівників.[41]

На підприємствах з кількістю працівників менше 50 чоловік функції служби охорони праці можуть виконувати в порядку сумісництва (суміщення) особи, які мають відповідну підготовку. А на підприємствах з кількістю працівників менше 20 для виконання функцій служби охорони праці можуть на договірних засадах залучатися сторонні фахівці, які мають не менше трьох років виробничого стажу і пройшли навчання з охорони праці. Обов'язок роботодавця – затвердити документи, які передбачені ст. 13 Закону «Про охорону праці». Вони повинні встановлювати правила виконання робіт і поведінки працівників на території підприємства, у виробничих приміщеннях, на будівельних майданчиках і робочих місцях. Інструкції та інша документація з охорони праці розробляються на підставі положень законодавства з охорони праці, типових інструкцій та технологічної документації підприємства з урахуванням виду діяльності підприємства і конкретних умов праці на ньому, керівниками структурних підрозділів.

Інструктажі з питань охорони праці. Перед початком роботи нового працівника роботодавець згідно зі ст. 29 КЗпП зобов'язаний проінформувати його під розписку про умови праці, наявні на його робочому місці. У тому числі, про всі небезпечні чи шкідливі виробничі фактори, які ще не усунуто, та про можливі наслідки їх впливу на здоров'я працівника, а також про можливі пільги та компенсації за роботу в таких умовах.

Крім того, при прийнятті на роботу всі працівники повинні за рахунок роботодавця пройти вступний інструктаж, навчання, перевірку знань, первинний інструктаж на робочому місці, стажування і набуття навичок безпечних методів праці. Тільки після цього працівники допускаються до самостійної роботи. Вступний інструктаж проводить спеціаліст з охорони праці, а первинний – безпосередній керівник працівника. Надалі з працівниками повинні проводитися повторні інструктажі (раз на квартал при виконанні робіт підвищеної небезпеки або раз на півріччя), решту позапланові (при зміні правил охорони праці, зміни в обладнанні або при порушенні працівником правил охорони праці) та цільові інструктажі (зокрема, при разових роботах, не пов'язаних зі спеціальністю). Інформація про проведення інструктажів має вноситися до відповідного журналу, завірені підписом як того, кого інструктували, так і того, хто інструктував.

Навчання і перевірку знань з питань охорони праці. Згідно зі ст. 18 Закону «Про охорону праці» працівники, зайняті на роботах з підвищеною небезпекою або там, де є потреба у професійному доборі, повинні щороку проходити навчання і перевірку знань з питань охорони праці. Навчання з питань охорони праці таких працівників може проводитися як безпосередньо на підприємстві, так і іншим суб'єктом господарювання, що займаються таким навчанням. Перевірка знань працівників з питань охорони праці повинна здійснюватися відповідною комісією підприємства, склад якої затверджується керівником підприємства.

Проведення медичних оглядів. Згідно зі ст. 169 КЗпП роботодавець зобов'язаний за свої кошти організувати проведення попереднього (при прийнятті на роботу) та періодичних (протягом трудової діяльності) медоглядів працівників, зайнятих на важких роботах, роботах із шкідливими чи небезпечними умовами праці або таких, де є потреба у професійному доборі. Також він зобов'язаний проводити щорічний обов'язковий медогляд осіб віком до 21 року.

Результати профмедогляду працівників у вигляді результатів фахівців про можливість допуску працівника до роботи заносяться в їх медичні довідки, які повинні зберігатися у роботодавця.

Інформацію про організацію трудових медичних оглядів, а також взірці відповідних бланків можна отримати на сайті Управління Держпраці у Тернопільській області: розділ «Діяльність», підрозділ «Медичні огляди».

Засоби індивідуального захисту. На роботах із шкідливими і небезпечними умовами праці, а також на роботах, пов'язаних із забрудненням або несприятливими температурними умовами, працівникам згідно зі ст. 164 КЗпП має безкоштовно видаватися спеціальний одяг, спеціальне взуття та інші засоби індивідуального захисту (ЗІЗ).

Атестація робочих місць. На підприємствах, де технологічний процес, використовуване обладнання, сировина та / або матеріали є потенційними джерелами шкідливих і небезпечних виробничих факторів, які можуть негативно впливати на стан здоров'я працюючих, повинна проводитись атестація робочих місць за умовами праці. Така атестація повинна проводитись атестаційною комісією, склад і повноваження якої визначаються наказом по підприємству в строки, передбачені колективним договором, але не рідше одного разу на 5 років. Порядок проведення такої атестації передбачений постановою КМУ від 01.08.1992 р. № 442. Відомості про результати атестації заносяться в картку умов праці.

Нещасні випадки. Згідно зі ст. 22 Закону «Про охорону праці» роботодавець зобов'язаний організувати розслідування та вести облік нещасних випадків, професійних захворювань і аварій у порядку, встановленому постановою КМУ від 30.11.2011 р. № 1232. За результатами такого розслідування роботодавець повинен затвердити акт за формою Н-5 та Н-1 (якщо він визнаний пов'язаним з виробництвом).[41]



## 4.2 Екологічна безпеність виробництва

Правовий порядок здійснення господарської діяльності в Україні ґрунтується на обов'язковому дотриманні принципу легітимності її здійснення. Основою цього принципу є безумовне виконання суб'єктом господарювання обов'язків – не завдавати шкоди навколишньому середовищу та не порушувати права та законні інтереси громадян і їх об'єднань, інших суб'єктів господарювання, установ, організацій та органів місцевого самоврядування і держави.

Одним із найголовніших заходів забезпечення екологічної безпеки – є здійснення державного контролю за її дотриманням юридичними та фізичними особами. І це не дивно, оскільки майже будь-яка господарська діяльність здатна, в тій чи іншій мірі, нанести шкоду навколишньому природному середовищу чи здоров'ю населення, яке проживає в районі провадження діяльності.

Реалізація даного контролю здійснюється державою відповідно до Закону України «Про охорону навколишнього природного середовища» від 25 червня 1991 року № 1264-ХІІ, через Міністерство екології та природних ресурсів України (Мінприроди України), його місцеві структурні підрозділи чи державні установи, які знаходяться у його підпорядковані. Відповідно до положень цього закону, будь-які діючі підприємства, установи і організації зобов'язані виконувати основні вимоги екологічної безпеки, які здійснюються шляхом розробки та практичного виконання проектної, нормативно-дозвільної та внутрішньо-регламентної екологічної документації суб'єкта господарювання.

Проектна екологічна документація – це екологічна документація з оцінки впливу на навколишнє середовище (надалі – ОВНС) розробляється підприємствами під час нового будівництва, розширення, реконструкції та технічного переоснащення об'єктів промислового та цивільного призначення. Метою ОВНС є визначення доцільності і прийнятності планованої діяльності і обґрунтування економічних, технічних, організаційних, санітарних, державно-правових та інших заходів щодо забезпечення безпеки навколишнього

середовища. Матеріали ОВНС надаються у складі проектної документації уповноваженим державним органам для експертної оцінки і повинні всебічно характеризувати результати оцінки впливів на природне, соціальне (включаючи життєдіяльність населення) і техногенне середовище (далі – навколишнє середовище) та обґрунтовувати допустимість планованої діяльності.

Нормативно-дозвільна екологічна документація – це офіційні дозволи та позитивні висновки центральних або місцевих органів виконавчої влади, обов’язковість оформлення яких визначено діючим законодавством України при здійсненні господарської діяльності або експлуатації об’єктів з високим або середнім ступенем ризику для навколишнього природного середовища.

При здійсненні господарської діяльності з виробництва особливо небезпечних хімічних речовин; здійсненні операції у сфері поводження з небезпечними відходами, збирання і заготівля окремих видів відходів як вторинної сировини, такий суб’єкт відповідно до положень Закону України «Про ліцензування певних видів господарської діяльності» від 01.06.2000р. №1775-III зобов’язаний в установленому порядку отримати ліцензію на право здійснення такої діяльності на території України у встановленому порядку.

Внутрішньо-регламентної екологічної документації – регламентні документи, які складаються (затверджуються) суб’єктом господарювання самостійно, а обов’язковість наявності їх на підприємстві передбачена вимогами чинного законодавства України.

Безпека підприємства в екологічній сфері - це захист від руйнівного впливу природних, техногенних чинників і наслідків господарської діяльності підприємства. Повені, землетруси, смерчі, зсуви ґрунту, лавини можуть завдати величезної шкоди майну підприємства, здоров’ю працівників. На практиці передбачити природні катастрофи неможливо, однак потрібно вжити всіх заходів, щоб наслідки стихійних лих були мінімальними для підприємства. Техногенні катастрофи виникають унаслідок використання фізично зношених основних засобів, непланованого вимкнення електроенергії або через низьку кваліфікацію і безвідповідальність працівників. Екологічні збитки можуть

істотно впливати на фінансовий стан фірми. Наприклад, такі події, як судовий позов за порушення екологічного законодавства, аварія з екологічними наслідками на підприємстві, спричинюють збитки, які належать до категорії фінансово-екологічних і вимірюються у грошовій формі. Екологічні збитки внаслідок втрати здоров'я працівниками фірми, скорочення обсягів виробництва та реалізації продукції впливають на фінансовий стан фірми дещо повільніше. Такі екологічні збитки, як страждання людей унаслідок втрати здоров'я, не можуть бути виміряні у грошовій формі. Компенсацію за них визначають суб'єктивно. Екологічні збитки фірми можуть бути непокритими або покритими частково. Це вагоме джерело небезпеки для організації.[42]

#### 4.3 Охорона навколишнього середовища

У результаті господарської діяльності саме підприємство може стати джерелом небезпеки для навколишнього середовища. До внутрішніх чинників, які погіршують його екологічну безпеку, належать: помилки, допущені на стадії проектування нових виробів, шкідливих для здоров'я людей, а також на стадії розроблення і впровадження нових технологій; штрафи за забруднення довкілля та незаконно створені звалища тощо.

Екологічна складова полягає в дотриманні чинних екологічних норм, мінімізації втрат від забруднення навколишнього природного середовища. Проблему гарантування екологічної безпеки суспільства від суб'єктів господарювання, що здійснюють виробничо-комерційну діяльність, можна вирішити тільки розробленням і ретельним дотриманням національних (міжнародних) норм гранично допустимої концентрації (ГДК) шкідливих речовин, які потрапляють у навколишнє середовище, а також дотриманням екологічних параметрів продукції, що виготовляється. Підприємства - продуценти добровільно не будуть цього робити, бо такі заходи потребують додаткових витрат на очисні споруди та на відповідні ефективні екологічно чисті технології. Єдиним чинником, що спонукає підприємства до належної екологізації виробництва, є застосування відсутніх штрафів за порушення

національного екологічного законодавства. Рівень екологічної безпеки підприємства може бути визначений як середнє рівнів окремих його факторів: пошкодження ландшафту, енергетичне забруднення середовища, утворення смітників з відходів виробництва, забруднення водного і повітряного середовищ.

Харчові підприємства як чинник екологічної небезпеки залежно від шляхів здійснення негативного впливу на навколишнє природне середовище можуть бути безпечними та небезпечними (агресивними). Небезпечні харчові підприємства не здатні забезпечувати 100% використання ресурсів, часто перевищують норми гранично допустимих викидів (скидів) шкідливих речовин у довкілля, накопичують токсичні відходи. Також на підприємствах харчової промисловості можуть виникати надзвичайні ситуації техногенного характеру, що обумовлюється зберіганням на їх території і використанням у технологічному процесі небезпечних речовин. У такому випадку підприємства є джерелом потенційної екологічної небезпеки. Забезпечення екологічної безпеки на рівні харчового підприємства передбачає управління екологічними ризиками протягом усього циклу існування підприємства відповідно до сукупного ризику екологічних небезпек

Індивідуальний екологічний ризик характеризує екологічну небезпеку в певній точці простору, де знаходиться індивідуум, тобто характеризує розподіл ризику у просторі. Це поняття може широко використовуватися для кількісної характеристики територій, на які мають вплив негативні фактори.

Розрізняють три складові екологічного ризику:

- оцінка стану здоров'я людини і можливого числа жертв;
- оцінка стану біоти за біологічними інтегральними показниками;
- оцінка впливу забруднюючих речовин на людину і довкілля.

Важливою складовою оцінки ризику є ідентифікація небезпек. Основне її завдання полягає у виявленні (на основі інформації про об'єкт, результатів експертизи й досвіду роботи подібних систем) і докладному описі всіх властивих системі небезпек.

За останнє десятиліття у міжнародній практиці були розроблені та впроваджені стандарти щодо вирішення проблем охорони навколишнього середовища та раціонального використання природних ресурсів. До основоположних стандартів у сфері екологічного управління належать стандарти серії ISO 14000, які допомагають зменшити тиск виробничої діяльності на довкілля впровадженням екологічно орієнтованих методів керування.[43]

## 5. НДРС

Молочнокислі бактерії використовують в різних галузях харчової промисловості (молочній, хлібопекарській, пивоварінні, фармацевтиці і т.д.) Існує виробництво сухих (ліофілізованих) препаратів молочнокислих бактерій відомі як закваски для йогуртів, сирів, кефірів.

Поживні середовища - субстрати, які використовуються для культивування в штучних умовах різних мікроорганізмів. Поживні середовища широко застосовують у повсякденному мікробіологічній практиці для отримання мікробних мас.

Живильне середовище, призначена для культивування мікробів, повинна мати оптимальні умови для їх росту і розмноження. З цією метою при створенні поживних середовищ передбачають наявність в них сполук, які є джерелами азоту, вуглецю і водню, набір необхідних іонів у вигляді неорганічних солей. У ряді випадків у середу додають так звані фактори росту, тобто сполуки, які не синтезуються культивованим мікробом (див. Бактеріальні фактори росту). Але наявність у поживних середовищах всіх зазначених компонентів ще не може забезпечити оптимальні умови для росту і розмноження мікробів, так як ці процеси залежать також від фізико-хімічних властивостей середовища. До них відносяться: рН, окислювально-відновний потенціал, в'язкість, вологість та осмотичні властивості.

Якщо поживне середовище відповідає біологічним особливостям мікроба і забезпечує його зростання і розмноження, то її називають оптимальною або повноцінним, якщо в ній не вистачає якогось компонента, необхідного для росту і розмноження мікроба, таке середовище характеризують як дефіцитну. Так як різні види бактерій і навіть штами, що відносяться до одного виду можуть значно відрізнятися один від одного по фізіології і характером обміну речовин, то, природно, що для їх вирощування використовують різні поживні середовища.

Основу поживних середовищ для культивування мікроорганізмів складають джерела вуглецю. Виняткова різноманітність мікроорганізмів

робить число таких з'єднань майже необмеженим, так як, з однієї сторони, існують культури, здатні при здійсненні біосинтезу споживати вуглець тільки з високоорганізованих молекул, наприклад білків і пептидів, а з іншої – більшість бактерій.

Джерелом вуглецю в поживних середовищах служать вуглеводи, спирти і деякі органічні кислоти, джерелом азоту - мінеральні або органічні сполуки. Дуже широко використовують пептони - продукти ферментативного або кислотного гідролізу білків різного походження і являють собою суміш амінокислот та поліпептидів різної складності. Відмінності в амінокислотному і пептидному складі пептонів залежать від властивостей вихідного білка і ступеня його розщеплення. Поживна цінність пептона визначається його амінокислотним і пептидним складом.[20]

Сировиною для виготовлення пептонів служать білки м'яса, риби, дріжджів, казеїн і ін. Поряд з пептонами як джерелами азоту в мікробіологічній практиці застосовують також м'ясну воду, яку для вирощування ряду бактерій частіше готують з м'яса тварин. Для приготування м'ясної води м'ясо звільняють від кісток, сухожилів і жиру і перемелюють на м'ясорубці. Отриманий фарш заливають холодною водопровідною водою (на 1 ч. фаршу 2 ч. води), добре розмішують і залишають на добу в прохолодному місці. М'ясний настій фільтрують через кілька шарів марлі кип'ятять і знову фільтрують через паперовий фільтр, а потім доливають водою до початкового об'єму.

В залежності від властивостей, складу і призначення поживні середовища ділять на групи. За консистенцією розрізняють тверді поживні середовища, напіврідкі і рідкі. Для приготування твердих поживних середовищ найбільш часто використовують агар-агар, що отримується з морських водоростей. Агар-агар є речовиною полісахаридної природи. У воді набухає, утворюючи холодець. Розріджується при  $t^{\circ} 70-100^{\circ}$  і застигає при  $40-50^{\circ}$ .

Напіврідким середовищем є 0,5% агар, м'ясо-пептонний.

До рідких середовищ відносять бульйон м'ясо-пептонний, пептонну воду цукровий бульйон, бульйон Хоттингера, що представляє собою

розведений (в 4-9 разів) м'ясної фільтрат, що піддався ферментативному гідролізу панкреатин містить 0,5-1% кухонної солі.

Поживні середовища бувають прості і складні. Простими середовищами є пептонна вода, м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар, поживна желатину. На основі простих середовищ готують складні (м'ясо-пептонний цукровий бульйон, кров'яний агар, асцит-агар та ін). Складність тієї чи іншої живильного середовища залежить від біологічних особливостей вирощуваної мікроба, а також від цілей дослідження.

До складних поживних середовищ відносять також синтетичні. Своєрідність середовищ цієї групи виражається в тому, що всі їх компоненти є хімічно чистими сполуками, на відміну від раніше згадуваних середовищ.

Лактобактерії надзвичайно вимогливі до штучних поживних середовищ. Для стимуляції їх росту в поживне середовище вносять різні добавки: дріжджовий екстракт, твін-80, дріжджовий автолізат, який містить цінні розчинні форми білка і вітаміни групи В.

Сьогодні виникає проблема з виробництва дешевих компонентів для субстратів. В якості субстратів досліджені відходи харчових виробництв: відходи виробництва крохмалю з картоплі (сокова вода), відходи переробки капусти, вичавки з переробки томатів.

Використання рослинних компонентів може дозволити удосконалити наявні і розробити нові ефективні поживні середовища для молочнокислих бактерій. Перспективність таких середовищ пов'язана, на нашу думку, і з порівняльною оцінкою собівартості рослин і різних продуктів тваринного походження, при використанні їх як основи або компонента поживних середовищ для культивування лактобактерій. Однак перелік поживних середовищ на рослинній основі, на яких можна вирощувати лактобактерії, невеликий.[21]

В цьому плані метою нашого дослідження є розробка нового поживного середовища на основі рослинної сировини, яке повинно, в першу чергу,



відповідати живильним потребам лактобактерій, а також не повинне бути дорогою.

Процеси промислової біотехнології розділяють на 2 групи :

- Виробництво біомаси;
- Отримання продуктів метаболізму .

Основні стадії біотехнологічного виробництва розділяють на операції:

1. Підготовка сировини: біологічно активних добавок, приготування розчину субстрату із заданими властивостями – рН, температура, концентрація.
3. Стадія ферментації, на якій походить утворення цільового продукту .
4. Стадія загального виробничого циклу, на якому з біомаси виділяють цільовий продукт .
5. Приготування товарних форм препаратів.



Рис. 5.1 – Принципова схема біотехнологічного виробництва

Важливішим елементом приготування поживного середовища є дотримання вимог асептики. В залежності від жорсткості прийнятих в цьому

відношенні рішень виявляється необхідність або тільки у створенні заданого значення рН, що пригнічує по сторонніх мікроорганізмів, або у всій стерилізації усіх поданих у біореактор потоків і самого біореактора.

Рідинні потоки стерилізують різноманітними методами, із яких практичний інтерес представляє термічний, радіаційний, фільтраційний і частково хімічний. Самий розповсюджений у промисловості термічний метод стерилізації.

Стерилізація - дуже відповідальний етап приготування поживного середовища. Режим її не повинен змінювати властивості середовищ. Найбільш поширена й ефективна стерилізація за допомогою високої температури в автоклавах під тиском або текучим паром. Зазвичай поживні середовища стерилізують в автоклаві при 1 атм. (120,0 °С) протягом 15-30 хв., в окремих випадках і при обсягах середовища, що перевищують 1 л - протягом 1-1,5 год. Зазначеним способом користуються для стерилізації середовищ, що не містять вуглеводи і нативні білки або інші термолабільні субстанції. При наявності в середовищі термолабільних субстанцій користуються бактеріальними фільтрами або дробової стерилізацією. При стерилізації бульйонних середовищ або середовищ, що містять інші органічні джерела живлення, можлива зміна рН в кислу сторону на 0,1-0,2. Готові поживні середовища зберігають у холодному і темному приміщенні з достатньою вологістю. Довгостроково зберігати поживні середовища небажано: щільні середовища підсихають, а в рідких можливе випадання опадів.

Для стандартизації умов культивування мікробів і полегшення лабораторних робіт застосовують сухі поживні середовища - гігроскопічні порошки, що розчиняються у воді. Перед вживанням такі поживні середовища розчиняють у дистильованій воді і потім стерилізують.

Відділення приготування поживних середовищ на сумісному мікробіологічному виробництві представляє собою, як правило, цех, обладнаний ємностями для зберігання твердих та рідких речовин, засобами їх транспортування і апаратами з перемішувачами для приготування

розчинів, суспензій або емульсії. При цьому поживні солі зберігаються звичайно в твердому вигляді, а приготовані їх суміші з заданим відношенням компонентів виробляються в апараті з мішалкою, куди подаються безпосередньо тверді компоненти у необхідній кількості і далі проводиться їх розчин, або з'єднуються заздалегідь приготовані в спеціальних апаратах розчини кожного або декількох компонентів і виробляється лише їх кінцеве зміщення і гомогенізація.

Рідкі та тверді джерела вуглецю звичайно вводять у вже готове поживне середовище безпосередньо перед ферментацією, так як це ліквідує небезпеку зараження сторонньою мікрофлорою, імовірність якого, звичайно різко підвищується при зберіганні готової поживної суміші.[22]

### **Експериментальна частина**

Наукове дослідження проводили з метою вибору та розробки поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій на основі рослинних субстратів. Також проводили дослідження росту молочнокислих бактерій роду *Lactobaccillus mesem* на обраних поживних середовищах на основі трьох рослинних відварів (капустяний, картопляний, томатний).

### **Етапи проведення наукових досліджень**

1. Вибір та приготування субстратів для вирощування молочнокислих бактерій (зразки відварів: капусти, картоплі, томатів). В першу колбу вносять екстракт капусти, в другу – екстракт картоплі, в третю – томатний екстракт, а в четверту вносять суміш всіх трьох екстрактів (кожного по 16,6 см<sup>3</sup>). Екстракти готували наступним чином: 500,0 г овочевої сировини кип'ятять 30 хвилин в 1 л води.

2. Для забезпечення бактерій джерелом вуглецю в підготовлених екстрактах використовують 10%-розчин глюкози. До відварів з овочів вносять 5% глюкози. Розчини стерилізують 15-20 хв при 100 °С. В стерилізовані та охолоджені субстрати вносять молочнокислі бактерії у вигляді препарату

«Біфідумбактерин». В кожну колбу вносять по 1 см<sup>3</sup> розчину «Біфідумбактерин». Колби закривають пробками і поміщують в термостат з температурою 37°C для активного росту бактерій в поживних середовищах.



Рис. 5.2 – Термостат з екстрактами

3. Дослідження впливу хімічного складу субстрату на ріст молочнокислих бактерій. Контролюють ріст бактерій за зміною в'язкості та ваговим способом (висушуванням). Також в процесі культивування контролюють рН та вміст сухих речовин. Заміри робили на

4. За результатами досліджень обирають вид овочевої сировини в якості компонента поживного середовища.

5. Отримання біомаси молочнокислих бактерій.

Результати досліджень наведені у таблицях 5.1, 5.2, 5.3:

Таблиця 5.1- Вміст сухих речовин в субстратах, %

Назва субстрату	Субстрат без р-ну глюкози та МКБ	Субстрат з 10 %-м р-м глюкози	Субстрат після термостатування $\tau=28$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=48$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=72$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=75$ годин
Капустяний	1	2,1	2,5	3,5	3,5	2,5
Картопляний	0,8	2,5	2,7	3,1	3,0	2,8
Томатний	1,5	3,0	3,2	3,6	2,3	2,0
Суміш трьох екстрактів	1,2	2,1	2,5	3,2	3,0	2,9

За результатами отримано наступні графіки (рис. 5.3):

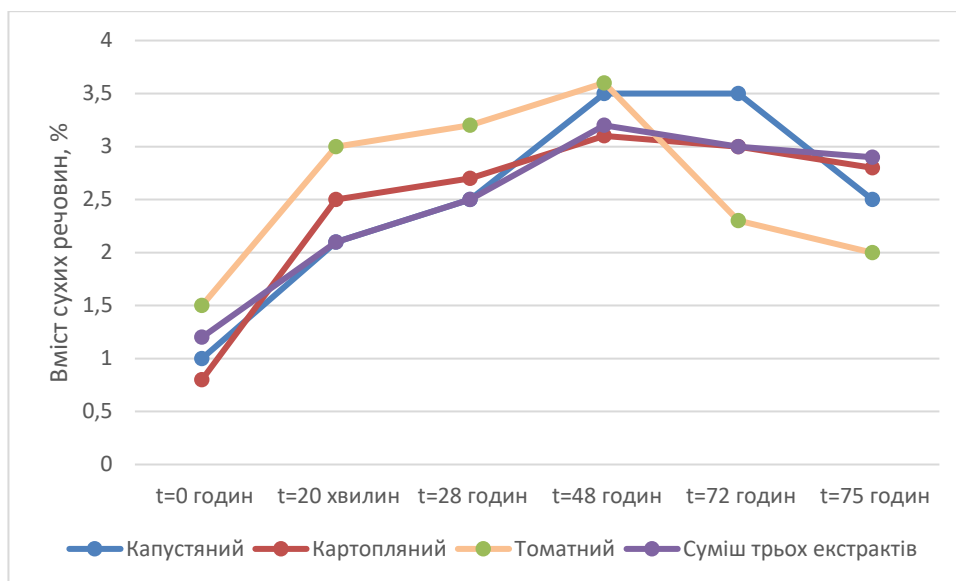


Рис. 5.3 – Зміна вмісту сухих речовин

Середовища повинні мати оптимальну концентрацію іонів водню – рН, тоді мікроорганізми можуть засвоювати всі поживні речовини. В результаті роботи було визначено значення рН після різних термінів термостатування.

Таблиця 5.2 - Значення рН в субстратах

Назва субстрату	Субстрат без р-ну глюкози та МКБ	Субстрат після термостатування $\tau=28$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=48$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=72$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=75$ годин
Капустяний	4,4	4,33	4,22	5,6	4,43
Картопляний	4,5	4,36	4,31	3,94	3,9
Томатний	4,3	4,0	4,0	3,8	3,86
Суміш трьох екстрактів	4,28	4,19	4,0	3,78	3,73

Таблиця 5.3 - Значення в'язкості в субстратах, с

Назва субстрату	Субстрат після термостатування $\tau=28$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=48$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=72$ годин	Субстрат після термостатування $\tau=75$ годин
Капустяний	2,34	4,82	5,87	5,40
Картопляний	5,37	3,50	5,02	4,94
Томатний	5,74	6,02	5,11	4,57
Суміш трьох екстрактів	5,86	4,97	5,04	4,74

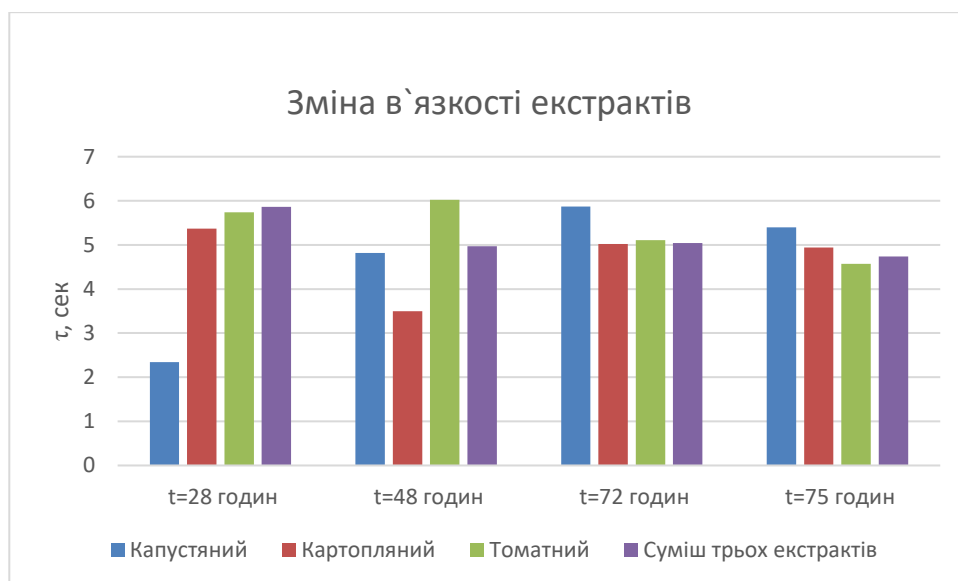


Рис. 5.4 – Зміна в'язкості екстрактів

При висушуванні біомаси були отримані наступні результати (табл. 5.4):

Таблиця 5.4 – Зміна маси субстратів при висушуванні

Назва субстрату	Капустяний екстракт	Картопляний екстракт	Томатний екстракт	Суміш трьох екстрактів
Початкова маса (з фільтром), г	34,01	35,22	42,66	50,71
Кінцева маса (з фільтром), г	28,87	34,51	37,96	47,60
Висушена біомаса, г	5,14	0,71	4,70	3,11

Враховуючі низьку собівартість овочевої сировини, відкриваються широкі перспективи її промислового використання в якості компонентів середовищ для культивування. Найбільший приріст біомаси було визначено при використанні капустяного екстракту. Тому його було обрано в якості

компонента поживного середовища для культивування молочнокислих бактерій.

На другому етапі дослідження культивували молочнокислі бактерії на розробленому рослинному середовищі, яке отримували із рівних частин овочевих екстрактів (суміш томатного, картопляного та капустиного екстрактів брали у співвідношенні 1:1:1) та внесенням сухої культури молочнокислих бактерій. Об'єм суміші трьох відварів по 300 мл склав 900 мл. Для створення оптимальних умов культивування мікроорганізмів додавали 10%-ий розчин фруктози (27 г фруктози/900 мл). При нарощуванні біомаси підтримували рН середовища на рівні 5,2, завдяки введенню  $\text{CaCO}_3$  масою 10 г проводили нейтралізацію.

Дослідження проводили задля отримання біомаси молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus mesem*, проведення автолізу отриманої біомаси та відділення клітинних стінок від автолізу для ферментації мураміна із клітинних стінок.

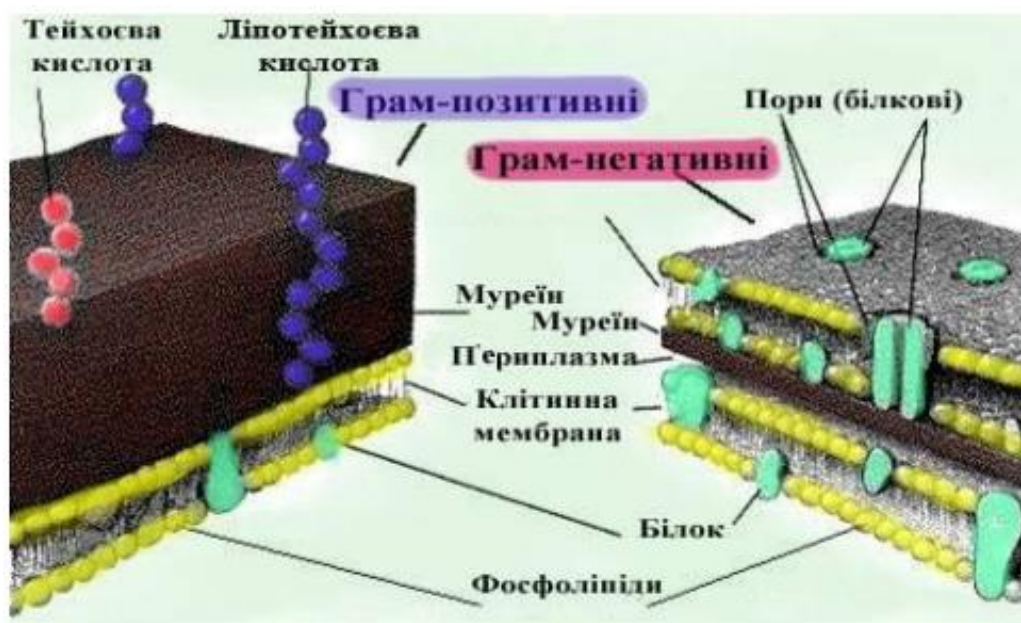


Рис. 5.5 - Будова клітинних стінок Гр(+), Гр(-) молочнокислих бактерій

Із порівняння будов клітинних стінок грампозитивних і грамнегативних молочнокислих бактерій зробили висновок, що доцільно використовувати для переробки грампозитивні бактерії так, як вони мають дуже товстий муреїновий шар на відміну від грамнегативних.[23]

Автоліз — самоперетравлювання, розпад клітин і тканин організмів під впливом їх гідролітичних ферментів. Загальною причиною автолізу для мікроорганізмів будь-якого виду є вичерпання поживних речовин і енергії. Інша загальна причина - накопичення в середовищі росту продуктів метаболізму, токсичних для клітини. Але бувають ситуації, коли культура має достатньо харчування і клітини не виділяють токсичних речовин. Наприклад, цей тип обміну характерний для автотрофно зростаючих бактерій. Однак, цикл розвитку їх культур також завершується автолізом клітин. Спонукальною причиною автолізу в цьому випадку є граничне підвищення рівня позаклітинних ауторегуляторів з функціями аутоіндукторів автолізу.

Порушення цілісності клітини при автолізі починається в місцях переважної локалізації автолітичних ферментів, які беруть участь в процесах розчинення ділянок клітинної стінки при зростанні і розподілі клітини. У грампозитивних бактерій це відбувається в місці утворення перегородки - септи, у грамнегативних - в районі перетяжки. Тут відбувається синтез автолізинів клітинної стінки, їх активація, а також розташовані ділянки стінки, пептидоглікан яких має найбільшу субстратну чутливість до автолізинів.

Автоліз - один з найперспективніших способів дезінтеграції бактерій. Для отримання бактеріальних гідролізатів доцільне використання різних видів мікроорганізмів, що може забезпечити отримання функціональних інгредієнтів з широким спектром біологічної активності. З метою отримання гідролізатів дезінтеграцію бактеріальних клітин доцільно проводити м'яким ферментативним способом з використанням комбінації ферментів протеолітичної (трипсин, панкреатин) і мурамідазної (лізоцим) дії.

Для прискорення процесу автолізу використовують хімічні прискорювачі: солі, спирти, етилацетат.[24]

Параметри процесу бродіння: підтримувалася постійна оптимальна температура 37,8 °С в термостаті. Контролювалося постійне рН 5,5 субстрату та вміст сухих речовин рефрактометричним методом, тривалість бродіння. Дані



умов проведення процесу і контролю за ним наведені в табл. 5.5, на прикладі, використання суміші субстратів.

Таблиця 5.5 – Контроль процесу культивування та автолізу молочнокислих бактерій за показником рН при використанні зміненого середовища

Назва субстрату	Субстрат після термостагування $\tau=24$ годин	Субстрат Після термостатування $\tau=48$ годин	Субстрат після термостагування $\tau=72$ годин	Субстрат після термостагування $\tau=96$ годин	Субстрат після термостагування $\tau = 120$ годин
Капустяний	4,33	4,22	5,6	4,03	3,75
Суміш трьох екстрактів	4,19	4,0	3,78	3,68	3,05

Нарощування біомаси біфідобактерій контролювали по збільшенню біомаси ваговим методом. При досягненні біомаси, суміш центрифугували і використовували для подальшої роботи. Біомасу бактерій піддавали автолізу. Після закінчення автолізу суміш розділили на рідку і тверду фази.

З економічної точки зору автолізат молочнокислих бактерій, який має високий вміст нативних біологічно-активних речовин має перспективи у сучасній промисловості, його можна використовувати при виробництві молочнокислих продуктів, збагачення різних продуктів харчування, а також створення пробіотиків у формі лікарських препаратів і БАД (біологічно-активних добавок) до продуктів харчування. Прикладом випуску автолізату молочнокислих бактерій є препарат компанії під назвою «Нулak forte».

Ступінь руйнації клітин можна визначити вмістом білків в автолізаті рефрактометричним методом або застосовувати мікроскопічний метод. В роботі проводили мікроскопічні дослідження при яких визначали закінчення процесу автолізу 50% руйнації клітин.

Автолізат піддавали центрифугуванню і проводили ферментацію мурамину ферментом лізоцима.

Основний біополімер клітинних стінок біфідобактерій складає муреїновий мішок. Муреїн складається з N-ацетилглюкозаміна і N-

ацетилмурамової кислоти. Для гідролізу ( розщеплення ) полімерного ланцюга використовували фермент лізоцим. Його особливість розщиплювати глікозидні зв'язки між N-ацетилглюкозаміна і N-ацетилмуранової кислотою, при цьому утворюється олігопептид.[24]

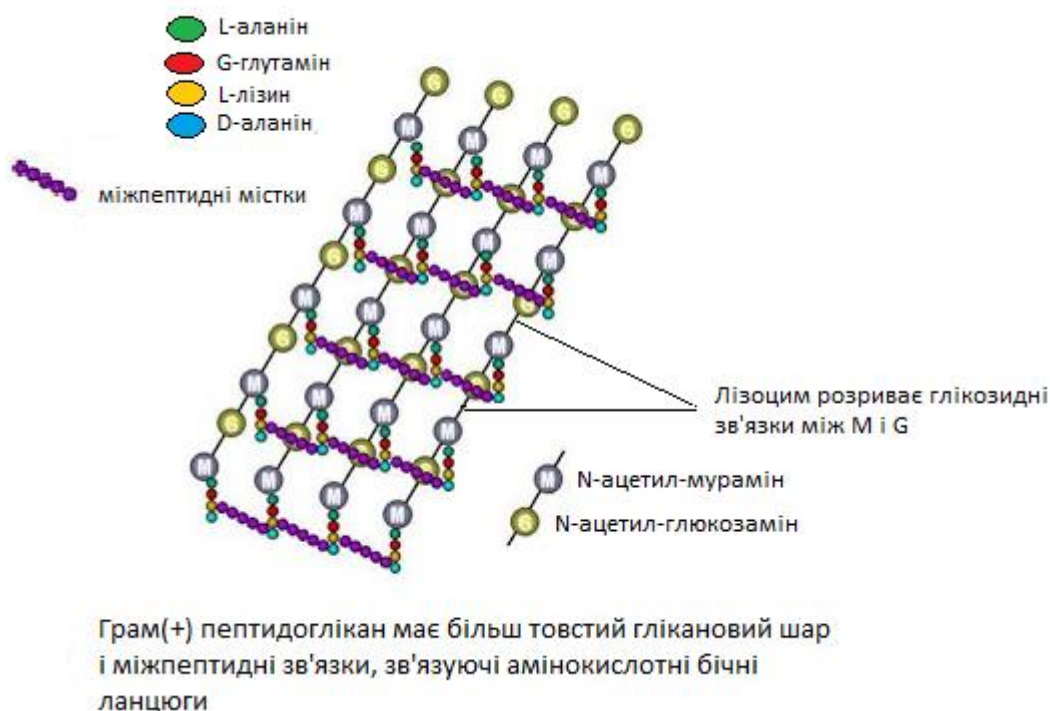


Рис. 5.6 - Схема розщеплення глікозидних зв'язків Гр(+) пептидоглікану  
Лізоцим – це протеолітичний фермент мурамідаса або N-ацетилмурамідклікангідролаза, синтезується фагоцитами, міститься у крові, лімфі, молоці, у великій кількості цей фермент також присутній у білках яєць. Механізм дії: руйнація пептидоглікана клітинної стінки бактерій, що призводить до їх лізису, впливає на фагоцитоз пошкоджених клітин. Лізоцим активує фагоцитоз і утворення антитіл.[25]

Метою була «Розробка біотехнології мурамілпептидів із клітинних стінок *Lactobaccillus mesem*». В таблиці 5.6 наведено розрахунок виходу мурамілпептидів, з отриманих дослідних даних.

Таблиця 5.6 - Розрахунок виходу мурамілпептидів із клітинних стінок молочнокислих бактерій

Назва стадії продукту	Відходи, %	Вихід, г
Біомаса з культуральною рідиною	60 (культуральна рідина)	1000
Автолізат	25	250
Вологі клітинні стінки	–	150
Клітинні стінки з осадом	3 (осад)	120
Висушені клітинні стінки	10 (волога)	20

Перспективою є застосування бактеріальних гідролізатів з вмістом речовин мурамілпептидного ряду в якості функціональних імунотропних інгредієнтів у складі дієтичних добавок і харчових продуктів.

Таким чином науково-дослідна робота підтвердила доцільність використання змінених поживних середовищ, де замість води застосовували овочеві відвари, що зменшувало кількість цукрових речовин та використовували відходи рослинної сировини при переробці.

В технології передбачено комплексну переробку отриманої біомаси молочнокислих бактерій. Так отримані молочнокислі бактерії можна в сухому вигляді реалізовувати для потреб молочно переробних підприємств. А препарати глибокої переробки клітин, зокрема отримання мурамілпептидів із стінок в якості фізіологічно-активної добавки у препаратах профілактичної та лікувальної дії

## СПИСОК ІНФОРМАЦІЙНИХ ДЖЕРЕЛ

1. [http://www.nbuviap.gov.ua/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4227:rinok-likarskikh-zasobiv-v-ukrajini-2&catid=8&Itemid=350](http://www.nbuviap.gov.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=4227:rinok-likarskikh-zasobiv-v-ukrajini-2&catid=8&Itemid=350)
2. [file:///C:/Users/ALLA/Downloads/econ\\_2013\\_6\\_16.pdf](file:///C:/Users/ALLA/Downloads/econ_2013_6_16.pdf)
3. <https://www.krka.biz.ua/pro-krka/generychni-likarski-zasoby/>
4. <http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/original/2007/ilyinskaya2007.pdf>
5. <https://vitamins.in.ua/p597013977-zea-biotik-polnyj.html>
6. <https://www.google.com/search?tbm=shop&sxsrf=ALeKk03MD26>
7. <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/pharm-chas/article/view/3299/3038>
8. Miettinen M., Vuopio-Varkila J., Varkila K. Production of human tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria // Infect Immun. 1996; 64: 5403-5405.
9. Makino S., Ikegami S., Kume A., Horiuchi H., Sasaki H., Orii N. Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 // Br J Nutr. 2010 року; 104 (7): 998-1006.
10. Isolauri E., Juntunen M., Rautanen T. et al. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus Casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children // Pediatrics. 1991; 88: 90-97.
11. Hickson M., D'Souza A., Muthu N. et al. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics : randomised double blind placebo controlled trial // BMJ. 2007; 335: 80-85.

12. Higashikawa F., Noda M., Awaya T., Nomura K., Oku H., Sugiyama M. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial // Nutrition. 2010 року; 26 (4): 367-374.
13. Капустян А. И. Перспективы использования биологически активных бактериальных гидролизатов для нутритивной поддержки населения с расстройствами иммунной системы / А. И. Капустян, Н. К. Черно // Пищевая наука и технология. – 2015. – № 2 (31). – С. 18–25. DOI: 10.15673/2073-8684.31/2015.44263.
14. Chernov, N., Kapustyan, A. (2016), "Immunological properties of the bacterial origin compounds", Food science and technology, No. 10 (3), pp. 19-28. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v10i3.175>.
15. В.С. Мосієнко, М.Д. Мосієнко, В.М. Рябуха – Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології, Київ. /Український хіміотерапевтичний журнал – 2002. - № 1 (13). <http://www.ifp.kiev.ua/doc/journals/uhj/02/pdf02-1/18.pdf>
16. Апетчна техологія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів/ О.І.Тихонов , Т.Г.Ярних; за редакцією лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки, академіка УАН, Професора О.І.Тихонова. – 5-те вид., Вінниця: Нова Книга – 2019. – URL: <http://nk.in.ua/pdf/1785r.pdf>. – Текст: електронний
17. Бурбелло А.Т., Шабров А.В., Денисенко П.П. Современные лекарственные средства. — СПб.–М., 2003
18. <https://symbiter.ua/uk/articles-ua/262-korysni-bakterii-laktobatsily.html>
19. [file:///C:/Users/ALLA/Desktop/%D0%BA/Methodichka\\_Yarullina.pdf](file:///C:/Users/ALLA/Desktop/%D0%BA/Methodichka_Yarullina.pdf)
20. <http://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-kl16.pdf>

21. <https://uk.wikipedia.org/wiki>
  22. <https://studfile.net/preview/5194682/page:4/>
  23. <https://www.slideshare.net/ViktorStabnikov/5-86011835>
  24. <http://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-kl1.pdf>
  25. <https://www.slideshare.net/YuriPenchuk/3-75375896>
  26. <http://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-kl1.pdf>
  27. <https://findpatent.ru/patent/211/2111426.html>
  28. <https://studfile.net/preview/6405391/page:12/>
  29. <https://findpatent.ru/patent/211/2111426.html>
  30. [file:///C:/Users/ALLA/Downloads/Zmzh\\_2010\\_12\\_3\\_45.pdf](file:///C:/Users/ALLA/Downloads/Zmzh_2010_12_3_45.pdf)
  31. <https://findpatent.ru/patent/243/2439144.html>
  32. <https://consumerhm.gov.ua/2-bez-katehorii/259-sistema-analizu-nebezpek-i-kritichnikh-tochok-kontrolyu-haccp>
  33. [https://lifelib.info/microbiology/biotechnology\\_1/6.html](https://lifelib.info/microbiology/biotechnology_1/6.html)
  34. <https://intalent.pro/article/mezhdunarodnyy-standart-gmp-harakteristika-i-oblasti-primeneniya.html>
  35. <https://intalent.pro/article/mezhdunarodnyy-standart-gmp-harakteristika-i-oblasti-primeneniya.html>
  36. <https://intalent.pro/article/mezhdunarodnyy-standart-gmp-harakteristika-i-oblasti-primeneniya.html>
  37. <https://intalent.pro/article/mezhdunarodnyy-standart-gmp-harakteristika-i-oblasti-primeneniya.html>
34. Основы проектирования предприятий микробиологической промышленности/Кантере В.М., Мосичев М. С., Дорошенко М. И. и рд.: - Учеб. Пособие для вузов. – М.: Агропромиздат. 1990. – 304 с.

38. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник/ І. П. Данилов, С. І. Самійленко. – НТУ «ХП», 2008. – 272 с.
39. <https://www.pres88.com.ua/sublimatsionnyye-sushilki/sushilka-sublimatsionnaya-predpriyatiya/>
40. <https://ten24.com.ua/ua/blog/sublimatsionnaya-sushka-produktov>
41. <https://medoc.ua/blog/ohorona-praci-na-pidprimstvi-shho-ma-znati-robotodavec>
42. <https://www.buh24.com.ua/ekologichna-bezpeka-pidpriyemstva-pravove-regulyuvannya/>
43. [https://pidruchniki.com/75699/ekologiya/upravlinnya\\_ohoronoyu\\_navkolishnogo\\_seredovischa\\_pidpriyemstvah](https://pidruchniki.com/75699/ekologiya/upravlinnya_ohoronoyu_navkolishnogo_seredovischa_pidpriyemstvah)

## ДОДАТКИ

Додаток А - Аркуші графічної частини - **6 аркушів:**

- 1 – Характеристика поживного середовища та мікроорганізмів – 1 арк.
- 2 – Схема векторна (блок) з параметрами технол. операцій – 1 арк.
- 3 – План цеху та повздовжні розрізи з технологічними лініями (на одному аркуші) – 1 арк.
- 4 – Монтажний лист обладнання – 1 арк.
- 5 – Результати економічних розрахунків– 1 арк.
- 6 – НДРС – 1 арк.