

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»**

Факультет біотехнології і біотехніки
(повна назва інституту/факультету)

Кафедра промислової біотехнології
(повна назва кафедри)

Дипломний проект

на здобуття ступеня бакалавра

з напрямку підготовки 6.051401 Біотехнологія
(код і назва)

на тему: Технологія виробництва пробіотику з антиоксидантною активністю. Дільниця сушіння.

Виконав: студент 4 курсу, групи БТ-21
(шифр групи)

Кожемякіна Олександра Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові) _____ (підпис)

Керівник доц., к.б.н. Орябінська Лариса Борисівна
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Консультант Розділ 5 доц., к.т.н. Ружинська Л.І.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали) _____ (підпис)

Рецензент к.б.н., старший викладач Ситнік О.І.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Київ – 2016 року

Актуальність проекту

В наш час можна спостерігати збільшення патології, пов'язаної з порушенням біологічної рівноваги між мікроорганізмами в організмі людини. Профілактика та лікування таких інфекцій вимагає введення лікувальних засобів пробіотичних препаратів з метою відновлення кількісного та якісного складу нормальної мікрофлори кишечника. В даний час одним з перспективних напрямів біотехнології є пошук нових штамів молочнокислих бактерій для створення пробіотичних препаратів і продуктів функціонального харчування. Була проведена велика кількість дослідів, які підтвердили, що деякі штами *Lactobacillus*, а саме *Lactobacillus plantarum* *MTCC 2621*, здатні гідролізувати таніни з утворенням високоактивного оксиданту – галової кислоти. Отже, такий штам цілком може бути використаним і як продуцент пробіотиків нового покоління, що має антиоксидантну дію, і в якості функціональної складової продуктів харчування до складу яких входять таніни. У зв'язку з цим, вивчення біологічних властивостей штаму та втілення його у виробництво є актуальним завданням.

Мета

Метою даної роботи є проектування та розробка виробництва пробіотику, параметри якого забезпечуватимуть максимальний вихід препарату, високу економічність виробництва, простоту технології, високу якість готової продукції, а також мінімальний негативний вплив на навколишнє середовище.

Завдання

1. Обґрунтувати вибір штаму *Lactobacillus plantarum* *MTCC 2621*, охарактеризувати властивості, що відрізняють даний пробіотик від інших.
2. Навести біохімічні основи виробництва.

3. Обрати технологічну та апаратурну схеми виробництва пробіотику, навести матеріальний баланс стадії отримання ліофілізованого продукту, контроль виробництва та описати технологічний процес.
4. Обґрунтувати вибір сублімаційної сушарки для проведення процесу сушіння пробіотику. Провести технологічний та конструктивний розрахунки сушарки, що підтверджують надійність та працездатність апарату.
5. Провести аналіз небезпечних та шкідливих факторів виробництва пробіотику, наведено основні вимоги з техніки безпеки та охорони праці

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО ПРОДУЦЕНТА

На даний час вивчено велику кількість мікроорганізмів, які широко застосовуються в складі пробіотичних препаратів і продуктів харчування. Основними критеріями є безпека і виражені пробіотичні властивості. Згідно з рекомендаціями експертів Управління по контролю якості харчових продуктів і лікарських препаратів США (Food and Drug Administration), визнаний безпечним і дозволений до застосування в складі пробіотиків таким штам як *Lactobacillus plantarum*.

В технології, що розробляється, в якості продуцента використовується пробіотичний штам *Lactobacillus plantarum* MTCC 2621 з колекції мікроорганізмів та банку генів Інституту мікробних технологій, Індія.

Lactobacillus plantarum MTCC 2621 - вид грампозитивних анаеробних неспороутворюючих молочнокислих бактерій. Штам представляє собою непатогенні вигнуті палички неправильної форми з прямими або дещо вигнутими кінцями. Розмір - 0,5-1,2 x 1,0-10,0 мкм, діаметр 0,6 мкм. Вони є облігатною флорою з вираженим поліморфізмом. Розміщуються безладним скупченням або окремими короткими ланцюгами. Є нерухомими, проте в рідкісних випадках - рухливі. Капсул, слизових шарів, чохлів, спор та інших морфологічно диференційованих структур не утворюють. Колонії округлі, дрібні, діаметром 2-5 мм, поверхня гладенька, край зубчастий, колір – білі або сіруваті.

Досліджуваний штам має складні харчові потреби. Виділення штаму здійснюється на щільному поживному середовищі МРС, що містить 0,2% танінової кислоти. Оптимальна температура росту бактерій - (37 ± 1) °С. . Необхідний рівень рН - (4,5-6,2).

Тип живлення – хемоорганотрофи. По відношенню до кисню – факультативні анаероби. Метаболізм бродильного типу, є гетероферментативними молочнокислими бактеріями. Кінцевим продуктом метаболізму лактобацил є D- і L-молочна кислота. Штам є каталазо- та цитохромоксидазонегативним.

L. plantarum МТСС 2621 проявляє стійкість щодо всіх антибіотиків пеніцилінового ряду (крім ампіциліну), до ряду фторхінолонів (крім офлоксацину), до представників групи аміноглікозидів - гентаміцину, неоміцину та канаміцину. Але до стрептоміцину штам чутливий.

Екологічні ніші, що відповідають потребам штаму, - ґрунт, епіфітна мікрофлора, різні біотопи організму людини і тварин.

РОЗДІЛ 2.БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

Кінцевий продукт представляє собою біомасу живих бактерій виду *Lactobacillus plantarum* МТСС2621, що ліофільно висушені у захисному середовищі, що являє собою сахарозно-желатинове середовище.

Характерною відмінністю даного виду є наявність специфічного ферменту таназу. Таназу гідролізує таніни, зменшуючи їх концентрацію, Фермент чинить послідовну дію, в результаті чого відбувається деградація танінів з подальшим гідролізом складних ефірних зв'язків з вивільненням галової кислоти, що є потужним антиоксидантом. Галова кислота декарбоксилюється і, зрештою, входить в цикл трикарбонових кислот.

Пробіотики впливають на шлунково – кишкову екосистему, стимулюють імунні механізми слизової оболонки та неімунні механізми через антагонізм чи суперництво з потенційними патогенами.

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

Нуклеоїд бактерій *L. plantarum* представлений кільцевою замкнутою хромосомою, включає 3,009 генів, вміст нуклеотидів G-C складає 44,5%. Розмір геному: $3,31 \times 10^6$ п.н. Встановлено біологічні функції приблизно 70% генів. Геном бактерій містить певну кількість позакромосомних ДНК: інсерційні послідовності і плазмиди різноманітної молекулярної маси. Геном *L. plantarum* кодує всі необхідні ферменти, потрібні для бродіння, для обох шляхів ферментації. Хромосома кодує більше 200 позаклітинних білків, більшість з яких приймають участь у зв'язуванні з клітинною оболонкою. Велика кількість генів також кодує транспорт та метаболізм цукрів, в той час як інша частина кодує позаклітинні функції.

У даній роботі використовується продуцент, що відбирається за двома критеріями: антагонізм щодо патогенних мікроорганізмів, тобто продукція антимікробних субстанцій та синтез ферменту танази.

Створення високопродуктивного пробіотичного штаму з продукуванням танази проводиться з використанням саме індукованого мутагенезу

РОЗДІЛ 4.ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

Кінцева лікарська форма – порошок, що являє собою мікробну масу живих, антагоністично активних штамів *L. Plantarum* МТСС 2621, ліофілізовану в середовищі культивування, що являє собою захисне сахарозо-желатинове середовище. Одна доза містить не менше $2 \cdot 10^9$ КУО лактобактерій.

Технологічний процес складається з таких стадій: ДР1.Санітарна підготовка виробництва, ДР 2.Підготовка обладнання та комунікацій, ДР3.Підготовка вентиляційного повітря для класів В,С,D, ДР4.Підготовка води очищеної та води для ін'єкцій, ДР5.Приготування поживних середовищ МРС-1 та КД-5 ДР6.Приготування середовища висушування, ТП7.Отримання маточної культури I та II генерації, ТП 8.Отримання виробничої генерації (III генерація), ТП9.Змішування виробничої культури з середовищем висушування, ТП10.Стерильний розлив виробничої культури,

ТП11.Отримання ліофілізованого напівпродукту, ТП 12.Контроль якості готового препарату, ТП 13.Закупорка флаконів гумовими пробками та обтиснення їх алюмінієвими ковпачками, ПМВ14.Пакування, маркування, відвантаження готового продукту, ЗВ15. Знешкодження відходів та викидів.

Біосинтез здійснюється методом глибинного культивування в ферментарах, поживне середовище – казеїново-дріжджове, культивування здійснюють протягом 8-10 годин, температура в апараті підтримується на рівні ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$), рН - 6,0-6,5.

При ліофільному висушуванні касети з виробничою культурою лактобактерій завантажують в установки глибокого заморожування, установку охолоджують до температури ($-58..-60$) $^{\circ}\text{C}$. Сушку здійснюють при наступних параметрах: величина вакууму: 13,3 Па, температура полиць та продукту на полицях: ($-34..-36$) $^{\circ}\text{C}$. Обладнання – сублимаційна сушарка.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Сублимаційна сушарка була вибрана, оскільки сушка сублимацією є найкращим методом якісного консервування при виробництві цілого ряду нових лікарських засобів, що містять речовини біологічного походження, а використання термолабільних речовин для приготування багатьох вискоєфективних препаратів біологічного походження неможливо без збереження їх нативних властивостей. В роботі спроектовано сублимаційну сушарку, що виготовлена з сталі 12X18H10T, що є стійкою до корозії.

Як загальнозаводське допоміжне обладнання обрано вакуум-насос ВН-494 (пластинчасто-роторний).

Описано техніку безпеки та охорону праці. Вміст специфічних речовин в вентиляційних викидах і стічних водах обумовлені втратами і не перевищують значення санітарно – гігієнічних нормативів (ГДК, ОБУВ), обумовлюючих чистоту водяного та повітряного басейнів. Характеристика відходів свідчить про екологічну відповідність виробництва пробіотику екологічним нормам

Висновки.

Згідно з затвердженим завданням у даному дипломному проекті представлена та спроектована технологія виробництва пробіотику з антиоксидантною активністю.

1. Обґрунтовано вибір штаму-продуценту *Lactobacillus plantarum* МТСС 2621, що володіє високими пробіотичними властивостями та характерною антиоксидантною активністю, що відрізняє даний пробіотик від інших.
2. Наведено біохімічні основи виробництва, що полягають в утворенні продуцентом антиоксиданта галової кислоти при розкладі танінів за допомогою ферменту танази.
3. Обрано технологічну та апаратурну схеми виробництва пробіотику, наведено матеріальний баланс стадії отримання ліофілізованого продукту.
4. Обґрунтовано вибір сублимаційної сушарки для проведення процесу сушіння пробіотику. Проведено технологічний та конструктивний розрахунки сушарки продуктивністю 370кг/цикл, що підтверджують надійність та працездатність апарату.
5. Проведено аналіз небезпечних та шкідливих факторів виробництва пробіотику, наведено основні вимоги з техніки безпеки та охорони праці.