



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

**Віктор СТАБНИКОВ**

“ 01 ” листопада 20 22 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КРАВЧУК Евеліни Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Синтез біомаси *Lactobacillus acidophilus* для виробництва Ацидофіліну

керівник роботи БЕЛЕМЕЦЬ Тетяна Олександрівна, ст. викл., к.т.н.

( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Lactobacillus acidophilus*, цільовий продукт: біомаса, об'єм ферментера 500 л, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
РОЗДІЛ 1. Характеристика заквашувальної композиції для одержання Ацидофіліну. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада Консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.11.2022 – 09.11.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.11.2022 – 15.11.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.11.2022 – 27.11.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	28.12.2022 – 02.01.2023	
5	Специфікація обладнання	02.01.2023 – 09.01.2023	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу	10.01.2023 – 15.01.2023	
7	Контроль виробництва	16.01.2023 – 19.01.2023	
8	Охорона довкілля	19.01.2023 – 20.01.2023	
9	Оформлення пояснювальної записки	20.01.2023 – 23.01.2023	
10	Виконання графічної частини проекту	22.01.2023 – 31.01.2023	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Евеліна КРАВЧУК  
(ім'я та прізвище)

Тетяна БЕЛЕМЕЦЬ  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці виробництва препарату Ацидофіліну на основі біомаси молочнокислої бактерії - *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. Даний продуцент за 36 годин анаеробного культивування синтезує близько 5,14 г/л цільового продукту. В даній роботі враховано потреби населення нашої країни, а тому розраховано потенційне виробництва зазначеного препарату.

Ацидофільна паличка має пробіотичні властивості, чим і привертає увагу до себе. За допомогою використання різних штамів цих бактерій покращується стан мікрофлори кишечника, що забезпечує здоров'я організму, сталість імунної системи, а також гарний настрій людини. Нерідко з різних штамів *L. acidophilus* виготовляють функціональні продукти.

Кваліфікаційна робота складається із 79 сторінки тексту, який включає в себе вступ, 8 розділів, список використаної літератури. Робота містить 55 літературних джерел, 3 рисунки та 15 таблиць. Графічна частина представлена технологічною та апаратною схемами (по 1 листу формату А1).

*Ключові слова:* молочна кислота, молочнокислі бактерії, пробіотики, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, біомаса, ацидофілін.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ .....	3
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАКВАШУВАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ АЦИДОФІЛІНУ .....	8
1.1. Загальна характеристика заквасок.....	8
1.2. Характеристика ацидофільної палички у заквасках.....	9
1.3. Ацидофільні напої .....	11
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА .....	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та середовища для його культивування .....	15
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	19
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	23
3.1. Потреба в Ацидофіліні .....	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва .....	27
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і об'єму ферментера.....	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	29
3.5. Біосинтез цільового продукту.....	31
3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	31
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	34
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	37
4.1. Обґрунтування вибору умов культивування та типу ферментера.....	37
4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для одержання ацидофіліну .....	38
4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	38

4.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища <i>L. acidophilus</i> DSM 20079 .....	41
4.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках .....	44
4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті на 50 л .....	45
4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері на 500 л .....	46
4.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника .....	46
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ .....	49
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ .....	52
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	60
7.1. Карта постадійного контролю .....	60
7.2. Мікробіологічний контроль .....	65
7.2.1 Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ .....	65
7.2.2 Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини .....	66
7.3. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю .....	67
7.3.1. Визначення вмісту глюкози .....	67
7.3.2. Визначення вмісту амінного азоту .....	67
7.4. Визначення концентрації біомаси .....	68
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ .....	70
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів .....	70
8.2. Характеристика рідких відходів виробництва ацидофіліну .....	71
8.3. Характеристика твердих відходів виробництва ацидофіліну .....	72
8.4. Характеристика газоподібних відходів виробництва ацидофіліну .....	73
Список використаної літератури .....	74

## ВСТУП

Молочна промисловість – галузь харчової промисловості, що об'єднує підприємства з виробництва молока та різних молочних продуктів. Основна продукція: питне й сухе молоко, вершки, сметана, масло, цільномолочні вироби, молочні консерви, твердий сир, бринза, морозиво, казеїн [1].

Молоко та молочні продукти – це основні продукти харчування, в яких міститься білок, незамінні амінокислоти, мікроелементи, вітаміни та ін. корисні речовини, необхідні для життєдіяльності людини. Вони займають вагоме місце на ринку продовольчих ресурсів і є обов'язковими у структурі споживання населення [1].

Сучасна промислова переробка молока – комплекс взаємопов'язаних хімічних, фізико-хімічних, мікробіологічних, біохімічних, біотехнологічних, теплофізичних та інших трудомістких і специфічних технологічних процесів. Кількість молокопереробних підприємств перевищує 300, проте рівень використання їх виробничих потужностей є незначним і коливається від 25 до 35% залежно від виду продукції [1,2].

Ацидофілін є однією з різновидів кислого молока. Даний кисломолочний продукт отримують шляхом сквашування звичайного коров'ячого молока за допомогою спеціальних бактерій. Така кисле молоко відрізняється в'язкою структурою і характерним різким запахом і смаком [3].

У радянські роки ацидофілін виготовляли в промислових обсягах, сьогодні частіше можна знайти тільки кисломолочні продукти з ацидофільної паличкою. Та й пропонуються вони лише в аптеках. Ацидофілін дуже цінується прихильниками здорового способу життя і правильного харчування – це обумовлено виключно благотворним впливом, яке він справляє на організм [3].

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>			
<b>Змн</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>				
<b>Розробник</b>		<i>Кравчук Е. С.</i>			<b>ВСТУП</b>	<b>Літера</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркушіїв</b>
<b>Керівник</b>		<i>Белемеш Т.О.</i>					6	79
<b>Н. контр</b>								
<b>Консульт</b>								
<b>Зав. каф.</b>		<i>Стабніков В. П.</i>						
						<b>Кафедра БТМ</b>		

Ацидофілін володіє такими дієтичними властивостями [3]:

- всього один стаканчик цього напою здатний утамувати відчуття голоду на кілька годин і містить всього 100 ккал.
- кисломолочний напій приводить в норму апетит і допомагає мінімізувати частоту прийомів висококалорійної їжі;
- продукт здатний прискорювати метаболізм, через що процеси схуднення різко прискорюються;
- напій нормалізує секрецію шлунка, тому їжа нормально засвоюється і не відкладається в жири;
- деякі мінерали і вітаміни, які містяться в ацидофілін, сприяють розщепленню жирової тканини.

Застосовують ацидофілін в різних випадках, як для нормалізації травлення, так і для поліпшення шкіри після дерматологічних захворювань.

Продукт рекомендований до вживання [3]:

- при порушеному дисбактеріозі і проблеми з кишечником;
- при зайвих жирових відкладеннях;
- для людей з проблемами шкіри;
- дітям і вагітним при попередньої консультації.

Отже, актуальністю теми є виробництво ацидофіліну для підвищення розвитку молочної промисловості країни, а також забезпечення потреб споживачів, які люблять та споживають даний напій на регулярній основі.

# РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАКВАШУВАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ АЦИДОФІЛІНУ

## 1.1. Загальна характеристика заквасок

За кордоном закваски, що складаються із мезофільних молочнокислих стрептококів, поділяють на 5 груп: так звані нульові (0), L, D, LD та ароматичні закваски [4].

Нульові закваски містять тільки *Lactococcus lactis* і *Leuconostoc cremoris* або штами одного з цих видів. Селекція штамів цих заквасок спрямована на активне кислотоутворення і мінімальне газоутворення [4].

Закваски L складаються з нульових заквасок, а також *L. cremoris*. Поряд з молочною кислотою закваска виробляє діацетил, ацетоїн, леткі кислоти і CO<sub>2</sub> [1].

У заквасках D крім представників нульової закваски міститься *L. diacetylactis*. Ці закваски виробляють діацетил і ацетоїн у великій кількості, в них більш інтенсивно утворюється вуглекислий газ [4].

Закваски LD складаються з молочнокислих стрептококів, що входять до складу нульових заквасок, а також *L. cremoris* і *L. diacetylactis*. У цих заквасках простежується тенденція *L. diacetylactis* домінувати над іншими мікроорганізмами [1].

Так звані ароматичні закваски складаються з штамів *L. dextranicum*, *Leuconostoc cremoris*, *L. diacetylactis*, що застосовуються для стимулювання ароматоутворення в певних продуктах [4].

Кисломолочні продукти та сири мають різні характеристики, тому при їх виробництві використовують різні культури заквасок. Культури заквасок можуть бути класифіковані відповідно до оптимального температурного інтервалу росту [5]:

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>		
<b>Змн</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ документа</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	9		
<b>Розроб.</b>	<b>Кравчук Е. С.</b>				<b>Літера</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркушів</b>
<b>Керівник</b>	<b>Белемечь Т.О.</b>					8	79
<b>Н. контр</b>					<b>Кафедра БТМ</b>		
<b>Консульт</b>							
<b>Зав. каф.</b>	<b>Стабніков В.П.</b>						

- мезофільні бактерії - оптимальна температура зростання від 20 до 30 ° С;
- термофільні бактерії – оптимальна температура зростання від 40 до 45 °С.

Заквасочні культури можуть бути [5]:

- одноштаммовими, що містять лише один штам бактерій;
- поліштаммовими, тобто сумішшю різних штамів, кожен з яких впливає по-своєму.

Молокозаводи можуть купувати промислові культури у різному вигляді [5]:

- в стані глибокого заморожування висококонцентровані культури в розчинній формі для прямого посіву продукт;
- сублімовані концентровані культури у вигляді порошку для прямого посіву в продукт;
- у стані глибокого заморожування; концентровані культури для отримання виробничої закваски;
- сублімовані концентровані культури у вигляді порошку для одержання виробничої закваски;
- у рідкому вигляді для отримання маткової закваски (нині досить рідко).

Висококонцентровані культури прямого внесення називаються DVS чи DVI.

## 1.2. Характеристика ацидофільної палички у заквасках

*Lactobacillus acidophilum* (ацидофільна паличка). Форма клітин в молоці: довгі і короткі палички розмірами від 3 до 40 мкм, товщиною 1,0- 1,5 мкм. У деяких штамів так само, як і в болгарської палички, в клітинах спостерігається “зернистість” (зерна поліфосфатів). Оптимальна температура росту 37±1 °С.

Молоко згортає за 6-8 год, гранична кислотність молока – 260-280 °Т. Деякі штами утворюють слизистий згусток [4].

Ацидофільна паличка є нормальним представником кишкової мікрофлори людини і теплокровних тварин. Тому вона більш стійкіша до лужної реакції середовища (рН 8,3), наявності у середовищі фенолу (0,3-0,4%), жовчі (20%) [4].

Ацидофільна паличка володіє високою антагоністичною активністю по відношенню до гнильної, умовно-патогенної і патогенної мікрофлори, продукуючи декілька бактеріоцинів: ацидофілін та лактоцидин. У зв'язку з цим *L. acidophilus* належить до цінних пробіотичних культур. Молочнокислі палички даного виду застосовують для приготування ацидофіліну, ацидофільного молока, дитячих кисломолочних продуктів [4].

На загал, закваски на основі штамів ацидофільної палички широко застосовують у різних галузях харчової промисловості, галузях народного господарства та медицини, що зумовлено її пробіотичними властивостями.

Як зазначалось вище, багато штамів *L. acidophilus* входять до групи класичних пробіотиків — мікроорганізмів кишкового походження, регулярний прийом яких у «терапевтичних» дозах справляє достовірну сприятливу дію на життєдіяльність окремих тканин, органів та загальне здоров'я організму споживача [6].

В даний час продовжується розробка нових продуктів з використанням ацидофільної палички. Бідних Б.С., Хохлова І.Ю. та інші при виробництві низькоенергетичного кисломолочного продукту для дитячого та дієтичного харчування для заквашування використовували закваску, що містить ацидофільну паличку, яка дозволяє підвищити біологічну цінність, засвоюваність кисломолочного продукту, органолептичні показники, а також забезпечує симбіоз та життєдіяльність мікроорганізмів [6].

При отриманні м'якого сиру Юрченко Н.А., Мотовилов К.Я., Решетник О.І. як коагулянт використовували молочну сироватку, заквашену бактеріаль-

ною закваскою ацидофільної палички. Це дозволило підвищити харчову та біологічну цінність сиру [6].

Ацидофільна закваска є сумішшю спеціально підібраних у певних пропорціях видів і штамів дріжджів і молочнокислих бактерій, вирощених на цукроварній борошняній заварці. Вона знайшла застосування і в хлібопекарській галузі, у тому числі в технології баранкових виробів [6].

Поландова, Косован та Биковченко застосовували дріжджовий напівфабрикат на основі ацидофільної закваски, отриманий на основі штаму молочнокислих бактерій *L. acidophilus* a-146 та штаму дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Фр-3. Використання такого напівфабрикату підвищує якість баранкових виробів за показниками набухання, крихкості, смаку, запаху, тривалості збереження споживчих властивостей у процесі зберігання [6].

Ацидофільна закваска відрізняється стійкістю до підвищеної температури. До її складу входить 11 летких сполук. Крім метилвмістних сполук у ній ідентифіковані ацетальдегід, ефір мурашиної кислоти, а також пропіонова та мурашина кислоти. Досліджуючи кількісний вміст незамінних та заміненних амінокислот у заквасках, Богатирьова виділяє найвищий рівень амінокислот в ацидофільній заквасці [6].

Згідно з даними науково-технічної літератури, в даний час ацидофільна закваска (з використанням штаму *L. acidophilus*-146) використовують тільки при виробництві пшеничного хліба. Враховуючи склад та властивості даної закваски, інтерес представляє її використання для приготування хлібобулочних виробів з житнього та суміші житнього та пшеничного борошна, а також створення біопрепарату (біоконцентрату) на її основі для дискретних виробництв [6].

### **1.3. Ацидофільні напої**

Ацидофільні напої — кисломолочні продукти, вироблені з пастеризованого молока сквашуванням спеціальними заквасками, складником яких є ацидофільна паличка [7].

Залежно від складу закваски ацидофільні напої поділяють на такі види [7]:

- молоко ацидофільне — кисломолочний продукт, який виробляють сквашуванням пастеризованого молока чистими культурами ацидофільної палички;
- молоко ацидофільно-дріжджове — кисломолочний продукт, отриманий сквашуванням пастеризованого молока чистими культурами ацидофільної палички і дріжджами;
- ацидофілін — кисломолочний продукт, виготовлений сквашуванням пастеризованого молока чистими культурами ацидофільної палички й інших видів *Lactococcus* sp. та закваскою, виготовленою на кефірних грибах.

Ацидофільні напої виробляють з масовою часткою жиру від 0 % до 6 % із таких видів сировини: молока коров'ячого незбираного або знежиреного, вершків, маслянки, а також заквасок, заквашувальних препаратів, бактеріальних концентратів або бактеріальних препаратів прямого внесення на чистих культурах ацидофільної палички; за потреби уводять дріжджі, молочнокислі стрептококи, кефірну закваску [7].

Ацидофільні напої виготовляють сквашуванням пастеризованої нормалізованої молочної суміші за температурних режимів, зумовлених складом заквасок (30–35 °С — для ацидофіліну, 30–32 °С — для ацидофільно-дріжджового молока, 38–42 °С — для ацидофільного молока), резервуарним або термостатним способами з подальшим охолодженням та фасуванням [7].

Мають однорідну, в'язку, тягучу консистенцію, з непорушеним згустком (за термостатного способу виробництва) або порушеним згустком (за резервуарного способу). Смак і запах чистий, кисломолочний, без сторонніх присмаків та ароматів; для ацидофіліну та ацидофільно-дріжджового молока — ледь гострий з незначним дріжджовим запахом [7].

Титрована кислотність ацидофільних напоїв — від 75 °Т до 130 °Т, активна — від 4,7 до 3,9 одиниць водневого показника рН. Кількість життєздатних молочнокислих бактерій в ацидофільному напої масою 1 г має становити не менше  $10^7$  [7].

Масова частка білка в ацидофільних напоях — не менше 2,7 %; їхня калорійність, залежно від умісту жиру, становить 26–80 ккал/100 г [7].

Строки придатності до споживання ацидофільних напоїв [7]:

- не більше 7 діб — для молока ацидофільного;
- не більше 5 діб — для молока ацидофільно-дріжджового та ацидофіліну.

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та середовища для його культивування

Нашим цільовим продуктом є біомаса ацидофільної палички, оскільки вона виступає основним компонентом ацидофіліну. Тому, за цієї причини розглядати інші мікроорганізми ми не будемо, лише штам зазначеної молочнокислої бактерії.

В статті 2013 року основною метою було одержати бета-галактозидазу за допомогою *L. acidophilus* (штам не вказано). Протягом 30 годин культивування вдалось досягти 3,95 г/л біомаси продуцента. Особливу увагу було приділено аеруючим умовам. Крім того, з середовища постійно видаляли лактозу для забезпечення оптимальності умов культивування [8].

В статті 2019 року було оптимізовано умови культивування штаму *L. acidophilus* DSM 20079. Найголовнішим критерієм виявилась концентрація глюкози в поживному середовищі. При кількості в 50 г/л максимальна концентрація на 36 годині культивування склала 5,14 г/л. Також, не малу роль для росту продуцента відіграє дріжджовий екстракт та сульфат амонію [9].

В 2012 році вивчали можливість різниш штамів молочнокислих бактерій використовувати відходи дизельного виробництва, а саме гліцерин, як субстрат. Результати *L. acidophilus* ATCC 4356 були самими найвищими. Після 24 годин культивування концентрація біомаси склала близько 2,11 г/л. Проте, важливо врахувати, що навряд чи можна використовувати таку технологія для кінцевого виробництва закваски [10].

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>			
<b>Змн</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ документа</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА</b>	<b>Літера</b>	<b>Аркуш</b>	<b>Аркушів</b>
Розроб.		Кравчук Е. С.					14	79
Керівник		Белемець Т. О.				<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков В.П.						

В статті 2021 року до стандартного МРС середовища додавали неперетравлювальні вуглеводи. Культивуючи штам *L. acidophilus* ATCC 4356 з додаванням ячменю вдалось одержати 10,02 г/л біомаси. Також, в дослідженні було використано ямс, за його присутності утворилося 8,79 г/л біомаси, часник - синтезував 7,17 г/л, банан - 6,81 г/л, солодка картопля - 4,86 г/л. Як позитивний контроль використовували середовище з глюкозою, на якій концентрація бактеріальної маси становила 4,2 г/л [11].

В тому ж самому році культивуючи той же самий штам (*L. acidophilus* ATCC 4356) на МРС за 12 годин культивування вдалось одержати 2,25 г/л. Варто зауважити, що такого результату вдалось добитись за оптимізації певних параметрів, а саме кількісного складу поживного середовища [12].

В статті 2015 року використовували звичайне, не оптимізоване, середовище МРС та перевіряли ріст трьох штамів ацидофільної палички, а саме *L. acidophilus* ATCC 53672, *L. acidophilus* ATCC 43121, *L. acidophilus* ATCC 4356. Таким чином, за 24 години перший штам синтезує близько 2,5 г/л біомаси. Штам ATCC 43121 має майже таке саме значення, близько 2,2 г/л за 1 добу. Найнижчий показник який нас цікавить становив в останнього штаму та мав значення 1,9 г/л [13].

В статті 2013 року додавання мальтодекстрину до класичного середовища МРС призвело до підвищення кінцевої концентрації біомаси. В дослідженні використовували штам *L. acidophilus* NRRL В-4495. При культивуванні протягом 18 годин на контрольному середовищі ледь вдалось отримати 2,4 г/л біомаси, в той час як на бульйоні з додаванням мальтодекстрину даний показник становив 3,7 г/л [14].

Тож, проаналізувавши літературні джерела останніх десяти років можна стверджувати, що концентрація ацидофільної палички не є сильно високою. Проте, для більш точного аналізу маємо провести порівняння низки параметрів. Загальна таблиця представлена нижче.

## Загальне порівняння продуцентів біомаси ацидофільної палички

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	Література
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	Глюкоза – 50, Дріжджовий екстракт – 20,91, Сульфат амонію – 3,42, лимонна кислота - 0,5, КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> -1, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,4, MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,05, Ацетат натрію – 1, Твін 80 – 1.	36 год, 37 °С, 200 об/хв	5,14	[9]
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Суша молочна сироватка – 40, Дріжджовий екстракт – 4, Ацетат натрію – 5, Сульфат амонію – 2, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,02, Твін 80 – 2.	12 год, 37 °С, анаеробно	2,25	[12]
<i>L. acidophilus</i> NRRL B-4495	Мальтодекстрин – 17; Пептон – 10; М'ясний екстракт – 10; Дріжджовий екстракт – 5; Глюкоза – 20; Твін-80 – 1; С <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> – 2; Ацетат натрію – 5; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O – 0,1; MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O – 0,05; К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> – 2;	18 год, 37 °С, 110 об/хв	3,7	[14]

Найвищою концентрацією володіє штам *L. acidophilus* DSM 20079, проте час його культивування є найдовшим. Найкоротший час має *L. acidophilus* ATCC 4356 та становить 12 годин. *L. acidophilus* NRRL B-4495 має усереднені показники з його потенційними конкурентами.

Оскільки мікроорганізми культивуються на різних середовищах, які мають різний компонентний та кількісний склад, маємо прорахувати умовну вартість зв 1 л кожного.

Таблиця 2.2.

## Вартість поживних середовищ для вирощування біологічних агентів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	Глюкоза – 50	61	3,05	1
	Дріжджовий екстракт – 20,91	132	2,76	2
	Сульфат амонію – 3,42	28	0,09	3
	Лимонна кислота - 0,5	140	0,07	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -1	65	0,07	5
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,4	23	0,01	6
	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,05	30	0,002	7
	Ацетат натрію – 1	92	0,09	8
	Твін 80 – 1	180	0,18	9
	<b>Вартість 1 л середовища ≈ 6,32 грн</b>			
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Суха молочна сироватка – 40	64,40	2,58	10
	Дріжджовий екстракт – 4	132	0,53	2
	Ацетат натрію – 5	92	0,46	8
	Сульфат амонію – 2	30	0,06	7
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,02	23	0,0005	6
	Твін 80 – 2	180	0,36	9
<b>Вартість 1 л середовища ≈ 4 грн</b>				
<i>L. acidophilus</i> NRRL B-4495	Мальтодекстрин – 17	48	0,82	11
	Пептон – 10	570	5,7	12
	М'ясний екстракт – 10	125	1,25	13
	Дріжджовий екстракт – 5	132	0,66	2
	Глюкоза – 20	61	1,22	1
	Твін-80 – 1	180	0,18	9
	Цитрат амонію – 2	120	0,24	14
	Ацетат натрію – 5	92	0,46	8
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O – 0,1	23	0,002	6
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O – 0,05	30	0,002	7
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2	119	0,24	15
<b>Вартість 1 л середовища ≈ 10,77 грн</b>				

Примітка (ціни наведено станом на серпень 2022 року): 1 - <https://prom.ua/p1037611046-dekstroza-glyukoza-podslastitel.html>, 2 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/Rainwood-1600296017151.html?spm=a2700.7724857.0.0.1f3d6a319Ybjma>, 3 - <https://prom.ua/p1420740705-sulfat-amoniya-1kg.html>, 4 - <https://prom.ua/p1286825420-limonnaya-kislota-pischevaya.html>, 5 - <https://prom.ua/p1076954276-monokalijfosfat-izrail-25kg.html>, 6 - <https://prom.ua/p293371290-sulfat-magniya-magnij.html?&primelead=Mi4wOA>, 7 - <https://prom.ua/p663698888-sulfat-margantsa-meshki.html?&primelead=MS42>, 8 - <https://prom.ua/p1480505379-atsetat-natriya-natrij.html?&primelead=MS43NTU>, 9 - <https://prom.ua/p1014894441-polisorbat-tvin.html?&primelead=MS4zNQ>, 10 -

<https://prom.ua/p1660578756-syvorotka-molochnaya-suhaya.html>, 11 -  
<https://prom.ua/p1644035325-maltodekstrin.html>, 12 - <https://prom.ua/p505591948-pepton-fermentativnyj.html>, 13 - [https://www.alibaba.com/product-detail/best-choice-beef-bone-broth-seasoning\\_1600321752449.html?spm=a2700.pc\\_countrysearch.main07.36.771c1e0eN3ekje](https://www.alibaba.com/product-detail/best-choice-beef-bone-broth-seasoning_1600321752449.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.36.771c1e0eN3ekje), 14 -  
<https://prom.ua/p262416040-ammonij-limonnokislyj-zameschyonyjchdaammonij.html>, 15 -  
<https://prom.ua/p1035699008-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>

За розрахунками визначено, найдорожче середовище має останній продуцент порівняння - *L. acidophilus* NRRL B-4495. Найдешевше середовище становить всього 4 гривні, а основним компонентом є молочна сироватка, що дуже здешевило поживний бульйон. Враховуючи минулу таблицю, аналіз завівся в тупік, тому маємо проаналізувати ще декілька параметрів, такі як швидкість накопичення біомаси, а також умовну вартість 1 г цільового продукту.

Таблиця 2.3

### Загальна порівняльна характеристика біологічних агентів

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси, г/л	Умовна вартість 1 г біомаси, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного біомаси за годину, г/год
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	6,32	5,14	1,23	36	0,143
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	4	2,25	1,78	12	0,188
<i>L. acidophilus</i> NRRL B-4495	10,77	3,7	2,91	18	0,21

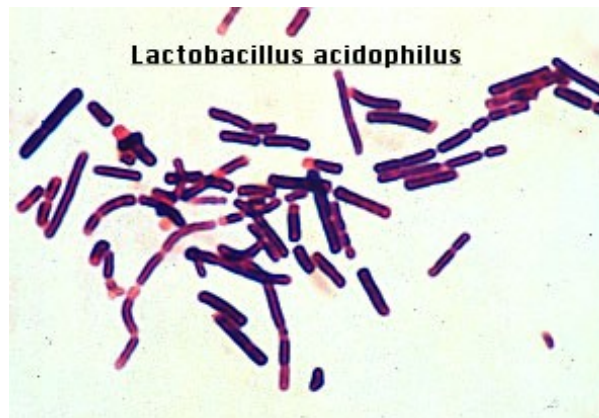
Варто зазначити сильну сторону кожного продуцента. *L. acidophilus* DSM 20079 має найвищу біомасу, а також найменшу вартість з 1 г біомаси. *L. acidophilus* ATCC 4356 має найменший час культивування, а також найнижчу вартість 1 л поживного середовища. *L. acidophilus* ATCC 4356 найшвидше накопичує біомасу, проте умовна вартість біомаси майже в 2 рази дорожче за його конкурентів, що робить даний штам не вигідним.

Пропонується обрати штам *L. acidophilus* DSM 20079 через його низьку вартість. Це є економічно доцільним для економії ресурсів виробництва та забезпечення приємної ціни кінцевого продукту.

Тому, залишаємо наш вибір на цьому представнику молочнокислих бактерій.

## 2.2. Морфолого-культуральні та фіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

За морфологією це грампозитивні палички із заокругленими кінцями (0,6-0,9 x 1,5-6 мкм), які зустрічаються поодинці, парами і в коротких



ланцюжках. Нерухливі (два штами з 89 були рухливими). Неспороутворюючі [15].

Рис. 2.1. *L. acidophilus* пофарбовані за Грамом під світловим мікроскопом [16]

Колонії на триптиказо-глюкозно-агарі жорсткі, з нечіткими контурами, врослають глибоко, мають неправильну форму з радіальними або розгалуженими виступами. Відсутність характерного пігменту [15].



Рис. 2.2. Колонії *L. acidophilus* на середовищах №1 (жовте) та №13 (червоне) [17]

Оптимальна температура росту становить 35-38 °С. Клітини не ростуть при 15 °С. Можуть рости при 45 °С. Змінний ріст при 22 і 48 °С. Оптимальний рН 5,5-6,0. Бактерія може рости при рН 5-7. Факторами росту є наступні речовини: пантотенат кальцію, фолієва кислота, ніацин і рибофлавін [15].

За типом живлення є облігатно гомоферментативними. Гексози зброджуються майже виключно до молочної кислоти шляхом Ембден-Мейєрхофа, пентози або глюконат не ферментуються [15].

Позитивні результати ферментації: целобіози, ескуліну, фруктози, галактози, глюкози, лактози, мальтози, манози, саліцину і сахарози [15].

Негативні результати щодо гідролізу аргініну, гідролізу ескуліну, розщеплення желатину, синтез  $H_2S$ , синтез індолу, лецитинази, ліпази, травлення м'яса, травлення молока, відновлення нітратів, уреазі, ферментація: арабінози, еритриту, глюконату, інозиту, маніту, мелезитози, рамнози, рибози, сорбіту і ксилози [15].

Різні результати для гідролізу крохмалю, бродіння: амідгаліну, глікогену (слабкі реакції), мелібіоза, рафінози, крохмалю і трегалози [15].

*L. acidophilus* виділено з шлунково-кишкового тракту людини і тварин (індики, кури, щури, хом'яки), ротової порожнини людини та піхви. Використовується в їжу як кормова добавка, для досягнення поліпшення здоров'я [15].

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агента

За наукометричною базою даних UniProt молочнокисла бактерія, яка обрана як основний біологічний агент має наступний таксономічний статус [18]:

Царство *Bacteria*

Тип *Firmicutes*

Клас *Bacilli*

Порядок *Lactobacillales*

Родина *Lactobacillaceae*

Рід *Lactobacillus*

Штам *Lactobacillus acidophilus*

На рис. 2.3. Продемонстровано філогенетичне дерево нашого молочного мікроорганізму. На малюку показано розміщення *L. acidophilus* в межах роду *Lactobacillus* [19].

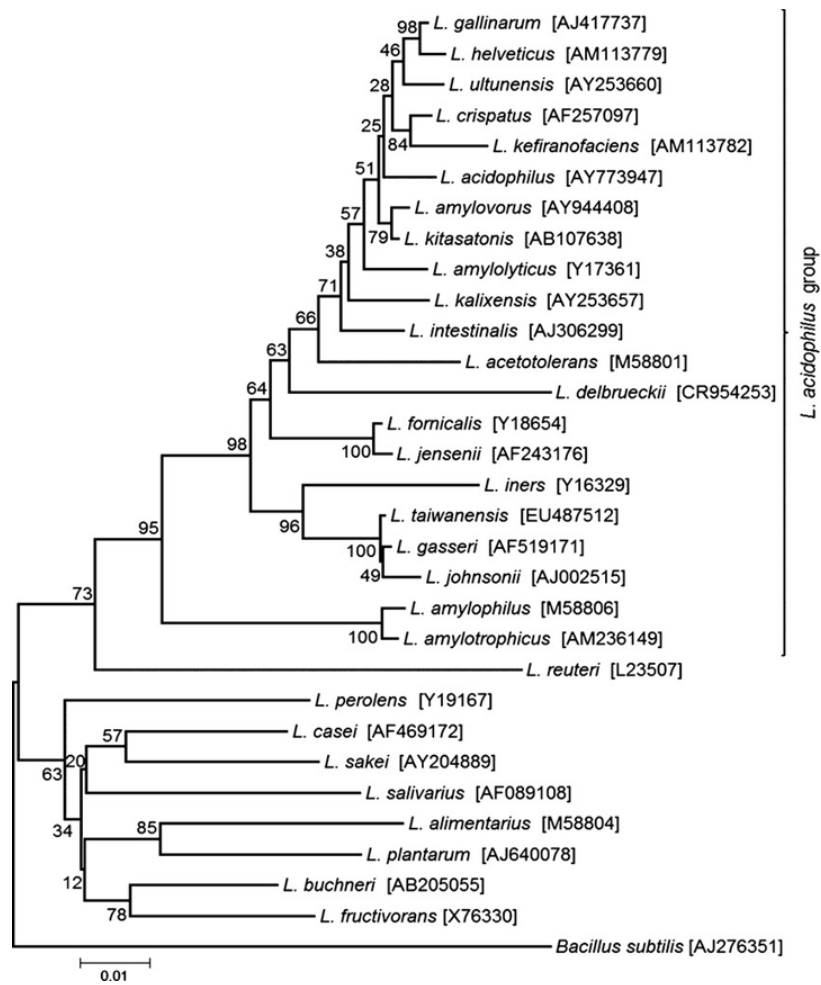


Рис. 2.3. Філогенетичне дерево ацидофільної палички [19]

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба в Ацидофіліні

*L. acidophilus* - це вид бактерій, що живуть у нашому кишечнику. Вони є членом роду *Lactobacillus*, який відіграє важливу роль у здоров'ї людини. Лактобактерії, зокрема й наш біологічний агент, часто використовуються як пробіотики [20].

Міжнародні організації охорони здоров'я визначають пробіотики як "живі мікроорганізми, які, при надходженні в визначених кількостях, надають користь для здоров'я людини. На жаль, виробники продуктів харчування зловживають словом "пробіотик", застосовуючи його до бактерій, які науково не довели свою користь. Це призвело до того, що Європейський орган з безпеки харчових продуктів заборонив слово "пробіотик" на всі продукти харчування в ЄС [20].

Окрім пробіотичних добавок, *L. acidophilus* можна знайти у ряді ферментованих продуктів, включаючи квашену капусту, домашній сир та йогурт. Проте, більшість лактобактерій, що містяться в продуктах присутні в незначних концентраціях. А щільність бактерій в кишечнику складає  $10^{11}$ - $10^{12}$ , тому потрібно досить уважно дивитися на кількість бактерій, що вказана виробником продукту харчування чи дієтичної добавки [20].

*L. acidophilus* як пробіотик нормалізує травлення, зменшує надлишкове газоутворення, усуває неприємний запах з рота. *L. acidophilus* допомагає засвоювати молочні продукти, розщеплюючи лактозу, сприяє кращому засвоєнню кальцію і заліза, підвищує засвоюваність білків. У жінок лактобактерії ацидофільні складають частину захисної мікрофлори піхви і допомагають у боротьбі з грибковою інфекцією [21].

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>					
<b>Змн</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ документа</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</b>					
Розроб.		Кравчук Е. С.						<b>Літера</b>	<b>Аркуш</b>	<b>Аркушів</b>
Керівник		Белемець Т.О.							23	79 24
Н. контр								<b>Кафедра БТМ</b>		
Консульт										
Зав. каф.		Стабніков В.П.								

Ацидофільні бактерії також входять до складу різноманітних заквасок для одержання кисломолочних продуктів. Найкращим прикладом є ацидолакт (ацидофільне молоко). *L. acidophilus* використовується у молочній промисловості разом з *Streptococcus salivarius* і *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* для виготовлення ацидофіліну та інших ацидофільних напоїв [22].

*L. acidophilus* активно подавляють широке коло патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, сприяючи відновленню нормальної мікрофлори людини. Ацидофільні бактерії виділяють ферменти, які сприяють повному перетворюванню білків, жирів та вуглеводів, засвоюванню мікроелементів, продукують незамінні амінокислоти, характеризуються високою здатністю до утворення вітамінів. Ацидофільні бактерії стимулюють утворення власного інтерферону, який грає певну роль у протівірусному та протираковому захисті, продукує значну кількість безпечних для людського організму, однак сильнодіючих антибіотичних речовин [22].

Ацидофільне молоко має комплексну протизапальну дію, активізує процес очищення організму, нейтралізує токсини та побічну дію харчових та лікарських речовин, антибіотиків, поєднується з будь-яким медичним препаратом та харчовими продуктами. Ацидофільне молоко застосовується як самостійний лікувальний продукт, так і у комплексі з іншими лікувальними засобами, підсилюючи їх дію [22].

Одним з основних пунктів користі ацидофіліну є його здатність до ферментативному розщепленню лактози, саме цим обумовлено його легке засвоєння в організмі. Взагалі-то сама по собі лактоза (молочний цукор) не робить шкоди, якщо в шлунково-кишковому тракті людини достатньо виділяється лактази – ферменту, який покликаний перетравлювати молочний цукор. Але при його відсутності виникають симптоми розлади ШКТ: здуття живота, нудота, блювання, діарея. Якщо вживати ацидофілін в розумних кількостях, подібні ситуації будуть виключені [23].

Ацидофільної палички, яка є основою закваски, характерне властивість виділяти антибіотики, які діють пригнічено на патогенні мікроорганізми, що населяють шлунково-кишковий тракт і провокують процеси гниття. В результаті роботи цих природних антибіотиків мікрофлора шлунка і кишечника приходить в норму, самопочуття та стан здоров'я людини в цілому поліпшується [23].

В складі ацидофіліну зазвичай присутній наступний вітамінний склад: вітамін А у формі ретинолу; вітаміни групи В (тіамін, рибофлавін, пантотенова кислота, ціанкобаламін, холін); вітамін С (аскорбінова кислота), вітаміни Н (біотин) і РР (ніацин). Ці бійці невидимого фронту дбають про роботу печінки, нервової системи, головного мозку [23].

Що стосується присутності в цьому кисломолочному продукті макро - і мікроелементів, то можна сказати, що даний напій – просто джерело цих речовин, таких необхідних для нормальної роботи організму людини. Ацидофілін містить: кальцій і калій, фосфор, магній, натрій, сірка, фтор, йод, мідь і ін. Важливий момент: в ацидофілін всі макро - і мікроелементи перебувають у пропорціях, що максимально відповідають потребам організму людини [23].

Ацидофілін часто порівнюють з кефіром. Основна різниця полягає в використовуваних для сквашування мікроорганізмах. У першому випадку використовують коров'яче молоко з додаванням благородних молочнокислих бактерій, у другому – в коров'яче, козяче або овече молоко додають кефірні зерна [3].

Однак, відмінності на цьому не закінчуються. Ацидофільна бактерія краще приживається в людському організмі, а в кишечнику починає продукувати природні аналоги антибіотиків, як це було вказано вище. Кефір, хоч і робить благотворний вплив на травлення, проте не діє проти патогенної мікрофлори, тобто терапевтичний ефект кефіру істотно поступається впливу ацидофільного молока [3].

Ацидофільне молоко, як і ацидофілін, може застосовуватися в харчуванні дітей з раннього віку замість кефіру. Перевагою ацидофільного молока та ацидофіліну є те, що молочнокислі мікроорганізми цих продуктів більш міцно поселяються в кишечнику дитини. Це саме ті молочнокислі мікроорганізми, які завжди є в кишечнику дітей з перших місяців життя при вигодовуванні їх материнським молоком [24].

Головні властивості ацидофіліну [24]:

- Ацидофілін засвоюється організмом людини набагато краще, ніж звичайне молоко, тому цей продукт використовують у лікувальному і дієтичному харчуванні.
- Ацидофільна паличка краще, ніж інші корисні кисломолочні мікроорганізми, що прижилися в кишечнику, пригнічує розвиток гнільних та інших хвороботворних бактерій.
- Ацидофілін відновлює мікрофлору кишечника під час лікування антибіотиками, позитивно впливає на імунну систему та обмін речовин.
- Ацидофілін не такий кислий, як кефір, оскільки він сквашується зовсім не довго — не більше 6-8 годин.
- Ацидофільна паличка виключно життєстійка бактерія, вона не гине навіть під дією шлункового соку. Потрапивши до кишечника людини, паличка витісняє звідти шкідливі мікроби і пригнічує процеси гниття.
- Ацидофілін можна зберігати не довго — близько трьох днів (готовий продукт, не закваску).

Отже, спираючись на характеристику ацидофіліну можна зробити висновок про його потребу для нашого населення через його корисні властивості.

Насправді, в Україні продається не так багато заквасок саме для одержання ацидофіліну. Більша частина припадає на різні ацидофільні продукти. Це каже про те, що ніша має низьку конкуренцію, тому є потенційною ідеєю для бізнес-проекту.

В табл. 3.1. представлено асортимент ацидофільних продуктів, які представлені на ринку України.

Таблиця 3.1

### Ацидофільні продукти

Ацидофільний продукт	Торгова марка	Країна	Кількість закваски на 1 л молока, г	Джерело
Ацидофілін	Zakvasska	Італія	1	[25]
Ацидофільне молоко	Vivo	Україна	0,15-0,5	[26]
				[27]
Ацидофільний йогурт	Іпровіт	Болгарія		[28]
	Genesis			[29]
Ацидофільний кефір	Zakvasska	Італія	1	[30]

Отже, в нашій країні не виробляють закваски саме для виробництва ацидофіліну. В Україні популярності набули напої ацидофільного молока та йогурту. Тому, можемо казати про вільність ніші виробництва нашого цільового продукту.

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

При виробленні ацидофіліну застосовують закваску, що складається з чистих культур ацидофільної палички, молочнокислого стрептококу і кефірних грибків в співвідношенні 1:1:1. Отже, в одному грамі закваски міститься близько 0,33 г ацидофільних паличок [31]. Або, є інша технологія, яка передбачає використання 5 г сухої закваски ацидофільної палички на 1 л молока [3].

За даними держстатистики станом на 2020 рік по всій Україні було реалізовано 126101,7 тон кисломолочних продуктів, куди входить й ацидофілін [32]. Припустимо, спираючись на доволі низьку популярність ацидофільних

продуктів, що кількість нашого цільового продукту серед реалізованих становить близько 5%. Отже, кількість реалізованого ацидофіліну становить:

$$126101,7 * 0,05 = 6305,1 \text{ т або } 6305000 \text{ кг}$$

Відомо, що 1 л молока відповідає 1,03 кг. Отже, для виготовлення зазначеної кількості закваски необхідно:

$$\frac{6305000}{1,03} = 6121360 \text{ л молока}$$

Від цього числа пропонується забезпечити лише 10%, оскільки на ринку представлені й інші виробники заквасок для ацидофіліну. Отже, необхідна кількість молока становить:

$$6121360 * 0,15 = 612136 \text{ л молока}$$

Для виробництва ацидофіліну вноситься 1 г закваски на 1 л молока [25]. Отже, необхідна кількість закваски становить близько 612 кг закваски. При цьому, кількість ацидофільної палички буде наступною:

$$612 * 0,33 = 202 \text{ кг ацидофільної палички}$$

За попередньою курсовою роботою обрано ацидофільну паличку, яка за 36 годин культивує 5,14 г/л біомаси. Тому, кількість культуральної рідини на рік становитиме:

$$\frac{202000}{5,14} = 39,3 \text{ м}^3 \text{ КР}$$

Таблиця 3.2

#### Узагальнені дані

Закваска	Кількість молока, л	Кількість закваски, кг	Кількість ацидофільної палички, кг	Кількість КР, м <sup>3</sup>
Ацидофілін	918210	920	304	59,14

### 3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і об'єму ферментера

Приймаємо, що для отримання  $39,3 \text{ м}^3$  культуральної рідини необхідно 300 робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ). Відповідно кількість культуральної рідини на добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = V_{кр}/T_{рд} = 39,3/300 \approx 131 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ( $V_{крц}$ ):

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф} / 24 = 1,1 \cdot 131 \cdot 43 / 24 \approx 258 \text{ л},$$

де  $T_{цф}$  - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 36 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 31 години.  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1$ ).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 258 л культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 (ферментер без аерації) має становити:

$$V_r = V_{цк}/K_{зап} = 258/0,6 \approx 430 \text{ л},$$

де  $K_{зап}$  – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, вибираємо стандартний ферментер об'ємом  $V_{ф} = 450 \text{ л}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{цк}/V_{ф} = 258/450 = 0,57$$

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують  $V_{кр} = 258 \text{ л}$  культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом з врахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 258/(1-0,1) = 287 \text{ л},$$

де  $E_{ф}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{\text{роб.1}} = 287$  л.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{\text{ф.1}} = 287/0,6 = 478$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 500$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 287/500 \approx 0,574$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією.

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\text{ф}}) = 287/(1+0,1) \approx 261 \text{ л}$$

де  $X_{\text{ф}}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 287 - 261 = 26 \text{ л}$$

Для одержання 26 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%). Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}}/(1-E_{\text{ф}}) = 26/(1-0,1) \approx 28,9 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятору  $V_{\text{ін}} = 28,9/0,6 \approx 48,2$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат  $V_{\text{сін}} = 50$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = V_{\text{роб.2}}/V_{\text{сін}} = 28,9/50 = 0,578$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у дозволених межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}}/(1+X_{\text{ін}}) = 28,9/(1+0,1) \approx 26,3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 28,9 - 26,3 = 2,6 \text{ л}$$

2600 мл посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 2600 / (750 \times 0,2) = 17 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 17 колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 500 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 2 етапи.

### 3.5. Біосинтез цільового продукту

#### 3.5. 1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергію при культивуванні біомаси *L. acidophilus* DSM 20079 є глюкоза. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes катаболізм глюкози відбувається за шляхом гліколізу. Схема біотрансформації представлена на рис.3.3.

Глюкоза, за допомогою глюкокінази (1, КФ.2.7.1.2) переходить в глюкозо-6-фосфат. Ця проміжна речовина під дією глюкозо-6-ізомераз (2, КФ.5.3.1.9) перетворюється в фруктозо-6-фосфат. Сполука перетворюється в фруктозо-1,6-дифосфат під дією 6-фосфотрикарбоксилаткінази (3, КФ.2.7.1.11), після чого трансформується під впливом фруктозо-дифосфат альдолази (4, КФ.4.1.2.13) у гліцераальдегід-3-фосфат. За допомогою гліцераальдегід-3-фосфат дегідрогенази (5, КФ.1.2.1.12) попередня сполука переходить в 1,3-дифосфогліцерат, з якого, під дією фосфогліцерат кінази (6, КФ.2.7.2.3), трансформується в 3-фосфогліцерат. З цієї сполуки утворюється 2-фосфогліцерат, під впливом фосфогліцерат фосфомутази (7, КФ.5.4.2.11), який трансформується в фосфоенолпіруват під дією енолази (8, КФ.4.2.1.11). Сполука трансформується в піруват за допомогою піруват кінази (9, КФ.2.7.1.40). Піруват, в подальшому, залучається до ЦТК та синтезу амінокислот.

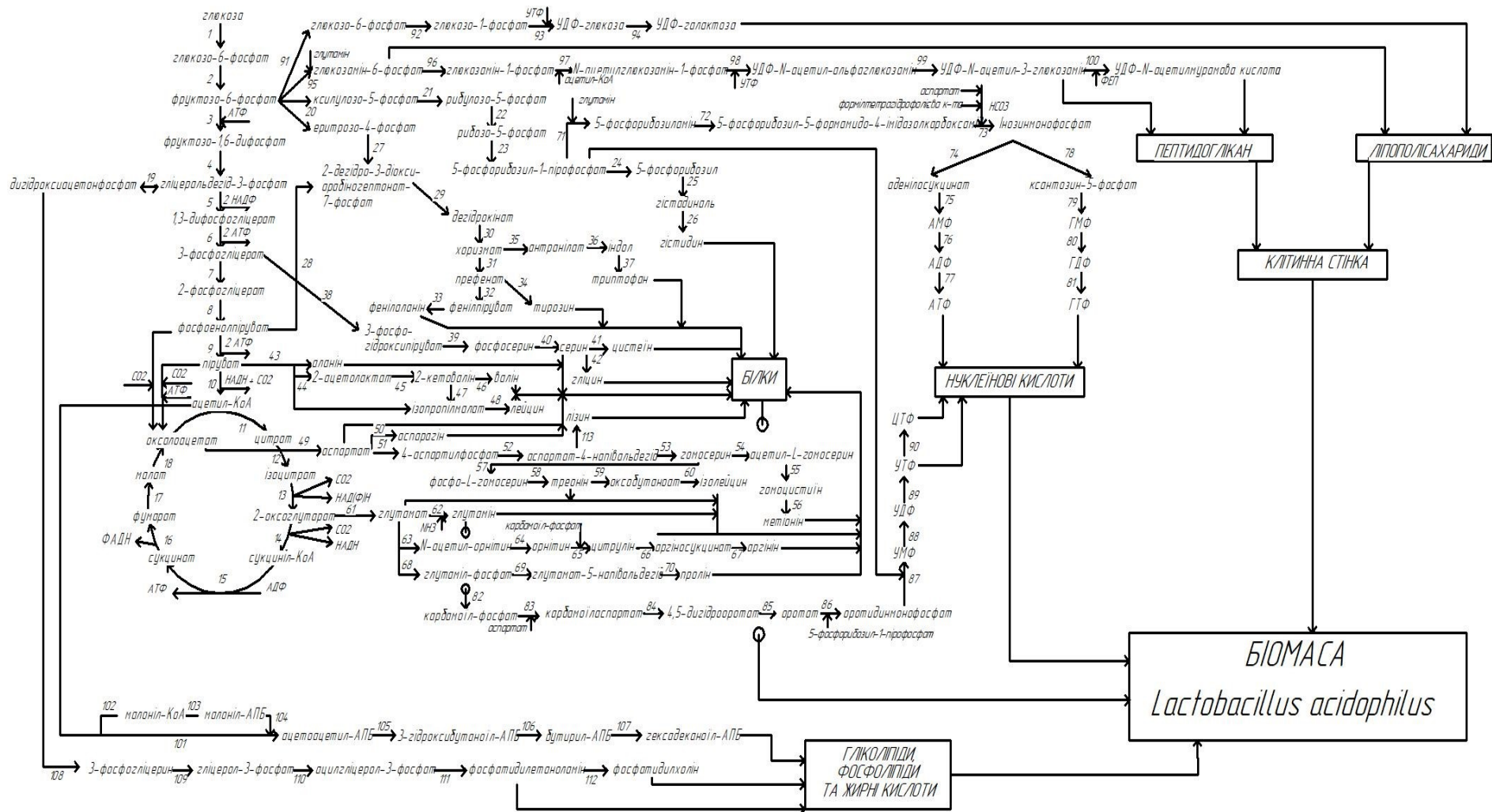


Рис. 3.3. Схема біотрансформації лактози в біомасу ацидофільної палички

### 3.5.2. Біотрансформація ростового субстратуу цільовий продукт

Піруват за допомогою 2-оксоглутарат редуктази (10, КФ.1.2.7.11) перетворюється в ацетил-КоА. В свою чергу, ацетил-КоА, під дією цитрат синтази (11, КФ.2.3.3.1) трансформується в цитрат. Дана сполука взаємодіє із аконітат гідратазою (12, КФ.4.2.1.3) і переходить у форму ізоцитрату. Ізоцитрат трансформується у 2-оксалоглутарат, під дією ізоцитрат дегідратази (13, КФ.1.1.1.42), а потім за впливом 2-оксоглутарат редуктази (14, КФ.1.2.7.11) сполука перетворюється в сукциніл-КоА. Після чого, під дією сукциніл-КоА синтази (15, КФ.6.2.1.4), утворюється сукцинат. За допомогою фумарат редуктази (16, КФ.1.3.5.4) попередня сполука перетворюється у фумарат, який в подальшому, під впливом фумарат гідратази (17, КФ.4.2.1.2), трансформується в малат. Сполука, за допомогою малат дегідрогенази (18, КФ.1.1.5.4) перетворюється у оксалоацетат, чим замикає ЦТК.

#### Утворення амінокислот:

Гістидин: транскетолаза (20, КФ.2.2.1.1.), рибулозо-фосфат 3-епімераза (21, КФ.5.1.3.1), рибозо-5-фосфат ізомераза (22, КФ.5.1.3.6), рибозо-фосфат пірофосфокіназа (23, КФ.2.7.6.1), фосфорибозил трансфераза (24, КФ.2.4.2.17), гістидинол гідрогеназа (25, КФ.1.1.1.23), гістидинол дегідрогеназа (26, КФ.1.1.1.23).

Фенілаланін та тирозин: транскетолаза (20, КФ.2.2.1.1.), трансальдолаза (27, КФ. 2.2.1.2), 3-дезоксид-7-фосфохептуланат синтаза (28, КФ.2.5.1.54), 3-дегідрокінат синтаза (29, КФ.4.2.3.4), 3-дегідрокінат дегідратаза (30, КФ.4.2.1.10), хоризмат мутаза (31, КФ.5.4.99.5), перфенат дегідратаза (32, КФ.4.2.1.51), аспартат амінотрансфераза (33, КФ.2.6.1.1), перфенат дегідрогеназа (34, КФ.4.1.3.1.12).

Триптофан: антранілат синтаза (35, КФ. 4.1.3.27), індол-3-гліцерол фосфат синтаза (36, КФ.4.1.1.48), триптофан синтаза (37, КФ. 4.2.1.20).

Серин, цистеїн, гліцин: 3-фосфогліцерат дегідрогеназа (38, КФ.1.1.1.95), фосфосерин амінотрансфераза (39, КФ.2.6.1.52), фосфосерин

фосфатаза (40, КФ.3.1.3.3), цистатіонін бета-синтаза (41, КФ.4.2.1.22), триптофан синтаза (42, КФ.4.2.1.20).

Аланін, валін, лейцин: аланін-гліюксилат трасаміназа (43, КФ.2.6.1.44), ацетолактат синтаза (44, КФ.2.2.1.6), дигідроксикислотна дегідратаза (45, КФ.4.2.1.9), лейцин дегідрогеназа (46, КФ.1.4.1.9), 2-ізопропілмалат синтаза (47, КФ.2.3.3.13), лейцин трансаміназа (48, КФ.2.6.1.6).

Аспартат, аспарагін, лізин, метіонін, треонін, ізoleyцин: аспартат аміотрансфераза (49, КФ.2.6.1.1), аспартат-аміачна лігаза (50, КФ.6.3.1.1), аспартат кіназа (51, КФ. 2.7.2.4), аспартат-семіальдегід дегідрогеназа (52, КФ.1.2.1.11), діамінопімелат декарбоксилаза (113, КФ.4.1.1.20), гомосерин дегідрогеназа (53, КФ.1.1.1.3), гомосерин О-ацетил трансфераза (54, КФ. 2.3.1.31), цистатіонін-гамма-синтаза (55, КФ.2.5.1.48), гомоцистеїн S-метил трансфераза (56, КФ.2.1.1.10), гомосеринкіназа (57, КФ.2.7.1.39), треонін синтаза (58, КФ.4.2.3.1), L-треонін аміак-ліаза (59, КФ.4.3.1.19), лейцин дегідрогеназа (60, КФ.1.4.1.9).

Глутамат, глютамін, аргінін, пролін: глутамат синтаза (НАДФН) (61, КФ. 1.4.1.13), глютамін синтетаза (62, КФ.6.3.1.2), ацетилорнітиніамін трансфераза (63, КФ.2.6.1.11), аміноацилаза (64, КФ.3.5.1.14), орнітин-карбамоїл трансфераза (65, КФ.2.1.3.3), аргініносукцинат синтаза (66, КФ.6.3.4.5), аргініносукцинат ліаза (67, КФ.4.3.2.1), глутамат-5 кіназа (68, КФ.2.7.2.11), глутамат-5-семіальдегід дегідрогеназа (69, КФ.1.2.1.41), піролін-5-карбоксилат редуктаза (70, КФ.1.5.1.2).

Утворення нуклеїнових кислот: амідифосфорибозил трансфераза (71, КФ.2.4.2.14), аденін фосфорибозил трансфераза (72, КФ.2.4.2.7), ІМР циклогідролаза (73, КФ.3.5.4.10).

АТФ: аденилосукцинат синтаза (74, КФ.6.3.4.4), аденилосукцинат ліаза (75, КФ.4.3.2.2), аденилат кіназа (76, КФ.2.7.4.3), нуклеозид-дифосфат кіназа [77, КФ.2.7.4.6).

ГТФ: ІМР дегідрогеназа (78, КФ.1.1.1.205), GMP-синтаза (79, КФ.6.3.5.2), гуанілат кіназа (80, КФ.2.7.4.8), апіраза (81, КФ.3.6.1.5).

ЦТФ та УТФ: карбамоїл-фосфат синтаза (82, КФ.6.3.5.5), аспартат-карбамоїл трансфераза (83, КФ.2.1.3.2), дигідрооротаза (84, КФ.3.5.2.3), дигідрооротат дегідрогеназа (НАД<sup>+</sup>) (85, КФ.1.3.1.14), уридинмонофосфат синтетаза (86, КФ.2.4.2.10), уридинмонофосфат синтетаза (87, КФ.4.1.1.23), UMP-CMP кіназа (88, КФ.2.7.4.14), нуклеозид-дифосфат кіназа (89, КФ.2.7.4.6), СТР-синтаза (90, КФ.6.3.4.2).

Утворення ліпополісахаридів: глюкозо-6-фосфат ізомераза (91, КФ.5.3.1.9), фосфоглюкомутаза (92, КФ.5.4.2.2), УТФ-глюкоза-1-фосфат уридиліл трансфераза (93, КФ.2.7.7.9), УДФ-глюкоза 4-епімераза (94, КФ.5.1.3.2), глютамін-фруктозо-6-фосфатна трансаміназа (ізомеризуюча) (95, КФ.2.6.1.16).

Утворення пептидоглікану: фосфоглюкозамін мутаза (96, КФ.5.4.2.10), глюкозамін-1-фосфатна N-ацетил трансфераза (97, КФ.2.3.1.157), УДФ-N-ацетил глюкозамін дифосфорилаза (98, КФ.2.7.7.23), УДФ-N-ацетилглюкозамін 1-карбоксивініл трансфераза (99, КФ.2.5.1.7), УДФ-N-ацетилмурамат дегідрогеназа (100, КФ.1.3.1.98)

Гліколіпіди, фосфоліпіди та жирні кислоти:

Гексадеканоїл-АПБ: ацетил-КоА ацилтрансфераза (101, КФ.2.3.1.16), ацетил-КоА карбоксилаза (102, КФ.6.4.1.2), синтаза жирних кислот (103, КФ.2.3.1.85), синтаза жирних кислот (104, КФ.2.3.1.-), 3-оксоацил редуктаза (105, КФ.1.1.1.100), транс-2-деценоїл ізомераза (106, КФ.5.3.3.14), транс-2-еноїл-КоА редуктаза (107, КФ. 1.3.1.38).

Фосфатидилеттаноламін та фосфатидилхолін: триозофосфат ізомераза (19, КФ.5.3.1.1), гліцерол-3-фосфат дегідрогеназа (НАД<sup>+</sup>) (108, КФ.1.1.1.8), гліцерол-3-фосфат дегідрогеназа (НАД(Ф)<sup>+</sup>) (109, КФ.1.1.1.94), гліцерол-3-фосфат-ацил трансфераза (110, КФ.2.3.1.15), 2-ацилгліцерофосфат ацил трансфераза (111, КФ.2.3.1.52), фосфоліпаза D1 / 2 (112, КФ.3.1.4.4).

Доречно зазначити, що *L. acidophilus* DSM 20079 є «метаболічним інвалідом», тому не синтезує деякі амінокислоти. Ці речовини бактерія отримує з поживного середовища, чим компенсує свою неможливість синтезу необхідних сполук.

## **РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ**

### **4.1. Обґрунтування вибору умов культивування та типу ферментера**

Особливістю культивування всіх молочнокислих бактерій є те, що при технологічному процесі всі вони синтезують молочну кислоту, яка зменшуватиме значення рН. Наш біологічний агент досягає найвищих темпів росту в слабнокислому середовищі рН 5,5-6,0, а зростання припиняється нижче рН 4,0. Тому, маємо створити оптимальний рівень рН шляхом приготування титрувальних агентів, Тобто, маємо передбачити 6-% розчин хлоридної кислоти, а також 6-% розчин лугу у вигляді гідроксиду натрію. При чому, лужного титранта маємо передбачити більше, ніж кислотного [19].

Стосовно температурного режиму, штам також має свої особливості. Він оптимально росте від 37 до 42 °С і здатний синтезувати клітини при температурах до 45 °С. Наш продуцент передбачає культивування при 37 °С, що є оптимальним значенням, тому змінювати його ми не будемо [12,19].

За літературними джерелами, швидкість перемішування починається від 110-120 об/хв до 200. Оскільки підготовки аераційного повітря ми не передбачаємо, пропонується обрати 200об/хв.

До речі, такий режим ітенсифікації масообмінних процесів шляхом перемішування також застосовують для ацидофільних паличок [14,34-36].

Температурний режим підпадає під норми росту більшості мезофільних бактерій. Це означає, що технологічна схема виробництва має передбачити асептичність кожного кроку виробництва. Таки крок необхідно робити задля уникнення можливої мікробної контамінації, яка може призвести до хачового отруєння в нашому випадку.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>			
<i>Змн</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ</b>	<i>Літера</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Кравчук Е. С.</i>					37	79
<i>Керівник</i>		<i>Белемець Т. О.</i>				<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Молочнокислі бактерії засівають лише глибинним методом, через їх відношення до кисню. Поверхневий спосіб зазвичай використовують для грибів. Крім того, він має ряд недоліків, які могли б просто зменшити кінцевий вихід бактеріальної маси.

Крім того, оскільки ми маємо справу з молочнокислою бактерією, вимушені застосовувати періодичне культивування. Це пов'язано в першу чергу з виділенням молочної кислоти, яка буде заважати належному процесу культивування.

#### **4.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря для одержання ацидофіліну**

Отже, нами обрано штам *L. acidophilu DSM 20079*. Він являє собою аеротолерантного анаероба, або ж мікроаерофіла. Тому, потреби у підготовці аераційного повітря немає.

Ацидофільна паличка аеротолерантний анаероб, через це немає потреби створення абсолютно анаеробних умов. Також, варто врахувати, що бактерія під час свого культивування буде виділяти вуглекислий газ, який частково буде створювати безкисневі умови.[33].

#### **4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

Очищення і дезінфекція у промисловості є достатньо важливими процесами будь-якого виробничого процесу. Дані процеси можуть мати руйнівні наслідки, якщо не будуть виконані належним чином. Аби провести очищення та дезінфекцію ретельно і ефективно, необхідно мати розуміння видів забруднення або залишків, які необхідно ліквідувати. Вони за своєю природою можуть бути органічними та неорганічними.

Варто відзначити, що очищення і дезінфекція – це два різних між собою процеси. *Ефективне очищення* – це повне видалення забруднень і залишків з поверхонь, після чого вони є візуально чистими, далі йде

наступний етап – *дезінфекція*. Без дезінфекції поверхні будуть чисті від бруду, але мікроорганізми залишаться [37].

Виробництво, транспортування, зберігання, застосування та реалізація дезінфекційних засобів в Україні здійснюються при дотриманні вимог відповідних нормативно-правових документів. Застосування дезінфекційних засобів, не зареєстрованих у встановленому порядку в Україні, а також тих, у процесі виготовлення, зберігання чи транспортування яких було порушено вимоги технологічних регламентів та інших нормативно-правових документів, забороняється.

Теоретичну та методологічну основу для створення високоефективних в цільовому відношенні і безпечних для людей і довкілля дезінфекційних засобів, а також розробки оптимальних технологій їх застосування забезпечує наука *дезінфектологія*. Миючі та дезінфекційні засоби та їх концентрації в робочих розчинах, які слід використовувати для санітарної підготовки приміщень затверджуються наказами МОЗ України [38].

«*Санікон*» – дієвий дезінфікуючий засіб 3 в 1. Ефективно здійснює дезінфекцію, мийку та дезодорує. Миючий дезінфекційний засіб має фунгіцидні (щодо збудників кандидозів та дерматомікозів, а також пліснявих грибів *Aspergillus niger*), бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу) та віруліцидні (включаючи віруси гепатитів В, С, ВІЛ, герпесу, грипу, рота-, корона-, хантавірусів, вірусу «пташиного» грипу H5N1) властивості [39].

Даний засіб не містить альдегідів, фосфатів, активного хлору, кисню та інших агресивних, високотоксичних, летких та екологічно небезпечних компонентів. Засіб дозволено для застосування у присутності пацієнтів та персоналу, який не бере участі у проведенні дезінфекції, не дратує органи дихання та ока [40].

Дезінфекційний засіб «*Санікон*» призначений для санітарної обробки та профілактичної дезінфекції лабораторного, холодильного, торговельного та технологічного обладнання, устаткування, інвентарю, тари, виробничих

меблів. Використовується для миття та дезінфекції (санітарної обробки) різних поверхонь, у тому числі із застосуванням підлогомиїних машин. Засіб підходить для дезінфекції транспорту, що перевозить харчову сировину, готову продукції або напівфабрикати [39].

Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів у концентрації від 0,2 до 5,0% залежно від сфери застосування, мети обробки, виду забруднення, збудника, об'єктів обробки. Норма витрати робочого розчину – 100 мл/м<sup>2</sup> [40].

**Дезеконом** (концентрат) – високоефективний економічний дезінфікуючий засіб на основі композиції четвертинних амонієвих сполук, третинного аміну та бігуанідів.

Характеристики:

- ✓ Ефективна дезінфекція, висока миюча дія.
- ✓ Відмінна сумісність із матеріалами.
- ✓ 3 в 1 = передстерилізаційне очищення + генеральне прибирання + миття і дезодорування [41].

Дезеконом (концентрат) має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу \*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*), вірулецидні (проти оболонкових та безоболонкових вірусів, у тому числі коронавірусів, збудників поліомієліту, гепатитів усіх типів, СНІД герпесу та ін), фунгіцидні (патогенні гриби-збудники кандидозу, дерматомікозів та аспергільоз) властивості. При підвищенні температури розчинів їхня антимікробна активність і миюча здатність збільшуються. (Примітка: \* туберкулоцидна дія досліджена на тест-культурі *Mycobacterium terrae*, що відповідає вимогам ДСТУ EN 14348:2014) [42].

Переваги такого засобу:

- не містить альдегідів, фосфатів, летких та екологічно небезпечних компонентів;
- поєднання дезінфекційної, миючої та дезодоруючої дії;

- ефективність при високому білковому навантаженні (при обробці сильно забруднених об'єктів);
- можливість дезінфекції при скороченій експозиції 5 хв. та експрес-дезінфекції при експозиції 30 секунд (в т.ч. проти бактерій, вірусів гепатитів В та С, збудників кандидозу одночасно);
- можливість багаторазового використання робочих розчинів;
- відсутність фіксуючої дії, що легко змивається, не залишає плям і потік;
- не ушкоджує об'єкти обробки;
- безпека для користувачів, можливість застосування у присутності пацієнтів;
- може бути використаний у системі ротації дезінфікуючих засобів [41].

#### **4.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища *L. acidophilus* DSM 20079**

Основним цільовим продуктом виступає біомаса. Через це, компонентний склад поживного середовища не змінюється, а лише збільшується на кожній стадії підготовки поживного середовища.

Поживне середовище має наступний склад (г/л):

Глюкоза – 50

Дріжджовий екстракт – 20,91

Сульфат амонію – 3,42

Лимонна кислота - 0,5

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -1

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,4

MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,05

Ацетат натрію – 1

Твін 80 – 1

Отже, маємо багатокomпонентний бульйон, який варто поділити на різні композиції через особливості культивування кожної речовини. Але, попередньо відмітимо особливості, які варто врахувати в майбутньому.

Дріжджовий екстракт має високу концентрацію, через що може почати активне піноутворення. Якби ми культивували наш продуцент в анаеробних умовах, використання піногасника було б не обов'язкове. Тобто, при аераційному культивуванні потрібно передбачити піногасник. Середовище також містить твін 80, який і є пінозгашуючим засобом. Тому, додаткового внесення такого роду речовин не потрібно.

Лимонна кислота присутня в доволі низькій концентрації. Проте оскільки це кислота, можуть виникнути суперечки стосовно режиму стерилізації. За літературними даними зазначається, що цю сполуку можна стерилізувати при 121 °C протягом 20 хвилин [43].

Повертаючись до твіну 80, цю сполуку варто стерилізувати окремо та при більш низьких температурах. Закордонні дослідники зазначають, що небажано стерилізувати цей компонент в автоклаві, однак його можна стерилізувати при 105 °C протягом 5 хвилин. Твін 80 дуже в'язкий, тому його буде важко фільтрувати, тобто стерилізувати холодним методом, особливо з фільтрами з малим розміром пор [44].

Глюкозу можна стерилізувати при тих самих умовах, що й дріжджовий екстракт. Умови культивування схожі щодо лимонної кислоти, тому пропонується вмістити ці 3 компоненти в одну композицію.

Середовище також містить солі. Особливу увагу необхідно приділити саме фосфатній, оскільки в присутності катіонів Магнію, які в нас є, вони випадають в осад. У цьому випадку пропонується виділити дигідрофосфатну сіль в окремі композицію, для уникнення цієї небажаної реакції.

Тож, для кожної стадії маємо наступний поділ на композиції:

*Композиція А:* глюкоза, дріжджовий екстракт, лимонна кислота.

Режим стерилізації: 121 °C, 20 хв при 0,01 МПа.

*Композиція Б:* сульфат амонію, сульфат магнію, сульфат мангану, ацетат натрію. Режим стерилізації: 131 °С, 40 хв при 0,15 МПа.

*Композиція В:* ортофосфат калію. Режим стерилізації: 131 °С, 15 хв при 0,15 МПа.

*Композиція Г:* твін 80. Режим стерилізації: 105 °С, 5 хв при 0,05 МПа.

Тепер, маємо розрахувати приблизні об'єми кожної композиції на певні стадії культивування.

#### 4.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Таблиця 4.1.

##### Розрахунок об'єму композицій на стадії вирощування інокуляту в колбах

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,6 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	50	130	А	1000
Дріжджовий екстракт	20,91	54,4		
Лимонна кислота	0,5	1,3		
<b>Вода</b>	<b>815 мл</b>			
Сульфат амонію	3,42	8,9	Б	1000
Сульфат магнію	0,4	1,05		
Сульфат мангану	0,05	0,13		
Ацетат натрію	1	2,6		
<b>Вода</b>	<b>985 мл</b>			
Ортофосфат калію	1	2,6	В	300
<b>Вода</b>	<b>295 мл</b>			
Твін 80	1	2,6	Г	300
<b>Вода</b>	<b>295 мл</b>			

Варто зазначити, що об'єм води ми будемо вимірювати в циліндрах, оскільки дана стадія передбачає приготування композицій в автоклаві. Тому, при перерахуванні води ми усереднюємо значення отриманого об'єму, якби це виглядало в реальних умовах.

Оскільки ми передбачаємо, що дані композиції будуть готуватись в автоклаві через їх низький об'єм, вираховувати концентрат немає потреби. Підготовку композиції А та композиції Б буде проводитись в круглій плоскодонній колбі об'ємом 2 л. Стерилізація композиції В та Г буде проходити в колбах на 0,5 л.

#### 4.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті на 50 л

Таблиця 4.2.

#### Розрахунок об'єму композицій на стадії вирощування інокуляту в посівному апараті на 50 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 26 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	50	1300	А	10
Дріжджовий екстракт	20,91	544		
Лимонна кислота	0,5	13		
<b>Вода</b>	<b>8100 мл</b>			
Сульфат амонію	3,42	89	Б	10
Сульфат магнію	0,4	10,5		
Сульфат мангану	0,05	1,3		
Ацетат натрію	1	26		
<b>Вода</b>	<b>9900 мл</b>			
Ортофосфат калію	1	26	В	3
<b>Вода</b>	<b>3000 мл</b>			
Твін 80	1	26	Г	3
<b>Вода</b>	<b>3000 мл</b>			

Маємо композиції з доволі невисоким об'ємом (композиції А та Б). При тому, що кожна з них містить 10 л об'єму, це не заважає простерилізувати їх в автоклаві, тому застосовувати збірник в даному випадку не обов'язково. В цій ситуації просто необхідно розбити об'єм на 2 колби для стерилізації об'ємом 10 л. Композиції В та Г будуть стерилізуватись в одній колбі (по 1 штуці на кожну композицію) об'ємом 5 л.

#### 4.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері на 500 л

Таблиця 4.3.

#### Розрахунок об'єму композицій на стадії виробничого біосинтезу в ферментері на 500 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 287 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	50	14,4	А	280
Дріжджовий екстракт	20,91	6		
Лимонна кислота	0,5	0,15		
<b>Вода</b>	<b>232 л</b>			
<b>Конденсат</b>	<b>28 л</b>			
Сульфат амонію	3,42	0,28	Б	4
Сульфат магнію	0,4	0,12		
Сульфат мангану	0,05	0,02		
Ацетат натрію	1	0,3		
<b>Вода</b>	<b>3,5 л</b>			
Ортофосфат калію	1	0,3	В	2
<b>Вода</b>	<b>1,7 л</b>			
Твін 80	1	0,3	Г	2
<b>Вода</b>	<b>1,7 л</b>			

Композиція А має дуже вагомні компоненти, а тому її варто готувати в збірнику на 350 л. При цьому було враховано утворення конденсату (близько 10% від загального об'єму) , який також буде впливати на кінцевий об'єм води. Інші композиції можна простерилізувати в автоклаві, оскільки об'єм нашого ферментеру не є дуже високим. Композицію Б варто поділити на 2 колби об'ємом 5 л, а композиції В та Г також простерилізувати в колбах зазначеного номінального об'єму.

#### 4.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Як було зазначено вище, необхідності в піногаснику немає, через присутність в середовищі Твіну 80. Але, варто передбачити титрувальні розчини через синтез молочної кислоти, яка буде зменшувати рівень рН, чим буде впливати на умови біосинтезу біомаси та інгібувати її. Через це,

необхідно передбачити більшу кількість саме лужного титранту, але кислотний агент також має бути присутнім через можливість перетитрування поживного середовища.

Для того, щоб перетитрувати утворену молочну кислоту застосовують аміачну воду. Орієнтовні витрати титрувального агенту становлять 30 мл 25%-го розчину аміаку на 1 л культуральної рідини.

Кислотний титрант у вигляді 6-% HCl пропонується передбачити в перерахунку 1 мл агенту на 1 л поживного середовища. Таке рішення обґрунтовується можливістю перетитрування живильного бульйону. Хоча зараз використовуються автоматичні системи подачі різних розчинів для корекції рН, неможна заперечувати факт можливої некоректної роботи апарату, або просто поломку.

Для колб титранти не передбачуємо. Це пов'язано з малим об'ємом стадії, а також можливістю створення контамінуючих умов під час нарощування біомаси, яка потім буде використовуватись на стадії посівного апарату та виробничого біосинтезу.

Аміачна вода являє собою вже готовий розчин 25%-го розчину аміаку. Її можна закупити вже готовою. Тому, додаткову підготовку цього титранту не передбачуємо. Варто перерахувати необхідну кількість лужного титранту на 1 цикл виробничого процесу.

*Таблиця 4.4.*

#### **Розрахунок кількості лужного агента**

<b>Стадія</b>	<b>Об'єм поживного середовища, л</b>	<b>Необхідна кількість 25-% розчину аміаку, мл</b>
Інокулятор на 50 л	26	780
Ферментер на 500 л	287	8610
<b>Всього</b>		9390

Отже, на 1 виробничий цикл маємо передбачити щонайменше 10 літрів аміачної води.

Також, маємо визначити кількість кислотного титранту для забезпечення потреб нашого виробництва.

Таблиця 4.5.

### Розрахунок кількості кислотного агента

Стадія	Об'єм поживного середовища, л	Необхідна кількість 6-% розчину HCl, мл	Кількість 36-% HCl як стокового розчину, мл	Необхідна кількість води, мл
Інокулятор на 50 л	26	26	4,3	21,7
Ферментер на 500	287	287	47,83	239,17
	<b>Всього</b>	313	52,13	260,87

Тож, для забезпечення нашого виробництва на весь виробничий цикл пропонується приготувати 350 мл кислотного титранта.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки посівного матеріалу, включає такі додаткові стадії:

1. Підготовка стерильного аераційного повітря
2. Приготування та стерилізація поживного середовища для стадій одержання інокуляту в колбах та посівному апараті (середовище готується в автоклаві) та для виробничого культивування в ферментері на 500 л (передбачається збірник для композиції А об'ємом 350 л, інші композиції готуються в автоклаві).
3. Приготування кислотного титрувального агенту для стадій одержання інокуляту в посівному апараті на 50 л та виробничого біосинтезу в ферментері на 500 л. Лужний титрант готувати непотрібно, оскільки його можна придбати вже в готовому стерильному вигляді.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікацію обладнання для виробництва ацидофіліну наведено в табл. 5.1. Номери, зазначені в таблиці, відповідають номерам, що наведені в апаратурній схемі (див. графічну частину).

Таблиця 5.1.

### Специфікація обладнання для виробництва ацидофіліну

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повірозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф- 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр Verfiltan V2 – призначений для грубої фільтрації повітря. Вентиляційний фільтр класу G4. Затримує великі частинки забруднень, таких як: пісок, пил, пух, волокнисті речовини та інші видимі частинки. Матеріал – скловолокно просочене масляними речовинами. Виробник: «Verfiltan» (Україна) <sup>1</sup>
К- 3	Компресор	1	Компресор повітряний Matari M250A18-1. Продуктивність на вході – 320 л/хв. На виході – 250 л/хв. Потужність двигуна – 1,8 кВт. Максимальний тиск – 10 бар. Виробник: «Matari Motors Inc.» (Японія) <sup>2</sup>
Т-4 Т-6	Теплообмінник-охолоджувач Теплообмінник-нагрівач	2	Теплообмінник СТА-4. Матеріал – нержавіюча сталь 316L. Робочий тиск – 25 атм. Максимальна температура нагрівання – 180 °С. Продуктивність до 250 л/хв. Виробник: ООО «НПП «Гермопром» (Україна) <sup>3</sup>
Р-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря Р500. Об'єм: 500 літрів. Робочий тиск – 16 бар. Виробник: ООО «ЭНТЕХ УКРАИНА» (Україна) <sup>4</sup>
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр JABLOTRON F7 400x220x48 мм- клас очищення F7. Фільтр призначений для утримання часток розміром 1-3 мкм. Застосовується для досягнення більш високих вимог до якості повітря у приміщенні й ефективний проти бактерій, цементного пилу і частково проти сажі або тютюнового диму. Виробник: «Jablotron» (Чехія) <sup>5</sup>

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>			
Змн	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розроб.		Кравчук Е. С.			<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>	Літера	Арк	Аркушів
Керівник		Белемець Т. О					49	79
Н. контр						<b>Кафедра БТМ</b>		
Консульт.								
Зав. каф.		Стабніков В.П						

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Ф-8 Ф-13	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр НЕРА клас фільтрації Н14. Матеріал на основі мікрофібри. Ефективність 99,995 %. Габарити: (в×д×ш, мм): 305х305х78. Максимальна продуктивність: 200 м <sup>3</sup> /год. Максимальна робоча температура – 280 °С. Виробник: «ВЕНТ_ФІЛЬТР» (Україна) <sup>6</sup>
ПА-9	Посівний апарат на 50 л	1	Ферментер на 50 л. Матеріал: прямий контакт із середовищем - нержавіюча сталь 316L, всі інші - нержавіюча сталь 304. Кількість отворів на додаткове підключення виконується на замовлення. Оснащений подвійною рубашкою. Максимальний робочий тиск – 4 бар. Можливість підвікнення до СІР мийки. Включено датчики контролю рН, температури, подачі повітря, оптичної густини культури. Можливість підключення різноманітних мішалок. Оснащений барботером. Габарити (в×д, мм): 990×400. Виробник: «Major Science» (Тайвань) <sup>7</sup>
Н-10	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний MP-3035.9. Продуктивність – 31 л/год. Тиск до 1,4 бар. Двигун 0,09 кВт. Максимальна робоча температура 60 °С. Виробник: «DEBEM» (Італія) <sup>8</sup>
3-11	Збірник на 350 л	1	Хімічний реактор на 350 л SS316. Матеріал – нержавіюча сталь. Робочий тиск – до 3 бар. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою. Габарити (в×д, мм): 1850×1200. Виробник: «IndiaMART» (Індія) <sup>9</sup>
Н-12	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний MP-6118.12. Продуктивність – 226 л/год. Тиск до 1,4 бар. Двигун 0,09 кВт. Максимальна робоча температура 60 °С. Виробник: «DEBEM» (Італія) <sup>10</sup>
Ф-14	Ферментер на 500 л	1	Ферментер на 500 л. Оснащений подвійною сорочкою. Матеріал: прямий контакт із середовищем - нержавіюча сталь 316L, всі інші - нержавіюча сталь 304. Швидкість обертів мішалки до 300 об/хв. Робочий тиск до 3 бар. Обладнаний датчиками контролю рН, температури, подачі повітря, кількості обертів мішалки. Виробник: «ПРОМВІТ» (Україна) <sup>11</sup>
Н-15	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний MP-8086.12. Продуктивність – 245 л/год. Тиск до 1,4 бар. Двигун 0,09 кВт. Максимальна робоча температура 60 °С. Виробник: «DEBEM» (Італія) <sup>12</sup>

Примітка: 1 - <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>, 2 - <https://matari.ua/ru/product/matari-m250a18-1>, 3 - <https://termoprom.com.ua/produkt/heat-exchangers/heatexchangers/gasket.php>, 4 - <https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p1187397428->

<a href="https://vozduhosbornik-resiver-dlya.html">vozduhosbornik-resiver-dlya.html</a> ,	5	-	<a href="https://shop.alterair.ua/product/jablotron-f7-filter/">https://shop.alterair.ua/product/jablotron-f7-filter/</a> ,	6	-
<a href="https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-hepa-dlya-himicheskoy-promyshlennosti/">https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-hepa-dlya-himicheskoy-promyshlennosti/</a> ,				7	-
<a href="https://www.majorsci.com/product/11-01-fs-10l">https://www.majorsci.com/product/11-01-fs-10l</a> ,				8	-
<a href="https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-3/">https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-3/</a> ,				9	-
<a href="https://www.indiamart.com/proddetail/stainless-steel-chemical-reactor-24668554512.html">https://www.indiamart.com/proddetail/stainless-steel-chemical-reactor-24668554512.html</a> ,				10	-
<a href="https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-6/">https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-6/</a> ,				11	-
<a href="https://promvit.com.ua/fermenter-500/">https://promvit.com.ua/fermenter-500/</a> ,				12	-
<a href="https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-8/">https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-8/</a>					

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема синтезу біомаси *L. acidophilus* DSM 20079 представлено у графічній частині проекту на 1 аркуші формату А1.

Технологічна схема включає в себе допоміжні роботи (приготування титрувальних агентів, приготування та стерилізація поживного середовища для різних стадій культивування), а також технологічний процес (культивування в колбах, посівному апараті на 50 л, а також виробниче культивування в ферментері на 500 л).

### *ДР 1. Підготовка титрувальних агентів*

#### *ДР 1.1. Приготування 6-% розчину соляної кислоти*

Оскільки наше виробництво є не дуже великим пропонується приготувати титрувальний агент для обох стадій: підготовка посівного матеріалу на стадії посівного апарату, а також виробничого біосинтезу.

Отже, нами передбачено приготування 350 мл кислого титрувального агенту. Для цього, в мірний циліндр на 100 мл в ламінарному боксі, де створені асептичні умови, наливають 60 мл 36-% розчину соляної кислоти. Після цього, в стерильний мірний циліндр на 500 мл наливають 290 мл стерильної дистильованої води. Воду переносять в конічну плоскодонну стерильну колбу. Лише після цього додають попередньо відміряну кислоту. Отриманий розчин ретельно перемішують та закривають скляною пробкою.

Стерилізацію кислоти не проводять, оскільки вона може вибухнути. Крім того, стоковий розчин є сам по собі стерильним, в такій концентрації кислоти нічого не росте.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>			
<i>Змн</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ</b>	<i>Літера</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Кравчук Е. С.</i>					52	79
<i>Керівник</i>		<i>Белемець Т. О.</i>						53
<i>Н. контр</i>						<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Консульт.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

## *ДР 1.2. Підготовка аміачної води*

В ламінарному боксі ставлять 2 стерильні колби номіналом на 1 та на 10 л. За допомогою циліндру на 1 л до першої, меншої колби заливають 900 мл готової аміачної води. До другої колби, більшої, за допомогою циліндру на 5 л заливають 9 л готової аміачної води. Колби закривають стерильними ватно-марлевими корками. Колбу номіналом в 1 л передають на стадію підготовки інокуляту в посівному апараті, а другу більшу безпосередньо на стадію виробничого біосинтезу.

## *ДР 2. Приготування та стерилізація поживного середовища*

*ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках*

### *ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 130 г глюкози, 54,4 г дріжджового екстракту, 1,3 г лимонної кислоти. Компоненти переносять в плоску конічну колбу на 2 л. За допомогою мірного циліндра на 1 л доливають 815 мл дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121°C упродовж 20 хв, під тиском 0,05 МПа.

### *ДР 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 8,9 г сульфату амонію, 1,05 г сульфату магнію, 0,13 г сульфату манганута 2,6 г ацетату натрію. Компоненти переносять в плоску конічну колбу на 2 л. За допомогою мірного циліндра на 1 л доливають 985 мл дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 30 хв, під тиском 0,15 МПа.

### *ДР 2.1.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 2,6 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Компоненти переносять в плоску конічну колбу на 0,5 л. За допомогою мірного циліндра на 500 мл

доливають 295 мл дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв, під тиском 0,15 МПа.

#### *ДР 2.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г*

На семплері на 5 мл встановлюють мірку на 2,6 мл. За допомогою одноразового пластикового носика на 5 мл з пластикової тари відбирають 2,6 мл Твін 80, дуже повільно та обережно, оскільки субстанція є дуже в'язкою. Компонент виливають в плоску конічну колбу на 0,5 л. За допомогою мірного циліндра на 500 мл доливають 295 мл дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Для кращого розчинення композицію можна трошки підігріти на водяній бані або в термостаті. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 105°C упродовж 5 хв, під тиском 0,05 МПа.

*ДР 2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 50 л*

#### *ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 1300 г глюкози, 544 г дріжджового екстракту, 13 г лимонної кислоти. Компоненти переносять в хімічну склянку на 10 л. За допомогою мірного циліндра на 5 л доливають 8,1 л дистильованої води. В склянку кидають магніт та ставлять на перемішування на магнітну мішалку до повного розчинення. Отриманий розчин розливають на 4 колби на 5 л по 2,5 л розчину в кожній. Колби закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121°C упродовж 20 хв, під тиском 0,05 МПа.

#### *ДР 2.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 89 г сульфату амонію, 10,5 г сульфату магнію, 1,3 г сульфату мангану та 26 г ацетату натрію. Компоненти переносять в хімічну склянку на 10 л. За допомогою мірного циліндра на 5 л

доливають 9,9 л дистильованої води. В склянку кидають магніт та ставлять на перемішування на магнітну мішалку до повного розчинення. Отриманий розчин розливають на 4 колби на 5 л по 2,5 л розчину в кожній. Колби закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 30 хв, під тиском 0,15 МПа.

#### *ДР 2.2.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 26 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Компонент переносять в плоску конічну колбу на 5 л. За допомогою мірного циліндра на 5 л доливають 3 л дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв, під тиском 0,15 МПа.

#### *ДР 2.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г*

На семплері на 25 мл встановлюють мірку на 13 мл. За допомогою одноразового пластикового носика на 25 мл з пластикової тари двічі відбирають по 13 мл Твін 80, дуже повільно та обережно, оскільки субстанція є дуже в'язкою. Компонент виливають в плоску конічну колбу на 5 л. За допомогою мірного циліндра на 5 л доливають 3 л дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Для кращого розчинення композицію можна трошки підігріти на водяній бані або в термостаті. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 105°C упродовж 5 хв, під тиском 0,05 МПа.

*ДР 2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу*

#### *ДР 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А*

На ваговому дозаторі зважують 14,4 кг глюкози, 6 кг дріжджового екстракту, 0,15 кг лимонної кислоти. Компоненти переносять в реактор на 350 л (3-11). За допомогою вагового дозатора доливають 232 л води питної. Кришку реактора закривають, вмикають мішалку до повного перемішування.

Після повної гомогенізації встановлюється режим стерилізації: температура 121°C упродовж 20 хв, під тиском 0,05 МПа.

#### *ДР 2.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 280 г сульфату амонію, 120 г сульфату магнію, 20 г сульфату мангану та 300 г ацетату натрію. Компоненти переносять в хімічну склянку на 5 л. За допомогою мірного циліндра на 5 л доливають 3,5 л дистильованої води. В склянку кидають магніт та ставлять на перемішування на магнітну мішалку до повного розчинення. Отриманий розчин розливають на 2 колби на 5 л по 2 л розчину в кожній. Колби закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 30 хв, під тиском 0,15 МПа.

#### *ДР 2.3.3. Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 300 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Компонент переносять в плоску конічну колбу на 5 л. За допомогою мірного циліндра на 2 л доливають 1,7 л дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв, під тиском 0,15 МПа.

#### *ДР 2.3.4. Приготування та стерилізація композиції Г*

За допомогою ложки в хімічну склянку на 5 л відважують 300 мл твіну 80. За допомогою мірного циліндра на 2 л доливають 1,7 л дистильованої води та перемішують композицію до повного розчинення. Для кращого розчинення композицію можна трошки підігріти на водяній бані або в термостаті. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 105°C упродовж 5 хв, під тиском 0,05 МПа.

### ***ТП 3. Підготовка посівного матеріалу***

#### ***ТП 3.1. Підтримання колекційної культури***

Культуру *L. acidophilus* DSM 20079 зберігають на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) при 4°C. Пересів роблять кожні 1-3 місяці. Всі роботи з культурою виконують в асептичних умовах.

### *ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею на чашки Петрі із поживним агаром і вирощують при температурі 37 °C упродовж 24 год.

### *ТП 3.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках*

Отримані ізольовані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним поживним агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). Тривалість вирощування – 24 год. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 37 °C та витримують впродовж 12 – 24 год. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

### *ТП 3.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

У колбу об'ємом 5 л в асептичних умовах вносять 1 л розчину композиції А (від ДР 3.1.1), 1 л розчину композиції Б (від ДР 2.1.2), 300 мл розчину композиції В (від ДР 3.1.3) та 300 мл композиції Г (від ДР 3.1.4). Середовище перемішують і розливають по 153 мл в 17 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *L. acidophilus* DSM 20079, вирощеною на поживному агарі, вносять 10 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалках. Умови культивування наступні: температура – 37 °С, частота обертання – 200 об/хв, час вирощування – 36 год.

#### *ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л*

До посівного апарату (ПА-9) на 50 л асептично вносять 10 літрів простерилізованої та охолодженої композиції А (від ДР 3.2.1), 10 л композиції Б (від ДР 3.2.2), 3 л композиції В (від ДР 3.2.3) та 3 л композиції Г (від ДР 3.2.4). В сорочку інокулятора подають холодну воду та насичену пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 37 °С.

Посівний матеріал (від ТП 4.4) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 37 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 36 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані гази. Корекцію рівня рН впродовж культивування проводять за допомогою аміачної води та кислотного агента (від ДР 2.1).

### **ТП 4. Біосинтез**

#### *ТП 4.1. Виробничий біосинтез*

До простерилізованого ферментеру на 500 л (Ф-14) за допомогою перистальтичного насосу (Н-12) в асептичних умовах подають 280 л композиції А (від ДР 3.3.1), асептично вносять 4 л композиції Б (від ДР 3.3.2), 2 л композиції В (від ДР 3.3.3) та 2 л композиції Г (від ДР 3.3.4). В сорочку ферментера подають холодну воду та насичену пару контролюють значення температури поживного середовища на рівні 37°С.

Посівний матеріал (від ТП 4.5) переносять у ферментер в строго асептичних умовах за допомогою перистальтичного насосу (Н-10). Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 37 °С, швидкість перемішування – 200 об/хв, час вирощування – 37 год. Через барботер подається стерильне повітря, а також відводяться відпрацьовані

гази. Корекцію рівня рН впродовж культивування проводять за допомогою аміачної води та кислотного агента (від ДР 2.1).

Культивування ведуть до досягнення концентрації біомаси в 5,14 г/л. Отриману культуральну рідину передають далі за допомогою перистальтичного насоса (Н-15) на отримання цільового продукту.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 7.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

#### Карта постадійного контролю біосинтезу біомаси

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	<b>Повітрозабірник</b> Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 10-15 м
Кт 1.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 90%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	<b>Стиснене повітря</b> Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	<b>Охолоджене повітря</b> Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	<b>Охолоджене повітря</b> Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	<b>Нагріте повітря</b> Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 <i>Очищення у головному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>								
<i>Змн</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>								
<i>Розроб.</i>	<i>Кравчук Е. С.</i>									<i>Літера</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Керівник</i>	<i>Белемець Т. О.</i>										<i>60</i>	<i>79</i>	
<i>Н. контр</i>										<i>61</i>			
<i>Консульт.</i>										<b>Кафедра БТМ</b>			
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>												

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	$E = 99,999\%$ , $KYO \leq 1$
Кх, Км 2.1 <i>Приготування стерильного розчину соляної кислоти</i>	<b>Розчин соляної кислоти</b> Концентрація, стерильність	Фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Визначення концентрації та проведення мікробіологічного контролю проходить після приготування розчину	$C = 6\%$ , відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2 <i>Приготування і стерилізація розчину аміачної води</i>	<b>Розчин аміачної води</b> Тиск, час, концентрація, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $C = 6\%$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту у колбах на качалках</i>  <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 3.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p><b>Композиція В</b> Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>P = 0,15</math> МПа, <math>\tau = 40</math> хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.1.4 <i>Приготування і стерилізація композиції Г</i></p>	<p><b>Композиція Г</b> Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>P = 0,05</math> МПа, <math>\tau = 5</math> хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.2.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 50 л</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p><b>Композиція А</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>P = 0,05</math> МПа, <math>t = 112</math> °С, <math>\tau = 30</math> хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p><b>Композиція Б</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>P = 0,15</math> МПа, <math>t = 131</math> °С, <math>\tau = 40</math> хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 3.2.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p><b>Композиція В</b> Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>P = 0,15</math> МПа, <math>t = 131</math> °С, <math>\tau = 40</math> хв, відсутність мікробіоти</p>

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 3.2.4 <i>Приготування і стерилізація композиції Г</i>	<b>Композиція Г</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск ви- значаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 105 °С, τ = 5 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 500 л</i>  <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск ви- значаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	<b>Композиція Б</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск ви- значаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	<b>Композиція В</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск ви- значаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.4 <i>Приготування і стерилізація композиції Г</i>	<b>Композиція Г</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість, температура і тиск ви- значаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 105 °С, τ = 5 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 4.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	<b>Колекційна культура <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079</b> температура, мік- робиологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мік- робиологічний контроль – кожні 3-4 місяці	$t = 2 - 4 \text{ } ^\circ\text{C}$ , $\tau = 3 - 4$ місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 <i>Одержання робочої культури</i>	<b>Робоча культура <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 на чашках Петрі</b> температура, мік- робиологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 <i>Вирощування культури на щільному середовищі</i>	<b>Робоча культура <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 у пробірках</b> температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 <i>Вирощування культури у колбах на качалках</i>	<b>Посівний матеріал</b> температура, час, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$ , $\tau = 24$ год, $w = 200$ об/хв, $\text{pH} = 6,8-7,0$ , відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.5 <i>Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 50 л</i>	<b>Посівний матеріал</b> температура, час, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$ , $\tau = 24$ год, $w = 200$ об/хв, $\text{pH} = 6,8-7,0$ , відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 500 л	<b>Культуральна рідина</b> температура, час, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	t = 37 °С, τ = 36 год, w = 200 об/хв, рН = 6,8-7,0, Сб = 5,14 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
--	--	--	---	---

## 7.2. Мікробіологічний контроль

З метою контролю чистоти культивування бактерій *L. acidophilus* DSM 20079 необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Кожні 4 год з інокулятора і ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

### 7.2.1 Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Пробу простерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі, як правило, 50 мл і здійснюють прямим висівом на агаризовані середовища. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища (або стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням [45].

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єма проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища штрихом за допомогою стерильної бактеріологічної петлі. Чашки з посівами поміщають у термостат за температури 30...32 °С. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [45].

## 7.2.2 Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини

Мікробіологічний контроль чистоти культури здійснюється двома шляхами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням [45].

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром для виявлення сторонніх бактерій, сусло-агаром або глюкозо-картопляним агаром – грибів та дріжджів [45].

Для ідентифікації нашого продуценту гарним варіантом може стати BD LBS агар, MPC агар, LMA агар, а також селективний агар для лактобактерій [46-49].

Мікроскопіювання проводять світловим мікроскопом з імерсійною системою. Методика мікроскопіювання [50]:

Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини і розподіляють її рівномірно на площі 1-4 см<sup>2</sup>, зробивши якомога тонший мазок. Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Фіксують препарат тричі провівши скло з препаратом через верхню частину пальника. Фіксований препарат заливають кількома краплями барвника – метиленового синього. Розподіляють барвник по всій поверхні мазка. Фарбують препарат протягом 5 хв. Потім фарбу зливають, препарат добре промивають дистильованою водою. Скло з країв протирають фільтрувальним папером, препарат висушують при кімнатній температурі. Потім на абсолютно сухий препарат наносять краплину імерсійного масла. Мікроскопіюють під великим збільшенням мікроскопа ( $\times 90$ ). Після роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива. [50]

### 7.3. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

#### 7.3.1. Визначення вмісту глюкози

Джерелом вуглецевого живлення є глюкоза. Цей компонент визначають глюкозооксидазним методом.

Глюкозооксидазний (фотометричний) метод аналізу базується на реакції окислення глюкози в присутності ферменту глюкозооксидази з утворенням перекисі водню, яка в свою чергу в присутності пероксидази окислює ортополідін з утворенням забарвленого розчину [51].

*Методика визначення глюкози в дослідному зразку.* Культуральну рідину центрифугують при 10000 об/хв на 20 хв. Після чого, до 1 мл супернатанту додають 3 мл ензимо-хромогенного реактиву. Реактив готують наступним чином: у мірну колбу на 100 мл поміщають 80-90 мл ацетатного буфера (0,25 моль/л, рН=4,8), в якому розчиняють 2 мг глюкозооксидази, а потім 1 мг пероксидази; додають 1 мл 1% розчину о-толїдину в абсолютному спирті і доводять об'єм розчину ацетатним буфером до мітки. Після додавання реактиву до дослідного зразку, отриману суміш перемішують і через 20 хвилин вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 625 нм. Порівняння проводять за стандартним розчином глюкози. Далі, концентрацію глюкози вираховують за формулою [52]:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{D_{\text{досл.}} \cdot C}{D_{\text{ст}}}$$

де  $D_{\text{досл.}}$  – оптична густина дослідної проби;  $D_{\text{ст}}$  – оптична густина розчину стандартного зразка глюкози;  $C$  – концентрація глюкози в розчині стандартного зразка.

#### 7.3.2. Визначення вмісту амінного азоту

Основним джерелом азоту, а конкретно амонійного, в середовищі виступає дріжджовий екстракт. Даний вид нітрогену можна визначити за допомогою метода Попа та Стівенса [53].

Метод заснований на можливості більшості амінокислот і пептидів утворювати з міддю розчинні комплексні сполуки («мідний спосіб»).

Надлишок міді відтитрують, а її кількість, еквівалентна амінному азоту, оцтовою кислотою переводять у сіль оцтової кислоти і кількісно визначають йодометричним титруванням [53].

У мірну колбу місткістю 100 см<sup>3</sup> поміщають 10 см<sup>3</sup> супернатанту, додають 3-4 краплі тимолфталейну і 1 моль/дм<sup>3</sup> розчин гідроксиду натрію до блідо-блакитного фарбування. При перемішуванні обережно доливають 30 см<sup>3</sup> суспензії фосфорнокислої міді та доводять до мітки дистильованою водою. Суміш після ретельного перемішування відфільтровують через паперовий фільтр, перефільтровуючи перші порції фільтрату [53].

10 см<sup>3</sup> прозорого фільтрату підкислюють 0,5 см<sup>3</sup> оцтової кислоти, додають до нього 1 г йодистого калію і після розмішування відтитрують йод, що виділився 0,01 моль/дм<sup>3</sup> розчином тіосульфату натрію і додають в кінці титрування 1-2 краплі. Титрування закінчують при знебарвленні розчину від однієї краплі тіосульфату натрію [53].

Кількість тіосульфату натрію, що пішов на титрування, помножене на 0,28, дає вміст амінного азоту в 10 см<sup>3</sup> фільтрату. Це відповідає 2 см<sup>3</sup> зразка з урахуванням розведення (виходячи з того, що 1 см<sup>3</sup> 0,01 моль/дм<sup>3</sup> розчину тіосульфату відповідає 0,28 г азоту) [53].

Масу амінного азоту N, мг 100 см<sup>3</sup> зразка, обчислюють за формулою:

$$N = a \cdot 0,28 \cdot 5 \cdot 10,$$

де a - об'єм 0,01 моль/дм<sup>3</sup> розчину тіосульфату натрію, що пішло на титрування йоду, що виділився, см<sup>3</sup>; 5 та 10 – коефіцієнти перерахунку з 2 см<sup>3</sup> на 100 см<sup>3</sup> [53].

#### **7.4. Визначення концентрації біомаси**

Концентрацію біомаси визначається за оптичною густиною культуральної рідини. Після чого, отриманий показник перераховують на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком [54].

*Методика визначення концентрації біомаси.* У пробірки із 9 мл стерильної водопровідної води вноситься по 1 мл культуральної рідини.

Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина при довжині хвилі, яка становить 540 нм. Одержаний результат перераховують за калібрувальним графіком [54].

## РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

### 8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологічна схема виробництва ацидофіліну включає доферментаційні процеси (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація поживного середовища для культивування), ферментаційні процеси (отримання посівного матеріалу, виробниче культивування).

#### 1. Санітарна підготовка виробництва

На даному етапі відбувається щоденне та генеральне прибирання приміщень з використанням мийно-дезинфікуючого засобу «Санікон». Відпрацьований розчин зливається в каналізацію.

Миття ємнісного обладнання здійснюється за використання СІР-мийки мийно-дезинфікуючим засобом “Дезеконом”. Після процесу обробки відпрацьований розчин надходить до збірника та може використовуватись повторно, а промивна вода зливається в каналізацію. *Даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

#### 2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

Даний етап характеризується процесом проведення перевірки компонентів поживного середовища на показники якості власне перед його приготуванням. Сировина, яка не відповідає показникам, відбраковується. Тверді відходи, які утворюються на даному етапі, являють собою пакувальні матеріали від сировини. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

#### 3. Підготовка посівного матеріалу

На цьому етапі здійснюється нарощування посівного матеріалу в інокуляторах. Так як посівний матеріал використовується для засіву наступного ферментера, відходи посівного матеріалу не враховуються.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>			
<i>Змн</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b>	<i>Літера</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Кравчук Е. С.</i>					<i>70</i>	<i>791</i>
<i>Керівник</i>		<i>Белемець Т. О.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт.</i>								
<i>Зав. каф</i>		<i>Стабніков В.П.</i>			<b>Кафедра БТМ</b>			

## **8.2. Характеристика рідких відходів виробництва ацидофіліну**

**Розрахунок об'ємів відходів.** Для щоденного та генерального прибирання готують розчин «Санікон» концентрацією 0,5%. За один цикл виробництва (43 год) витрачається 237 л робочого розчину «Санікон», який після миття зливається у каналізацію. Обладнання миють 0,05%-им розчином «Дезеконом» за допомогою СІР-мійки, об'єм відходів за один цикл 1056 л. Мийно-дезинфікуючі засоби «Санілон» та «Дезеконом» мають клас безпеки ІV (малонебезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76), а тому є безпечними для навколишнього середовища. Узагальнена характеристика рідких відходів виробництва наведена у табл. 8.1.

## Характеристика рідких відходів під час виробництва

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (л)	Клас небезпеки
0,5% розчин «Санікон»	Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук (не менше 5,5%) і допоміжні компоненти (в т. ч. ПАР, барвник, ароматизатор). рН концентрату $12,4 \pm 0,5$	237	IV
0,05% розчин «Дезеконом»	Активно діючі речовини: дидецилдиметиламоніум хлорид – 9,0%, амінопропилдодецилпропанд іамін – 5,0%, полігексаметиленбігуанід гідрохлорид – 0,98%, допоміжні компоненти: неіоногенна ПАР, комплексонат, регулятор рН, барвник, ароматизатор, вода.	1056	
Всього		1293	

**Заходи для зменшення об'ємів відходів.** З метою зменшення об'ємів стічних вод процес миття здійснюється за використання СІР-мийки. Це дає змогу витратити меншу кількість мийно-дезінфікуючого засобу та використовувати розчин повторно після його очищення.

**Утилізація рідких відходів.** Аеротенки не використовуються для передочищення стічних вод молокозаводів. Знешкодження рідких відходів виробництва пропонується здійснювати за допомогою розбавлення та викиду в каналізацію, якщо вона присутня або використовують первинні методи біофільтрової очистки чи метантенкової, залежно від типу підприємства.

### 8.3. Характеристика твердих відходів виробництва ацидофіліну

**Розрахунок об'ємів відходів.** Тверді відходи, які утворюються на етапах санітарної підготовки виробництва та приготування поживного середовища, являють собою упаковки, в якій поставляються мийно-

дезинфікуючі засоби та компоненти середовища. Упаковка від засобів «Санікон» та «Дезеконом» виготовлена з поліетилену високої щільності і піддається вторинній переробці. Компоненти поживного середовища постачаються у пакетах з полівінілхлориду. У зв'язку з тим, що полівінілхлорид відрізняється від звичайного пластику, даний вид матеріалу пакування потребує окремої вторинної переробки. [55]

Таблиця 8.2

#### Характеристика твердих відходів під час виробництва

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Упаковка «Санікон» та «Дезеконом»	Поліетилен високої щільності	0,67	IV
Упаковка компонентів поживного середовища	Полівінілхлорид	2,93	
Всього		3,6 кг	

**Утилізація твердих відходів.** Упаковки від миючих засобів та компонентів середовища сортують (окремо поліетилен, полівінілхлорид та папір) та відправляють до пунктів прийому вторинної сировини для переробки.

#### 8.4. Характеристика газоподібних відходів виробництва ацидофіліну

Оскільки мікроорганізм являє собою аеротолерантного анаероба передбачати підготовку аераційного повітря немає потреби, але буде виділятися вуглекислий газ, отже для газоподібних відходів ми використовуємо скруб-бер вентури.

## Список використаної літератури

1. Молочна промисловість. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://esu.com.ua/search\\_articles.php?id=69334](https://esu.com.ua/search_articles.php?id=69334).
2. Литовченко, М. В. (2015). Молочна промисловість України: стан та перспективи розвитку. *Агросвіт*, (8), 30-34.
3. Ацидофілін: користь і шкода для організму, склад, фото, відгуки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ideas-center.com.ua/?p=29868>.
4. Закваски для молочної промисловості. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://studopedya.ru/2-8657.html>.
5. Cultures and starter manufacture. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/cultures-and-starter-manufacture>.
6. Головачёва, О. В. (2020). ХАРАКТЕРИСТИКА АЦИДОФИЛЬНОЙ ЗАКВАСКИ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ. *StudNet*, 3(11), 92-100.
7. Ацидофільні напої. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://vue.gov.ua/Ацидофільні\\_напої](https://vue.gov.ua/Ацидофільні_напої).
8. Choonia, H. S., & Lele, S. S. (2013). Kinetic modeling and implementation of superior process strategies for  $\beta$ -galactosidase production during submerged fermentation in a stirred tank bioreactor. *Biochemical engineering journal*, 77, 49-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.021>.
9. Kepli, A. N., Dailin, D. J., Malek, R. A., Elsayed, E. A., Leng, O. M., & El-Enshasy, H. A. (2019). Medium optimization using response surface methodology for high cell mass production of *Lactobacillus acidophilus*.
10. Rivaldi, J. D., Sousa Silva, M. L. C., Duarte, L. C., Ferreira, A. E., Cordeiro, C., de Almeida Felipe, M. D. G., ... & de Mancilha, I. M. (2013). Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(4), 1735-1743. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4621-z>.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.12 КР ПЗ</b>					
<b>Змн</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ документа</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>	<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b>					
Розроб.		Кравчук Е. С.						<b>Літера</b>	<b>Арк.</b>	<b>Аркушів</b>
Керівник		Белемець Т. О.							74	79
Н. контр										75
Консульт.								<b>Кафедра БТМ</b>		
Зав. каф.		Стабніков В.П.								

11. Al-kaf, H. A., HUYOP, F. Z., & Zainol, N. A. (2020). Growth Analysis of *Lactobacillus acidophilus* Using Different Non-Digestible Carbohydrates. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(1), 33-45. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.796319>.
12. Modiri, S., Kermanshahi, R. K., Soudi, M. R., Dad, N., Ebadi, M., Zahiri, H. S., & Noghabi, K. A. (2021). Growth Optimization of *Lactobacillus acidophilus* for Production of Antimicrobial Peptide Acidocin 4356: Scale up from Flask to Lab-Scale Fermenter. *Iranian Journal of Biotechnology*, 19(3), e2686. <https://doi.org/10.30498%2Fijb.2021.218725.2686>.
13. Liguori, R., Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Woiciechowski, A. L., Ionata, E., Marcolongo, L., & Faraco, V. (2015). Selection of the strain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and its application to brewers' spent grain conversion into lactic acid. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/240231>.
14. Anekella, K., & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.003>.
15. *Lactobacillus acidophilus*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.tgw1916.net/Lactobacillus/acidophilus.html>.
16. *Lactobacillus acidophilus*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.medschool.lsuhs.edu/microbiology/dmip/lactogs.jpg>.
17. *Lactobacillus acidophilus*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm\\_keyword?AN=Lactobacillus&BN=acidophilus&CN=&DN=](https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_keyword?AN=Lactobacillus&BN=acidophilus&CN=&DN=).
18. Таксономы - *Lactobacillus acidophilus* (species). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.uniprot.org/taxonomy/1579>.
19. Bull, M., Plummer, S., Marchesi, J., & Mahenthiralingam, E. (2013). The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxon-

- omy, misidentification and commercial success. *FEMS microbiology letters*, 349(2), 77-87. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12293>.
20. *Lactobacillus acidophilus*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://laktiale.ua/ru/pro-laktiale/lactobacillus-acidophilus/>.
21. *Lactobacillus acidophilus*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://santegra.in.ua/ua/p872472155-lacidophilus-santegra-santegra.html>.
22. Рябченко Н. О. Бактеріальні закваски для виготовлення кисломолочних продуктів. 2013.
23. Ацидофілін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakvaska-jogurt.com.ua/ua/p625567510-zakvaska-domashnij-atsidofilin.html>.
24. Застосування ацидофіліну - користь від його вживання. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://oede.in.ua/chaj-kava-napoi/zastosuvannya-atsidofilinu.html#d%D1%96tyam>.
25. Ацидофилін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rozetka.com.ua/101046907/p101046907/>.
26. Закваска «Ацидолакт VIVO». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1020861672-zakvaska-atsidolakt-vivo.html>.
27. Закваска «Наріне VIVO» в пакетиках. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1028952649-zakvaska-narine-vivo.html>.
28. Закваска Ипровит-йогурт з ацидофільної палички. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ikf.kiev.ua/ua/p916753618-zakvaska-iprovit-jogurt.html>.
29. Закваска ацидофільний йогурт, Genesis Laboratories OOD, 5 пакетиків. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biotus.ua/ua/zakvaska-acidofilnyj-jogurt-genesis-laboratories-ood-5-paketikov.html>.
30. Закваска "Ацидофільний Кефір" - 1 пакетик на 1 літр молока (Італія). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zakvaska-jogurt.com.ua/ua/p764947561-zakvaska-atsidofilnyj-kefir.html>.

31. Ромоданова В.В. Методи контролю продукції в галузі: Курс лекцій, К. НУХТ, 2013. 25 с.
32. Держстат України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/>.
33. Zotta, T., Parente, E., & Ricciardi, A. (2017). Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. *Journal of applied microbiology*, 122(4), 857-869. <https://doi.org/10.1111/jam.13399>.
34. Lopes, L. A. A., Carvalho, R. D. S. F., Magalhães, N. S. S., Madruga, M. S., Athayde, A. J. A. A., Portela, I. A., ... & Stamford, T. C. M. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 135, 109295. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109295>.
35. Hwang, C. F., Lin, C. K., Yan, S. Y., Chang, R. H., & Tsen, H. Y. (2015). Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain *Lactobacillus acidophilus* DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. *African Journal of Biotechnology*, 14(3), 248-256. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12839>.
36. Sarid, L., Zanditenas, E., Ye, J., Trebicz-Geffen, M., & Ankri, S. (2022). Insights into the Mechanisms of *Lactobacillus acidophilus* Activity against *Entamoeba histolytica* by Using Thiol Redox Proteomics. *Antioxidants*, 11(5), 814. <https://doi.org/10.3390/antiox11050814>.
37. Очищення і дезинфекція в харчовій промисловості. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.bettaservice.com.ua/novyny-kompanii/item/1172-ochistki-i-dezinfektsiya-v-pishchevoy-promyshlennosti.html>.
38. Постанова КМУ «Про затвердження Порядку державної реєстрації (перереєстрації) дезінфекційних засобів». [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/908-2006-%D0%BF#Text>.

39. САНІКОН дезінфекційний засіб для поверхонь. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.propecs.ua/product/sanikon-dezinfekcijnyj-zasib-dlya-poverhon/>.
40. САНІКОН. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/dezinficiruyushee-sredstvo-sanikon-interdez-kiiev>.
41. Дезеконом, 1 л – флакон-дозатор (Україна). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p1537967096-dezekonom-flakon-dozator.html>.
42. ДЕЗЕКОНОМ. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/interdez-dezekonom>.
43. Autoclaving citric acid. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sapiencia.ualg.pt/bitstream/10400.1/416/2/Appendix%20I.pdf>.
44. Sterilize Tween 80. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.researchgate.net/post/Can\\_I\\_sterilize\\_Tween\\_80\\_by\\_autoclaving#:~:text=You%20can%20sterilize%20by%20Tween%2080%20by%20autoclaving.&text=Its%20not%20favorable%20to%20sterilize,105%20C%20for%205%20min.&text=Tween%2080%20is%20very%20viscous,a%20small%20pore%20size%20filter](https://www.researchgate.net/post/Can_I_sterilize_Tween_80_by_autoclaving#:~:text=You%20can%20sterilize%20by%20Tween%2080%20by%20autoclaving.&text=Its%20not%20favorable%20to%20sterilize,105%20C%20for%205%20min.&text=Tween%2080%20is%20very%20viscous,a%20small%20pore%20size%20filter)  
s.
45. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2019. – с. 144-157.
46. BD LBS Agar. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/pa/pa-255011.pdf>.
47. Nezhad S. K., Zenouz A. T., Aghazadeh M., Kafil H. S. Strong antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. against oral isolates of *Lactobacillus* spp. *Cellular and Molecular Biology*. 2017, 63(11): 58-62. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.11.11>.

48. Byrd P. M., Fallico V., Tang P., Wong C. Novel microaerobic agar plate method delivers highly selective and accurate enumeration of probiotic lactobacilli in freeze-dried blends containing bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2022, 195: 106451. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106451>.
49. *Lactobacillus* Selection Agar Base. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://himedialabs.com/TD/M1180.pdf>.
50. Пирог Т. П., Антонюк М.М. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія». – К.: НУХТ, 2016. – с. 21-35.
51. Бондаренко О. С., Івченко Д. А. Технології аналізу рівня глюкози в організмі людини. *Міжнародний науковий журнал*. 2016, 6 (2): 60-65.
52. Методичні вказівки для підготовки до практичних занять з біологічної хімії (для студентів медичних факультетів). Частина 2. Біохімія гормонів. Обмін вуглеводів і ліпідів / О. А. Наконечна, С. О. Стеценко. – Харків: ХНМУ, 2017. – 98 с.
53. Методы определения содержания аминного азота. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://ozlib.com/975977/tovarovedenie/metody\\_opredeleniya\\_soderzhaniya\\_amin\\_nogo\\_azota](https://ozlib.com/975977/tovarovedenie/metody_opredeleniya_soderzhaniya_amin_nogo_azota).
54. Екологічна біотехнологія: принципи створення біотехнологічних виробництв : навчальний посібник / Л. Д. Пляцук, Є. Ю. Черниш. – Суми : Сумський державний університет, 2018. – 293 с.
55. Екологізація промисловості України: статистичний аспект [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://core.ac.uk/download/pdf/19726447.pdf>.