

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології

**«До захисту в ЕК»**  
Директор інституту(декан факультету)  
Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (ім'я та  
прізвище)  
«\_\_» \_\_ червня 2023 р.

**«До захисту допущено»**  
Завідувач кафедри  
Віктор СТАБНИКОВ  
(підпис)  
(ім'я та прізвище)  
«\_\_» \_\_ червня 2023 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,  
промислова, харчова, природоохоронна»  
на тему: Одержання біомаси *Sacharomyces kefir* як компонента  
заквашувальної композиції для кефіру

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

ЗЕЛЕНЯК Дмитро Олександрович  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Вікторія СТОЙКО  
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2023 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 62 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 20 22 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Зеленяк Дмитро Олександрович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Sacharomyces kefir* як компонента заквашу вальної композиції для кефіру

Керівник роботи Карлаш Юрій Васильович

Доцент, кандидат технічних наук

( прізвище, ім'я, по батькові,

науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Sacharomyces kefir*, цільовий продукт – біомаса, геометричний об'єм ферментера: 1 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення: 0,7, продуктивність виходу цільового продукту - 7,2 г/л

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика заквашувальної композиції ; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; *Sacharomyces kefir*; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема - 1 аркуш формату А0  
Апаратурна схема - 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 березня 2023 року

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика зквашувальних композицій	01.03.2022-10.03.2022	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента <i>Sacharomyceskefir</i>	15.03.2022-28.03.2022	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	29.03.2022-04.04.2022	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	06.04.2022-14.04.2022	
5	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	17.04.2022-29.04.2022	
6	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.	04.05.2023-09.05.2023	
7	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	10.05.2023-15.05.2023	
8	РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля	16.05.2023-19.05.2023	
9	Апаратурна та технологічна схеми	20.05.2023-31.05.2023	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Зеленяк Дмитро** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Юрій Карлаш** (підпис)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології біосинтезу дріжджів *Sacharomyces kefir* , як компоненту заквашувальної композиції. Проаналізувавши наукову літературу, було визначено, що використання *Saccharomyces kefir* IMB Y5040 є найбільш оптимальним. Продуктивність запропонованого штаму продуценту становить 7,2 г/л.

Кваліфікаційну роботу було виконано згідно з отриманим варіантом завдання.

Потужність запропонованого виробництва буде становити 0,347 т біомаси на рік. Технологічна схема біосинтезу *Saccharomyces kefir* буде включати такі допоміжні роботи: приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти та натрію гідроксиду , для регулювання рН середовища; стерилізація поживних середовищ. А також, включає три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Технологія отримання біомаси передбачає культивування глибинним періодичним способом. Обсяг кваліфікаційної роботи становить 65 сторінок. Робота складається з вступу, п'яти розділів, 9 таблиць , 2 рисунків , списку використаних джерел, апаратурної та технологічної схеми.

**Ключові слова:** *Saccharomyces kefir* IMB Y5040, біомаса, культивування , поживне середовище.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика заквашувальних композицій.....	7
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента <i>Saccharomyces kefir</i> .....	9
2.1. Обґрунтування вибору <i>Saccharomyces kefir</i> та поживного середовища для його культивування.....	9
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Saccharomyces kefir</i> .....	12
2.3. Таксономічний статус <i>Saccharomyces kefir</i> .....	13
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	14
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	14
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	14
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	15
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	16
РОЗДІЛ 4 . Біосинтез цільового продукту.....	20
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агенту.....	20
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	22
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	22
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	24
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	25
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	26
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	29
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....	30
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	36
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	36
8.2. Мікробіологічний контроль.....	39
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	41
8.3.1. Концентрація біомаси.....	41
8.3.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту.....	42
РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля.....	44
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва <i>Saccharomyces kefir</i> на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	44
9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	45
9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	45
9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	47
9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	49
9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	50
ЛІТЕРАТУРА.....	51

## ВСТУП

Нині одержання кефіру у традиційний спосіб з використанням виробничої закваски на кефірних грибках у промисловості застосовується рідко через трудомісткість та значні матеріальні й енергетичні витрати. Це спонукало до створення альтернативних заквасок для виготовлення цього продукту. З розвитком біотехнології стало можливим одержання сухих бактеріальних концентратів кефірної грибкової закваски прямого внесення. Такі заквашувальні культури зручні у використанні, дають змогу мінімізувати ризик вторинної контамінації та враження бактеріофагами. Але через надзвичайну складність природного симбіозу кефірних грибків повністю відтворити склад мікрофлори і, відповідно, забезпечити необхідний баланс молочнокислого та спиртового бродіння практично неможливо.

В результаті заквашувальні культури, які пропонує сучасних ринок, особливо імпортовані, як правило, є спрощеними, містять лише окремих представників мікрофлори кефіру, часто в них відсутні такі обов'язкові складники, як дріжджі та оцтовокислі бактерії. Як наслідок, продукт отриманий з їхнім використанням, не набуває характерного для кефіру неповторного щиплячого смаку та консистенції, що злегка піниться. Відповідно, продукт, виготовлений з використанням даних культур, не має права мати назву «Кефір».

Саме тому актуальним є розроблення сучасної заквашувальної культури на основі виключно мікрофлори кефірних грибків та Дріжджів *S. Kefir*, що давала б змогу виробляти кефір високої якості відповідно до вимог діючих нормативних документів.

Таких як Codex Standard 243-2003, згідно з яким до нормальної мікрофлори кефірної закваски відносять такі основні групи мікроорганізмів: дріжджі (лактозоброджувальні *Kluuveromyces marxianus* та ті, що не ферментують лактозу, -*Saccharomyces kefir*; гомо- і гетероферментативні молочнокислі мікроорганізми родів *Leuconostoc*, *Lactococcus*, молочнокислі палички *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti*, саме тому, розробка нових бактеріальних композицій, для сквашування молочної сировни, а актуальною [1,2].

**Новизна роботи.** Використання штаму *Saccharomyce skefir* IMB Y-5040 як більш вигідного продуцента біомаси дріжджів для, як компонента заквашувальної композиції для кефіру, що дає змогу забезпечити більший вихід цільового продукту, та забезпечити кращі фізико-хімічні та мікробіологічні показники вироблених кисломолочних продуктів [3].

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Зеленяк Д.О.				Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В						12	65 10
Консультант								
Н. КОНТД.								
Затверд.	Стабніков В.П.							
						<b>Кафедра БТМ</b>		

## РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Заквасками представляють собою чисті або ж суміш культур мікроорганізмів, які використовують при виготовленні ферментованих кисломолочних продуктів : кефір , сметана , сир і тд.

Обов'язковими складовими мікрофлори кефіру є: лактококи, мезофільні і термофільні лактобацили, лактозоброджуючі та дріжджі, що не зброджують лактозу, оцтовокислі бактерії. Під час виробництва кефіру необхідно створити умови для достатнього розвитку у симбіозі всіх компонентів мікрофлори, а запорукою одержання продукту високої якості є застосування заквашувальних культур на основі грибової кефірної закваски[1,4].

Кефір вважається одним із самих корисних продуктів (з переліку кисломолочних), що існують на планеті. Науково доведено, що кефір може нормалізувати не тільки мікрофлору шлунку та кишківника, але й впливати на нервову систему, і обмін речовин в організмі, та значно знижувати рівень ризику онкологічних захворювань. Але «живим» і корисним кефір може бути тоді, коли в його складі на кінець терміну придатності кількість життєздатних молочнокислих бактерій є не менше ніж  $10^7$  колонієутворюючих одиниць в 1 г, а кількість дріжджів – не менше ніж  $10^3$  колонієутворюючих одиниць в 1 г кефіру.

### Властивості закваски:

Сфери застосування:

- Закваски використовуються для виробництва кисломолочних пробіотичних продуктів: кефіру , сметани , йогурту ;.
- використовуються в медицині для виготовлення про біотичних препаратів
- Заквашувальні композиції використовуються в сільськогосподарській сфері.

Задачею роботи, є одержання заквашувальної композиції для виготовлення кефіру та кефірних напоїв з використанням дріжджів *S.kefir* та помірним рівнем газоутворення зі збереженням полівидового складу та симбіотичних відносин складових мікроорганізмів, притаманних природній асоціації кефірних грибків, інтенсифікація та спрощення технологічного процесу його виробництва, забезпечення високих показників активності та швидкості реактивації під час внесення бактеріального концентрату у молоко, подовження строку придатності до зберігання кисломолочного продукту виробленого з використанням бактеріального концентрату.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Зеленяк Д.О.				Літ.	Арк.	
Перевір.		Карлаш Ю.В.					Аркушів	
Консультант								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту		14	65 11
					<b>Кафедра БТМ</b>			

Це досягається за рахунок збагачення природного симбіозу грибкової кефірної закваски мікрофлорою, виділеною виключно з кефірних грибків: молочнокислими бактеріями видів *Lactococcus lactis sp. lactis*, *Lactococcus lactis sp. lactis biovardiacetilactis*, *Streptococcus thermophilus* та дріжджами *Saccharomyces kefir*, не здатними до збродження лактози.[3]

При виробництві заквашу вального бактеріального концентрату для кефіру, використовуються неферментуючі лактозу дріжджі *Saccharomyces kefir*. Основним продуктом культивування *Saccharomyces kefir* є біомаса.

Містить суху залишкову вологу W 3-5%

Концентрація в свіжевиготовленому продукті –  $1 \cdot 10^3$  КУО/г.

При використанні даного бактеріального концентрату ,через 3 години сквашування молочної основи , титрована кислотність складала 32 °Т.[3]

**Органолептичні показники:** Суха біомаса – це порошкоподібна речовина , з щільною консистенцією , жовтуватим відтінком, що володіє характерним запахом. [5]

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

У зв'язку з широким використанням мікробних культур як продуцентів різних продуктів виникає нагальна потреба в отриманні біомаси мікроорганізмів, що володіють цінними біосинтетичними властивостями. Загальна схема біотехнологічного процесу включає ряд основних етапів: пошук кращих для цієї мети мікроорганізмів; отримання посівного матеріалу (інокулята); підготовка поживного середовища; вирощування виробничої культури; контроль виробництва; виділення цільового продукту.

Культивувати мікроорганізми може відбуватися поверхневим або глибинним, періодичним або безперервним способом, в аеробних та анаеробних умовах.[1,4]

Цільовим продуктом є біомаса, одержана культивуванням факультативно анаеробних дріжджів *Saccharomyces kefir*, що будуть застосовані в якості дріжджового компоненту заквашувального бактеріального концентрату для виготовлення кефіру. Тож для обрання найбільш ефективного біологічного продуцента, порівняймо за властивостями два агента.

Для порівняльної характеристики та вибору продуцента розглянемо наступні агенти: *Saccharomyces kefir* IMB У-5040 та *Candida kefyr*. ТИММ 5100.

Узагальнена характеристика особливостей *Saccharomyces kefir* як одного з компонентів заквашувальної композиції наведено у таблиці 2.1

Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата	НОУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ		
Розробив		Зеленяк Д.О.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В				16	65 13
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента		

Таблиця 2.1

**Обґрунтування вибору біологічного агента для одержання біомаси на основі дріжджів видів *Sacharomyces kefir* та *Candida kefir***

Біологічний агент	Склад поживного середовища: , г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація продукту г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
1	2	3	4	5	6
<i>Sacharomyces kefir</i> IMB У-5040 (у складі заявленого бактеріального концентрату)	Глюкоза – 20 Пептон – 10 Автолізат дріжджів - 5	72	7,2	25°C , підтримуємо рН на рівні 6,6 , до накопичення біомаси 7.2 г , 6 %-вим розчином NaOH.	Гудима Вікторія Вікторівна , Кігель Наталя Федорівна , Даниленко Світлана Григорівна. Спосіб одержання бактеріального концентрату прямого внесення на основі грибової кефірної закваски <a href="https://uapatents.com/10-98914-sposib-oderzhannya-bakterialnogo-koncentratu-pryamogo-vnesennya-na-osnovi-gribkovo-kefirno-zakvaski.html">https://uapatents.com/10-98914-sposib-oderzhannya-bakterialnogo-koncentratu-pryamogo-vnesennya-na-osnovi-gribkovo-kefirno-zakvaski.html</a>
<i>Candida kefir</i> . ТІММ 5100(у складі бактеріального концентрату К-2)	Дріжджовий екстракт-7.5 Глюкоза -30 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2 MnSO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O-0.2 MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O-0.05	24	6.8	26-28 °С. рН (6,5±0,1)	Спосіб виробництва бактеріального концентрату К-2 на основі грибової культури "Київська К-1" [ТУ У 577/49-1-92] <a href="https://ipro.ua.com/inv/pdf/o5eaefv3-description.pdf">https://ipro-ua.com/inv/pdf/o5eaefv3-description.pdf</a>

В складі даного поживного середовища , в якості джерела вуглецю , використовуєто глюкозу , в якості джерела азотного живлення - пептон. В роді стимулятора росту - дріжджовий автолізат[6]

При виборі біологічного агенту , варто враховувати концентрацію цільового продукту , тривалість виробничого культивування , та характеристики поживного середовища. Проаналізувавши дані, наведені в табл. 2.1, можна зробити висновки , що штам *Saccharomyceskefir* IMB У-5040 має більші показники концентрації біомаси. Тривалість культивування штаму *Saccharomyceskefir* IMB У-5040 – становить 72 години; *Candidakefyr*. ТИММ 5100 впродовж 24 годин.

Наступним етапом , порівняємо вартість поживних середовищ (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

### Порівняльна таблиця вартості поживного середовища

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація уПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента(грн)на1л середовища	Джерело інформації(1,2,)*
1	2	3	4	5	6
<i>Saccharomyces kefir</i> IMB У-5040	пептон	10	570	5.7	4
	глюкоза	20	33	0.66	2
	Дріжджовий автолізат	5	1100	5.5	3
	<b>Вартість 1л середовища – 11.86</b>				
<i>Candidakefyr</i> ТИММ 5100	Дріжджовий автолізат	7.5	1100	8.25	3
	Глюкоза	30	33	0.99	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	160	0.32	2
	MnSO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0.1	60	0.006	3
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0.05	30	0.0015	3
	<b>Вартість 1 л середовища – 9.56</b>				

Примітка. \* – Ціни наведено станом на березень 2022 р.

- <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>;
- [https://snabhim.com.ua/glyukoza?gclid=CjwKCAjw07qDBhBxEiwA6pPbHjIkYSn3lR3FbrvpFokyYQnmq3yqiywG8zZxwKOzNCSdb-n9XzRKphoC4csQAvD\\_BwE](https://snabhim.com.ua/glyukoza?gclid=CjwKCAjw07qDBhBxEiwA6pPbHjIkYSn3lR3FbrvpFokyYQnmq3yqiywG8zZxwKOzNCSdb-n9XzRKphoC4csQAvD_BwE;);
- <https://prom.ua/ua/brands/Prym>
- <https://prom.ua/ua/p505591948-pepton-fermentativnyj.html>

Інформація, наведена у табл. 2.2, показує, що поживне середовище для культивування штаму *Saccharomyces kefir* IMB У-5040 є дорожчим, ніж середовище для *Candida kefir* TIMM 5100.

**Розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3).**

*Таблиця 2.3.*

**Порівняльна таблиця умовної вартості поживного середовища**

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного концентрату за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту грн/г
<i>Saccharomyces kefir</i> IMB У-5040	7,2	72	0,096	11,86	1,64
<i>Candida kefir</i> TIMM 5100	6.8	24	0.229	9.56	1,41

*Saccharomyces kefir* відрізняється нижчою умовною вартістю 1 г біомаси, яка складає – 1.64 грн/л, в той час як *Candida kefir* TIMM 5100 – 1.41 грн/л. Також концентрація біомаси *Saccharomyces kefir* є вищою, проте і зростає на більш дорогому поживному середовищі, там має більший час культивування. Проте, кефірні закваски, отримані з використанням дріжджів *Saccharomyces kefir*, відрізняються довшим терміном зберігання, сквашувальною активністю, та стійкістю до ліофілізації.

Отже, проаналізувавши дані з таблиць, робимо висновок, що оптимальним буде культивування штаму *Saccharomyces kefir* IMB У-5040 в якості компоненту заквашувальної композиції для кефіру, зважаючи на достатньо високий вихід продукту (7.2 г/л), та високі якісні показники отриманого цільового продукту. Також слід зазначити, що саме *Saccharomyces kefir* IMB У-5040 є найбільш вивченим і типовим штамом дріжджів, що використовується при виробництві кеірних заквашувальних композицій.

**2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента**

**Фізіолого-біохімічні ознаки *Sacharomuces kefir***

- уреазна активність негативна;
- не утворює органічних кислот;
- не утворює ефірів;

- утворює крахмалоподобні з'єднання;
- зброджує глюкозу, сахарозу, інουλін.

Продукт, який синтезується штамом в результаті бродіння - етанол. Тривале зберігання здійснювати при температурі 4-10 ° С на сусло-агарі, середовищі Сабуро; або ж методом ліофілізації.

#### **Морфолого-культуральні ознаки.**

- клітини дріжджів *S. kefir* мають овальну форму;
- грампозитивні дріжджі;
- довжина клітин  $5 \pm 0,02$  мкм, ширина клітин  $5 \pm 0,02$  мкм;
- нерухомі;
- клітини дріжджів розташовані як поодинокі, так і групами;
- утворюють одну спору в сумці.
- за відношенням до кисню – факультативний анаероб

На поверхні агаризованого середовища (сусло-агар і сер. Сабуро) через 24 години при температурі 30 ° С утворюють:

- колонії великого розміру;
- овальної форми;
- поверхня гладка, матова, непрозора;
- характер контуру краю хвилястий;
- сірувато-білий колір;
- струйчатая структура;
- консистенція в'язка. [8]

#### **Умови росту та субстрат (потреби у вуглеці, азоті та вітамінах)**

*S. Kefir* - це дріжджі, не здатні до ферментації лактози. Сполуки, які *S. Kefir* може використовувати як субстрат представлені у таблиці (таблиця 2.3)

*S. Kefir* не зброджують лактозу, але зброджують інші цукру. Ці дріжджі можуть розвиватися тільки в сумісній культурі з мікроорганізмами, які володіють  $\beta$ -галактозидазною активністю і здійснюють гідроліз молочного цукру до глюкози і галактози. До таких дріжджів належать більшість видів роду *Saccharomyces*.

Даний біологічний агент є продуцентом вітамінів групи В, та антибіотичних речовин, що пригнічують розвиток туберкульозної палички та інших патогенних мікроорганізмів. Продукти життєдіяльності дріжджів активізують розвиток молочнокислих бактерій.

Найбільший ріст, спостерігався, коли джерелами вуглецю були глюкоза, сахароза, мальтоза, циклогексимід та сорбінова кислота. Крім того, *S. Kefir* здатний використовувати азотисті сполуки, що знаходяться в навколишньому середовищі (крім нітратів та нітритів), як єдине джерело азоту. *S. Kefir* асимілює етиламінкадаверин та лізин, які

зазвичай споживаються не всіма *Saccharomyces* (+) наявність зростання на даному субстраті , а (-) означає відсутність зростання.

	<b>Ассиміляція</b>	<b>Бродіння</b>
Глюкоза	(+)	(+)
Лактоза	(+) За деякими <i>S. Kefir</i>	(-)
Галактоза	(+)	(+)
Трегалоза	(+)	(-)
Сорбінова кислота	(+)	(+)
Сахароза	(+)	(+)
Мальтоза	(+)	(+)
Молочна кислота	(-)	(-)
Сукцинувати	(+)	(-)
Лізін	(+)	(-)
Кадаверин	(+)	(-)
Циклогексимід	(+)	(+)
Етанол	(+)	(+)
<i>p</i> - Кумарова кислота	(+)	(+)
Гліцерин	(+)	(+)
Етиламід	(+)	(+)
Вітаміни	(+)	(+)

Таблиця 2.4 Споживання різних вуглецевих, азотних та інших субстратів дріжджами *S. Kefir*[9]

### **2.3. Таксономічний статус біологічного агента**

За класифікацією Ейнсворта дріжджі виду *Sacharomuces Kefir* мають таке систематичне положення :

Домен-*Eukarya*  
Царство-*Fungi*  
Підцарство-*Dikarya*  
Тип-*Ascomycota*  
Підтип-*Saccharomycotina*  
Клас -*Saccharomycetes*  
Порядок-*Saccharomycetales*  
родина-*Saccharomycetaceae*  
рід-*Kazachstania*  
види-*K.Kefir/S.Kefir*  
Штам ІМВ У-5040, [10]

### РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

#### 3.1. Потреба у цільовому продукті

На вітчизняному ринку єдиним Українським виробником заквасок для ферментованих молочних продуктів є Державне дослідне підприємство інституту продовольчих ресурсів, Станом на сьогодні підприємство спеціалізується на виготовленні бактеріальних заквашувальних композицій.[11].

#### 3.2. Розрахунок потужностей виробництва

Станом на грудень 2012 року, в Україні було виготовлено 34.7 тис. тонн кефіру, класичне приготування кефіру, включає внесення закваски в кількості 5% від ростового середовища.[12]

Отже, загальна кількість закваски, для виготовлення кефіру за рік, становить 1.73 т.т. Враховуючи, що співвідношення компонентів в складі кефірних заквасок складає 1:1:1:1:1 на *Saccharomyces kefir*, буде припадати 347 т.

Враховуючи наявність вітчизняного ринку, і закордонних конкурентів, Запропоноване виробництво забезпечуватимемо потребу у 0,1 % ринку, тобто 0,347 т біомаси дріжджового компоненту заквашувальної композиції, для виготовлення кефіру. За попередніми розрахунками було обрано біологічний агент *Saccharomyces kefir*, що відрізняється невисокою вартістю поживного середовища, високими показниками виготовленого продукту, та відносно високою продуктивністю що становить  $P_{кр} = 7,2$  г/л.

Отже, виходячи з попередніх розрахунків, необхідно отримати 0,347 т. сухої біомаси за рік.

Тож, потужність запропонованого виробництва становитиме 0,347 т

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Зеленяк Д.О.			Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В					24	65
Консультант								
Н. КОНТР.								10
Затверд.		Стабніков В.П.					Кафедра БТМ	

### 3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Плануємо, що обрану кількість біомаси будемо виробляти протягом  $T_{рд}=340$  трудоднів. Біомасу дріжджів отримують з сухою залишковою вологою  $W=3-5\%$ , отже сухої речовини в продукті буде  $CP=0,96$ .

Потреба у біомасі *Saccharomyces kefir* складає  $G_{нт}=347$  кг/рік. Таку кількість біомаси потрібно виробити за  $T_{рд}=340$  днів. Обраний продуцент *Saccharomyces kefir* IMB Y-5040 здатний до максимального виходу біомаси за наступних умов ( $T_{ф}=72$  год,  $t=25$  °C, pH – 6,6, та за високої аерації) [12]. Відповідно до ГОСТ 34372-2017 вміст сухих речовин в готовому продукті складає  $CP_{гп}=0,96$ .

Для подальших розрахунків, необхідно визначити цикл роботи ферментеру  $T_{цф}=T_{ф}+T_{по}=72+8=80$  год. (де 72 год - виробничий біосинтез + 8 год. - підготовка обладнання). Коефіцієнт запасу  $K_1=1,1$ ; Втрати при виділенні готового продукту  $E_{св}=0,05$ .

Кількість продукту на добу становитиме:

$$G_{нтд}=G_{нт}/T_{рд}=347/340=1,02 \text{ кг/добу.}$$

Кількість біомаси за цикл:

$$G_{цк}=G_{нтд}\cdot T_{цф}/24=1,02\cdot 80/24=3,4 \text{ кг/цикл.}$$

Отриманий за одну ферментацію об'єм культуральної рідини, враховуючи можливі витрати при виділенні готового продукту:

$$V_{кр}=K_1\cdot G_{цк}\cdot CP_{гп}/P_{кр}(1-E_{св})=1,1\cdot 3,4\cdot 0,96/(7,2(1-0,05))=0,52 \text{ м}^3$$

Кількість ферментацій (циклів) за рік:

$$N_{цк}=G_{нт}/G_{цк}=347/3,4=102 \text{ циклів.}$$

#### Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Визначаємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері:

$$V_{ф}=V_{кр}/(1-E_{ф})=0,52/(1-0,1)=0,58 \text{ м}^3.$$

Кількість поживного середовища в ферментері:

$$V_{пс}=V_{ф}/(1+X_{ф})=0,58/(1+0,05)=0,53 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{пмф}=V_{ф}-V_{пс}=0,58-0,53=0,05 \text{ м}^3.$$

Враховуючи, що обраний коефіцієнт заповнення ферментера  $K_3=0,6$ , з високим ступенем аерації, приблизний геометричний об'єм ферментера буде становити:

$$V_{гф} = V_{ф} / K_3 = 0,58 / 0,6 = 0,96 \text{ м}^3.$$

За таблицею, поданою в методичних рекомендаціях геометричний об'єм ферментер буде дорівнювати  $1 \text{ м}^3$ .

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси *Saccharomyceskefir IMB Y-5040*

При виробничому біосинтезі, отримуєть культуральної рідини за один цикл  $V_{кр} = 0,52 \text{ м}^3$

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу становитиме :

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 0,52 / (1 - 0,1) = 0,57 \text{ м}^3.$$

Біосинтез здійснюється в ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1} = 0,57 \text{ м}^3$ . Враховуючи коефіцієнт заповнення  $K_3 = 0,6$ , можливий геометричний об'єм ферментера становить:

$$V_{ф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 0,57 / 0,6 = 0,95 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 1 \text{ м}^3$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 0,57 / 1 = 0,57.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 570 / (1 + 0,1) = 520 \text{ л}$$

де  $X_{ф} = 0,1$  -доза посівного матеріалу для ферментеру.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 570 - 520 = 50 \text{ л}$$

Для одержання 50 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованої суміші газів які становлять 10 – 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 50 / (1 - 0,1) = 55 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища, тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 55 / (1 + 0,1) = 0,05 \text{ м}^3 = 50 \text{ л}$$

де  $X_{\text{па}} = 0,1$  - доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 55 - 50 = 5 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{\text{роб.2}} = 55$  л можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 55 / 0,6 = 92 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат  $V_{\text{сф}} = 100$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 55 / 100 = 0,55$$

Оскільки даний коефіцієнт заповнення лежить в межах 0,5 – 0,6, коефіцієнт обрано вірно

$$\text{Отже, } V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - (1 - E_{\text{ін}})) = 5 / (1 - 0,05) = 5,3 \text{ л}$$

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 5,3 / (1 + 0,1) = 4,8 \text{ л}$$

де  $X_{\text{ін}} = 0,1$  - доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 5,3 - 4,8 = 0,5 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{\text{роб.3}} = 5,3$  л можна одержати під час культивування дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 5,3 / 0,6 = 8,8 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат  $V_{\text{сін}} = 10$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 5,3 / 10 = 0,53$$

Оскільки даний коефіцієнт заповнення лежить в межах 0,5 – 0,6, коефіцієнт обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для засіву інокулятора  $V_{\text{пмз}} = 0,5$  л можна одержати культивуванням дріжджів на качалочних колбах. Для цього використовують колби  $V_{\text{колб}} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$

Враховуючи, що втрати при вирощуванні посівного матеріалу в колбах практично відсутні  $V_{\text{роб4}} = V_{\text{пмз}}$  При цьому кількість колб для отримання посівного матеріалу буде становити:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{роб4}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 500 / (750 \times 0,2) = 3,3 \text{ колби.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колби.

Процес вирощування посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси *Saccharomyces kefir* у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$ , з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 стадії

Розподіл об'ємів ПС та ПМ по апаратам представлено ц таблиці 3.1.

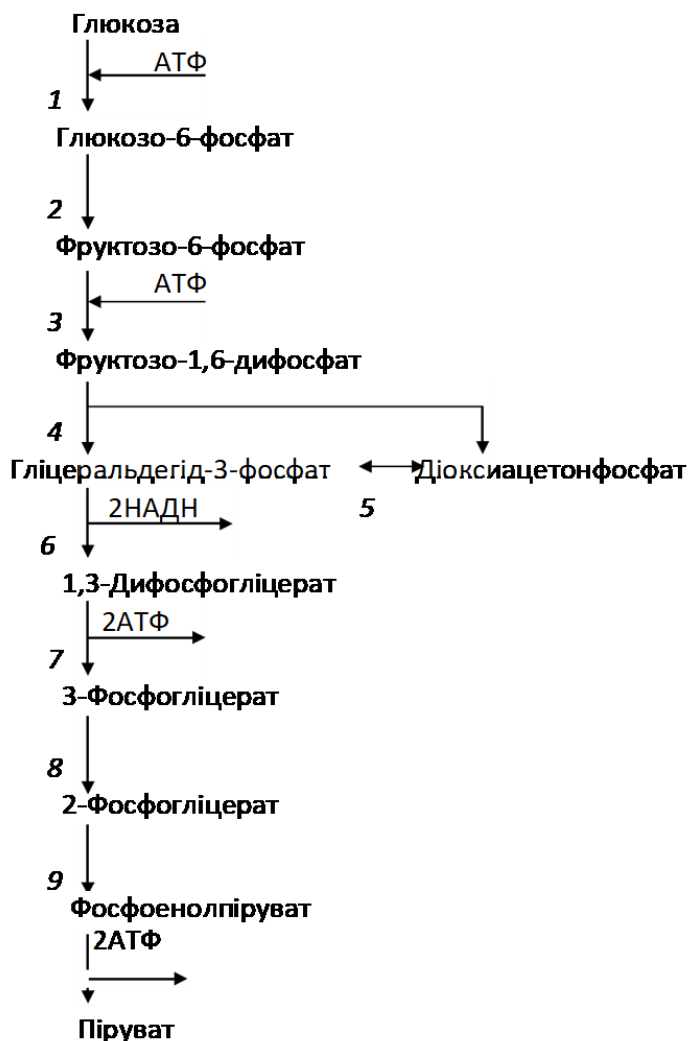
Таблиця 3.1.

№ стадії	Тип апарата	Геометричний об'єм апарата $V_{\text{г}}, \text{л}$	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{з}}$ , частка	Робочий об'єм апарата $V_{\text{роб}}, \text{л}$	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}, \text{л}$	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}, \text{л}$	Найближчий об'єм апарата, л
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Колби, шт	4 шт	0,2	0,5	0,45	0,05	0,75
2.	Інокулятор	10	0,53	5,3	4,8	0,5	8,8
3	Посівний апарат	100	0,55	55	50	5	92
4.	Ферментер	1000	0,57	570	520	50	950

## РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

**4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента *Saccharomyces Kefir* як джерело вуглецю, може використовувати глюкозу, мальтозу, сахарозу, сорбінову к-ту. Середовище для культивування, містить в своєму складі розчинену глюкозу [4].**

В *sacharomyces Kefir* , функціонує шлях Ембдена—Меєргофа—Парнаса(гліколіз) [13]



10

Рис.4.1. Катаболізм глюкози в *sacharomycesKefir*. ( Гліколіз )

Ферменти:

- 1 – гексокіназа;
- 2 – глюкозофосфатізомераза;
- 3– фосфоглюкокіназа;
- 4–фруктозодифосфатальдолаза;
- 5-триозотіофосфатізомераза;

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив	Зеленяк Д.О.				Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.					36	65 <sup>15</sup>
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

- 6-гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа;
- 7-фосфогліцераткіназа;
- 8-гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза,;
- 9 – енолаза;
- 10-піруваткіназа. [13]

Гліколіз – центральний шлях катаболізму глюкози. Це складний ферментативний процес складних перетворень глюкози, який протікає у тканинах людини і тварини без використання кисню. Гліколіз включає хімічні перетворення 3-х різних типів:

- Розпад вуглецевого скелету глюкози з утворенням пірувату (шлях атомів вуглецю);
- Фосфорилування АТФ високоенергетичними сполуками і утворення АТФ (шлях фосфатних груп);
- Перенесення водневих атомів або електронів (шлях переносу електронів).

Гліколіз проходить у десяти послідовних реакціях, кожна каталізується певним ферментом. Ферменти гліколізу є у розчиненому стані і містяться у напіврідкому середовищі клітини – цитозолі. 10 стадій поділені на 2 етапи: підготовчий та основний. Підготовчий етап це розщеплення ланцюга гексози до 2-х тріоз. Для цього використовується енергія у вигляді двох молекул АТФ. Другий – основний етап, у якому енергія запасується у вигляді 4-х молекул АТФ. Загальний вихід гліколізу – 2 молекули АТФ.

## РОЗДІЛ 5 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1 Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Асептичні умови при культивуванні, забезпечуються дотриманням стерилізаційних норм. Здійснюється стерилізація робочого обладнання, комунікацій та середовища для культивування. [3,4,15]

Оскільки даний штам є мезофілом, оптимальною температурою для культивування *Saccharomyces kefir* IMB У-5040 є 25 °С, оптимальне значення кислотності середовища лежить в межах рН - 6.6, по цій причині, є ризик контамінації сторонніми мезофілами. Тому обране виробництво, вимагає необхідності забезпечення асептичних умов при культивуванні.

Дані умови неможливо забезпечити при поверхневому культивуванні. По цій причині, накопичення біомаси *Saccharomyces kefir* для заквашувальної композиції здійснюватиметься глибинним способом. [1,3]

- Асептичні умови забезпечуються стерилізацією наступних елементів: обладнання і комунікацій,
- поживного середовища,
- аераційного повітря, (необхідного для забезпечення росту *S. kefir*).
- Створенням надлишкового тиску в ферментерах, шляхом подачі аераційного повітря.

Безперервне культивування має суттєві переваги перед періодичним, При ньому, теоретично, дріжджі здатні до експоненціального росту, в умовах постійної подачі поживного середовища та відділенням, та виводом частини біомаси та середовища. При цьому, фактичний обсяг культури залишається постійним [16].

Однак для невеликих об'ємів культур, забезпечення безперервного процесу буде надто затратним та нерентабельним. Також періодичний спосіб культивування, відрізняється меншими затратами, зручністю, та можливістю забезпечення стерильності при культивуванні.

Тож для культивування продуцента *Saccharomyces kefir* IMB У-5040, буде застосовано періодичний спосіб культивування.

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Зеленяк Д.О.			РОЗДІЛ 5 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В					32	65
Консультант						17		
Н. контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Характеристики та конструкція ферментеру , буде залежати від умов культивування біологічного агента. Після визначення способу культивування та аналізу фізіолого-біохімічних особливостей продуцента, необхідно підібрати характеристики ферментера, для забезпечення даних умов:

1. Так як *Saccharomyces kefir* факультативним анаеробом , тому ферментер має бути оснащений барботером для подачі кисню.
2. Для інтенсифікації масообмінних процесів та покращення процесу гомогенізації, ферментер буде оснащено мішалкою , з частотою обертів 100 об/хв.
3. Для підтримки сталої температури на рівні в 25°C , ферментер оснащується сорочкою та температурним датчиком.
4. Для контролю рівня рН , ферментер оснащується датчиком рН.

Серед ферментерів місткістю 1000 л було обрано промисловий апарат фірми «BIORUS». Ферментер оснащений клапаном для взяття проб, засівним пристрійем,трубопроводом для перекачування , та мішалками.[17]



Рис.5.1. Ферментер «BIORUS»

## 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Так як дані дріжджі є факультативними анаеробами , для активного синтезу біомаси дріжджів *Saccharomyces kefir* , необхідно забезпечити аерацію, оскільки за анаеробних умов дріжджі здійснюють спиртове бродіння та призупиняють нарощення цільового продукту(біомаси).

Враховуючи перелічені причини ,етап підготовки стерильного аераційного повітря , є важливою стадією виробничого процесу Аераційне повітря для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу , стерилізують за допомогою системи фільтрів грубої та індивідуальної фільтрації. Забір повітря здійснюється в головному повітряному колекторі , яке надходить до фільтрів грубої очистки , після чого подається до індивідуальних фільтрів , що встановлені безпосередньо перед кожним ферментаційним апаратом. [18-1]

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

При необхідності проведення дезінфекційних заходів на підприємствах ХП допускається застосування лише тих дезінфікуючих та мийних засобів , що пройшли перевірку , та були внесені до Державного мийних засобів, і при умові наявності Свідоцтва про державну реєстрацію дезінфекційного засобу встановленої форми.

Проаналізувавши їх вартість та врахувавши

Проаналізувавши характеристики засобів , об'єми обладнання та площу виробничих приміщень, були зроблені наступні висновки:

- для миття виробничого обладнання, інвентарю, комунікацій, т доцільно використовувати мийний засіб Біомой;
- для миття та дезінфекції таких елементів як стіни, підлога, вікна та дверей – «HelpixSanity»

Він є універсальним мийно-дезінфікувальним засобом, тому його використання , дозволяє заощадити кошти. [19]

«Біомой» – багатокomпонентний, поліфункціональний, біоактивний мийний засіб з дезінфікуючим ефектом. Добре розчиняється у воді. Здатний легко видаляти білково-жирову плівку, добре змивається, не залишає нальоту на оброблюваних поверхнях. Не містить екологічно небезпечних компонентів , та відноситься до 4 рівня безпеки[20]

Обробка обладнання включає в себе :

- Миття ферментера (1000 л)
- посівного апарата (100 л)
- інокулятора (10 л)
- реакторів-змішувачів для трьох стадій культивування

Обробка буде здійснюватись з використанням СІР-мийки. Кількість мийного засобу буде відповідати половині об'ємів всього обладнання. Загальні витрати робочого розчину складатимуть 633 л.

#### 5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез біомаси (7,2 г/л за 72 год) досягається за умов росту штаму *Saccharomyceskefir IMB Y-5040* на середовищі даного складу (г/л):[3]

- Глюкоза– 20;
- пептон – 10;
- автолізат дріжджів- 5;

Виходячи з розрахунків наведених у розділі 1 виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup>, що містить 0,52 м<sup>3</sup> поживного середовища. Одержання інокуляту буде відбуватись у три етапи ( у колбах , посівному апараті , та інокуляторі).

#### Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу для вирощування в колбах у термостаті

На першому етапі , буде здійснюватись вирозування посівного апарату в колбах на качалках. На даному етапі необхідно 0.45 л поживного середовища. Стерилізація буде проходити в автоклаві об'ємом 5 л. Всі компоненти стерилізуємо при температурі 112 С, 30 хв.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 450 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
глюкоза	9	9	А	450
Дріжд жовий автолізат	4.5	4,5		
пептон	2.25	2,25		
вода	-	450 мл.		

#### Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

На даному етапі потрібно приготувати 4.8 л поживного середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4.8 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
глюкоза	20	96	А	5.3
Автолізат дріжджів	10	48		
пептон	5	24		
вода	-	5.3 л		
Конденсат		0.53		
Всього				5.8

Композиція А буде стерилізуватись насиченою парою безпосередньо в інокуляторі об'ємом 10 л.

### Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

На даному етапі потрібно приготувати 50 л поживного середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 50л середовища, г	композиції	Об'єм композиції, V,л
глюкоза	20	1000	А	55
Автолізат дріжджів	10	500		
пептон	5	250		
вода	-	50		
конденсат	-	5		
Всього				55

Композиція А буде стерилізуватись насиченою парою безпосередньо в інокуляторі об'ємом 100 л.

### Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

На даному етапі потрібно приготувати 520 л поживного середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 520л середовища, г	Композиції	Об'ємко мпозиції, V, л
--------------------------------	------------	---	------------	------------------------

Глюкоза	20	10 400	А	530
Атолізат дріжджів	10	5 200		
пептон	5	2600		
вода	-	520 л.		
конденсат	-	52 л.		
Всього				570

Стерилізація Композиції А буде відбуватися насиченою парою безпосередньо у ферментері.

Представлене виробництво, не вимагає наявності збірників, оскільки поживне середовище, стерилізується однією композицією, і може бути здійснене, безпосередньо в ферментаційних апаратах.

## РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Містить механічну сітку для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубого очищення повітря G-3 E = 80 %
К-3	Компресор	1	Безмасляний, поршневий компресор PromInstrument PI-900V8-140, 140 л/хв,
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач стисненого повітря WHE 2018, продуктивність 160 л/хв, максимальний тиск - 25 бар.
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний "УКРГАЗКОМПЛЕКТ-2010"
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник «SWEP B25THx16/1P-SC-M 4x1"&22U»
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр ХЕПА скляні волокна діаметром 0,25... 1,0 мкм

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Зеленяк Д.О.				Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						39	65 22
Консультант						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Закінчення табл.б.1

Н-19	Насос роторний	1	Насос роторный НР-10 (ВЗ-ОРА-10). 10 м <sup>3</sup> /год
ІН-13	Інокулятор	1	Інокулятор, об'ємом 10 л.
ІФ-8 ІФ-16 ІФ-17	Фільтри індивідуальної очистки	3	Панельний фільтр тонкої очистки Alter Air
ПС-14	Посівний апарат	1	Ферментер РФ-100 об'ємом 100 л.
ФР-17	Ферментер	1	Ферментер фірми Biorus об'ємом 1 м <sup>3</sup> .
Р-10 Р-12 Р-15	Реактор-змішувач	3	Реактор-змішувач Об'ємом 100 л та 600 л.
ДЗ - 9 ДЗ - 11	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор для сипучих продуктів NPF-3000-201 Hualian

## РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

Технологічна схема синтезу біомаси *Saccharomyceskefir IMB Y-5040* передбачає допоміжні роботи, до яких відноситься підготовка та стерилізація, поживного середовища; технологічний процес: підготовка посівного матеріалу, та виробничий біосинтез. Технологічну схему наведено в графічній частині проекту.

### **ДР 1. Підготовка аераційного повітря.**

#### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Забір повітря, здійснюється через забірну шахту, на висоті 8-10 м, в найчистішій ділянці підприємства. Для видалення механічних забруднень повітрязабірник містить металеву сітку.

#### *ДР 1.2. Очищення атмосферного повітря від грубих домі*

Очистка здійснюється на фільтрі грубої очистки. Ефективність становить  $E = 80\%$ .

#### *ДР 1.3. Компресування повітря*

Для знищення контомінуючої мікробіоти в повітрі та забезпечення умов аерації, очищене повітря, після проходження основного фільтру, подається до компресору, де піддається нагріванню до  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , при тиску  $0,3\text{ МПа}$ .

#### *ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи з повітря*

Стиснене в компресорі повітря, надходить до теплообмінника-охолоджувача, в якому проходить видалення з нього надлишкової вологи, шляхом охолодження до температури до  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ресивер усуває пульсації руху повітря, що впливають на функціонування послідовних фільтрів очищення повітря та видаляє з повітря зайву вологу, до рівня  $60-70\%$ .

#### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Далі повітря подається до теплообмінника-нагрівача, де проходить його нагрівання до  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , та зменшення вологості до рівня  $40\%$ .

#### *ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі*

Після проходження теплообмінника-нагрівача, нагріте повітря буде подаватися в головний фільтр, установлений безпосередньо перед ферментаційними апаратами.

Ступінь очищення повітря на даному етапі становить  $95\%$

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Зеленяк Д.О.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В					40	65
Консультант								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						24 Кафедра БТМ		

### *ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Після проходження головного фільтру ,повітря буде подаватись в індивідуальні фільтри кожного ферментаційного апарата. Кінцевий рівень очистки повітря, на даному етапі, складатиме  $E = 99,995\%$  а к-ть мікроорганізмів КУО = 0.

## ***ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ.***

### ***ДР 2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокулянту у колбах .***

#### ***ДР2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А***

Наважку глюкози масою 2.25 г та дріжджового екстракту масою 4.5 відважують на технічних вагах та переносять до колби об'ємом 750 мл , та додають наважку пептону масою 2.6 г та додаючи 450 мл питної води , та перемішуючи до повного розчинення , після чого , колба закривається ватно-марлевою пробкою.

Стерилізацію середовища проводять в автоклаві за температурі 112°C упродовж 30 хвилин.

### ***ДР 2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі.***

На даному етапі , необхідно приготувати 4.8 л поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л. Загальна кількість води , необхідна для приготування середовища 5.3 л.

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

Наважку глюкози масою 96 г та дріжджового екстракту масою 24 г відважують через ваговий дозатор та переносять до інокулятора об'ємом 10 л , та додають наважку пептону масою 48 г та додаючи 5.3 л питної води , та перемішуючи до повного розчинення.

Стерилізацію середовища проводять в автоклаві за температурі 112°C упродовж 30 хвилин.

### ***ДР 2.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті.***

На даному етапі , необхідно приготувати 50 л поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л. Загальна кількість води , необхідна для приготування середовища 55 л.

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

Наважку глюкози масою 1 кг та дріжджового екстракту масою 250 г відважують через ваговий дозатор та переносять до посівного апарату об'ємом 100 л , та додають наважку пептону масою 500 г та додаючи 55 л питної води , та перемішуючи до повного розчинення.

Стерилізацію середовища проводять в автоклаві за температурі 112°C упродовж 30 хвилин.

***ДР 2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.***

***ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції А***

Наважку глюкози масою 10.4 кг та дріжджового екстракту масою 2.6 кг відважують через ваговий дозатор та переносять до посівного апарату об'ємом 1000 л , та додають наважку пептону масою 5.2 кг та додаючи 520 л питної води , та перемішуючи до повного розчинення.

Стерилізацію середовища проводять в автоклаві за температури 112°C упродовж 30 хвилин.

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

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

Отриману колекційну культуру підтримують методом виснажувального штриха , пересівання у чашку Петрі з сусло-агаровим середовищем.

***ТП 3.2. Одержання робочої культури.***

Одержані ізольовані колонії від ТП 3.1 пересівають петлею у пробірки з аналогічним поживним середовищем. Культивують у термостаті за температури 25 °С протягом 72 год.

***ТП 3.3. Вирощування інокуляту у колбах в термостаті***

Для вирощування посівного матеріалу, на даному етапі , розчин композиції А(від ДР 2.1.1) вносимо до колби об'ємом 750 мл. Та перемішують. З пробірки з робочою культурою *Saccharomyces kefir IMB У-5040*, відбирається суспензія , яку вносимо до колби з підготовленим поживним середовищем. Колба закривається гумовою пробкою.

Посівний матеріал вирощують протягом 72 годин , після чого отриманий посівний матеріал переносять до засівної колби об'ємом 1 л та закривають гумовою пробкою.

***ТП 3.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі***

До інокулятора об'ємом 10 л , вноситься композиція А (від ДР 2.2.1)

До підготовленого середовища , в стерильних умовах, через засівну колбу , вноситься посівний матеріал(від ТП 3.3) Культивування здійснюється за температури 25°C , протягом 72 год. Під час культивування ,кожні 2 години, здійснюємо відбір проб для мікробіологічного контролю

***ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті***

В посівний апарат об'ємом 100 л , вноситься композиція А (від ДР 2.3.1)

До підготовленого середовища , в стерильних умовах, через трубу перетискування, вноситься посівний матеріал(від ТП 3.4) Культивування здійснюється за температури 25°C , протягом 72 год. Під час культивування , кожні 2 години , здійснюємо відбір проб для мікробіологічного контролю

#### ***ТП 4. Виробничий біосинтез***

##### ***ТП 4.1 Виробничий біосинтез***

До ферментеру об'ємом 1000 л , вноситься композиція А (від ДР 2.4.1)  
До підготовленого середовища , в стерильних умовах, через трубу перетискування, вноситься посівний матеріал(від ТП 3.5) Культивування здійснюється за температури 25°C , протягом 72 год. Під час культивування , кожні 2 години , здійснюємо відбір проб для мікробіологічного контролю , та визначення концентрації цільового продукту. Припинення ферментації здійснюється при досягненні концентрації біомаси - 7,5 г/л

## РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

### 8.1. Карта постадійного контролю

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>ДР 1.1</i> Забір атмосферного повітря $K_T$	Повітрязабірник, та його висота	–	Під час придбання, та встановлення	$H = 10 \text{ м}$
<i>ДР 1.2</i> Грубе очищення повітря $K_T$	повітря на виході з фільтра, та ступінь очищення	згідно з паспортом	після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 80 \%$ тиск згідно паспорту
<i>ДР 1.3</i> Компресування повітря $K_T$	стиснене повітря тиск, та температура	манометр	після компресування	$P = 0,3 \text{ МПа}$ $t^\circ = 130 \text{ }^\circ\text{C}$
<i>ДР 1.4</i> Охолодження повітря та видалення вологи $K_T$	охоложене повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після охолодження повітря	$t^\circ = 18-20 \text{ }^\circ\text{C}$ $W = 60-70 \%$
<i>ДР 1.5</i> Нагрівання повітря $K_T$	нагріте повітря температура, вологість	термометр, психрометр	після нагрівання повітря	$t^\circ = 40-50 \text{ }^\circ\text{C}$ $W = 60 \%$
<i>ДР 1.6</i> Очищення повітря в головному фільтрі $K_T$	повітря на виході з головного фільтра, та його ступінь очищення	згідно з паспортом	після проходження через фільтр	$E = 95 \%$

НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		<i>Зеленяк Д.О.</i>			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		<i>Карлаш Ю.В.</i>					46	65
Консультант								28
Н. контр.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

<p><i>ДР 1.7</i> Очищення повітря в індивідуальному фільтрі K<sub>T</sub></p>	<p>повітря на виході з індивідуального фільтра, та його ступінь очищення</p>	<p>згідно з паспортом</p>	<p>після проходження через фільтр індивідуальної очистки</p>	<p>E = 99,995 %</p>
<p><i>ДР 3.1.1, 3.2.1</i> Приготування та стерилізація композиції А K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>композиція А температура, час, стерильність</p>	<p>манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно в ході стерилізації, мікробіологічний контроль – після проведення стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа t = 30 хв t° = 112 °C</p>
<p><i>ДР 3.3.1</i> Приготування та стерилізація композиції А K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>композиція А температура, частота обертання мішалки, час і температура стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>манометр технічний, датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура та швидкість перемішування підтримуються автоматично, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>n = 40 об/хв P = 0,05 МПа t° = 112 °C t = 30-40 хв</p>
<p><i>ТП 4.1</i> Підтримання колекційної культури K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>колекційна культура <i>Saccharomyces kefir</i> IMB Y5040 температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура – безпосередньо при зберіганні, мікробіологічний контроль</p>	<p>t° = 6 °C</p>
<p><i>ТП 3.2</i> Одержання робочої культури K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>робоча культура <i>Saccharomyces kefir</i> IMB Y5040 в пробірках</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль</p>	<p>t° = 25 °C t = 72 год</p>

	температура, час, мікробіологіч на чистота		ний контроль – після вирощування	
<i>ТП 3.2</i> Вирощування інокуляту в колбах у термостаті К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	посівний матеріал температура, час, мікробіологіч на чистота	термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічни й контроль	Температура - під час культивуванн я, мікробіологіч ний контроль – після культивуванн я	t° = 25 °C t = 72 год
<i>ТП 3.3</i> Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	посівний матеріал температура, час, швидкість перемішуванн я, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологіч на чистота	датчик температури та рН, годинник, тахометр, ротаметр, мікробіологічни й контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічн ий контроль – кожні 2 год і після культивування	pH = 6,6 t° = 25 °C t = 72 год X = 7,2 г/л
ТП 3.4 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 100 л К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub>	посівний матеріал температура, час, швидкість перемішуванн я, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологіч на чистота	датчик температури та рН, годинник, тахометр, ротаметр, фотометричний зчитувач оптичної густини, мікробіологічни й контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічн ий контроль –	pH = 6,6 t° = 25 °C t = 72 год X = 7,2 г/л

			кожні 2 год і після культивування	
<p><i>ТП 4.1</i> Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1 м<sup>3</sup> K<sub>T</sub>, K<sub>M</sub></p>	<p>культуральна рідина температура, час, швидкість перемішування, рН, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, рН, годинник, тахометр, ротаметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>t°, рН, швидкість перемішування та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси, концентрації живих клітин, мікробіологічний контроль – кожні 2 год</p>	<p>рН = 6,6 t° = 25 °С t = 72 год X = 7,2 г/л на кінець культивування;</p>

## 8.2. Мікробіологічний контроль

При біосинтезі дріжджів *Saccharomyces kefir* IMB У-5040, необхідно проводити відбір проб культуральної рідини через кожні 2 год. Проби відбираються для проведення мікробіологічного контролю, для запобігання контамінації сторонніми мікроорганізмами

Мікробіологічний контроль проводимо, визначенням кількості клітин що залишилися після проведення стерилізації. Метод заключається в здійсненні висіву зразків на агаризоване середовище, з подальшим аналізом колоній що утворилися, та подальшим визначенням видової приналежності. Використовують також і спеціальні біологічні індикатори (бактеріальні спори), які за визначених умов стерилізації гинуть з прогнозованою швидкістю. [21]

## **Кількісний облік мікроорганізмів шляхом підрахунку колоній(чашковий метод Коха)**

Даний метод використовується для аналізу поверхонь на предмет забруднення сторонніми мікроорганізмами , та для аналізу повітря в виробничому приміщенні

Цей метод є найбільш поширеним для визначення спільного мікробного забруднення різних субстратів. Суть чашкового методу заключається в проведенні висіву зразків досліджуваного матеріалу на чашках петрі з твердими поживним середовищем. Після визрівання в термостаті , проводиться аналіз утворених колоній , їх видова приналежність , кількість і тд.

Як поживне середовище для обліку бактерій застосовують м'ясопептонний агар, для підрахунку цвілевих грибів і дріжджів – сусло-агар.

В якості поживного середовища застосовуються наступні середовища:

- Для визначення сумарної чисельності мікроорганізмів - мясопептонний або рибопептонний агар
- Для підрахунку цвілевих грибів дріжджів – сусло-агар
- Для визначення чисельності різних фізіологічних груп і санітарно-показових мікроорганізмів використовують відповідні поживні середовища

Робота за таким методом включає три етапи:

- приготування розведень,
- посів на тверде поживне середовище в чашки Петрі
- підрахунок , та аналіз утворених колоній

Розведення готують у стерильній водопровідній воді або фізіологічному розчині (0,5% водний розчин NaCl), зазвичай використовують десятиразові послідовні розведення (1:10, 1:100, 1:1000 і т. п.).

**Хід виконання.** У стерильні чашки Петрі наливають розплавлену на киплячій водяній бані агаризоване середовище, по 20–30 мл в кожному. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки не захолоне агар. Потім їх витримують при 30°C кришками вниз для підсихання поверхні середовища в термостаті. Коли використовують елективні середовища або виділяють і обраховують мікроорганізми, що вимагають підвищеної вологості, посів проводять відразу ж або незабаром після застигання агару.

Посів роблять з певних розведень залежно від передбачуваної кількості мікроорганізмів в досліджуваному субстраті. Стерильною піпеткою наносять певний об'єм (зазвичай 0,05, 0,1 або 0,2 мл) відповідного розведення, заздалегідь ретельно перемішаного, на поверхню агарової пластинки в чашці Петрі. Цей об'єм розподіляють по поверхні середовища стерильним шпателем. Потім цим же шпателем проводять по всій поверхні в другій чашці, куди посівний матеріал не вносили. При виявленні мікроорганізмів, кількість яких в субстраті відносно невелика, посівний матеріал розподіляють по поверхні середовища тільки в одній чашці Петрі. З кожного розведення роблять 4–6 паралельних посівів. Для паралельних посівів з одного розведення можна користуватися однією стерильною піпеткою і одним шпателем. Для посівів з різних розведень, використовують нову стерильну піпетку і новий шпатель. Чашки із засіяним середовищем поміщають в термостат, відрегульований на певну температуру, сприятливу для розвитку мікроорганізмів, перевернувши їх догори дном.[22-23]

### **8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **8.3.1. Концентрація біомаси(цільового продукту)**

Визначення концентрації біомаси , проводимо ваговим методом

Цільовим продуктом запропонованого виробництва , є біомаса дріжджів *Sacharomyces kefir* , визначення її концентрації в складі культуральної рідини , проводимо ваговим методом.

**Принцип методу :** Метод заключається в центрифугуванні зразків культуральної рідини , з послідовним відділенням біомаси , та визначенням її маси.

Процес складається з трьох послідовних операцій:

- доведення маси центрифужних пробірок до постійного значення,
- відділення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини,
- визначення їх маси.

Найчастіше визначають масу сухих клітин, хоча іноді можна обмежитися визначенням сирої біомаси. У останньому випадку перший етап відпадає; достатньо тільки зважити центрифужну пробірку (фільтр), але не доводити її масу до постійного значення. Біомасу звичайно виражають в грамах або міліграмах на літр культуральної рідини.[23-24]

### 8.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту Визначення концентрації глюкози

Визначення проводять глюкозооксидазним методом.

Принцип методу заключається в здатності глюкози, у присутності ферменту глюкозооксидази, окиснюватися киснем з повітря, з утворенням перекису водню.

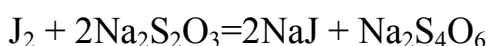
У присутності ферменту пероксидази, окиснювальна реакція пересу водню та ортотолоїдину призводить до утворення забарвленої сполуки, з насиченням забарвлення, відносно концентрації глюкози у зразку

Робочий реактив: в ацетатного буфері (80 мл) розчиняють глюкозооксидазу (2 мг) та пероксидазу (1 мг), додають 1%-ний розчин ортотолоїдину (1 мл), перемішують і доводять об'єм буферним розчином до 100 мл.

До супернатанту (1 мл) додають робочий реактив (3 мл) і обережно перемішують. Поступово починає з'являтися забарвлення, яке при кімнатній температурі досягає максимуму через 13-15 хв. Фотометрують при довжині хвилі 625 нм проти контрольного розчину (замість культуральної рідини містить фізіологічний розчин).

Розрахунок проводять за калібрувальним графіком, на одній осі якого відкладено концентрацію глюкози (ммоль/л), а на іншій – величину екстинкції. [25].

В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентному кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію:



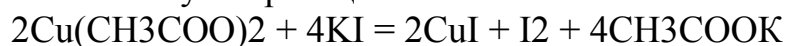
1 см<sup>3</sup> 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу Cu(RCHNH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub>. [25]

#### Визначення концентрації амінного азоту мідним способом

**Принцип методу** : Даний метод заключається в здатності пептидів та амінокислот до утворення розчинним сполук з міддю, та з їх подальшим йодометричним визначенням.

**Обладнання та реактиви**: колби, титрувальні бюретки, 2 мл досліджувального зразку, натрій гідроксид, ортофосфатний розчин, буферний розчин борату

**Хід роботи** : До визначеної кількості досліджуваного р-ну , до складу якого входять амінокислоти та пептиди В ході слабо лужної реакції , додають надлишок фосфорнокислої міді в складі боратного розчину , в ході чого , після збовтування до розчину переходять мідні солі амінокислот. Після чого , надлишок фосфату міді відфільтровують , а до утвореного р-ну додається оцтова к-та та йодистий калій , в хочу чого відбувається наступна реакція :



В ході реакції , йод що виділився, титрується розчином гіпосульфіту , в співвідношенні : мілілітр 0.01 н. .  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  – 0.28 мг амінного азату в складі досліджуваного зразку.[26]

## РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

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

**1. Санітарна підготовка виробництва.** Етап містить в собі щоденне прибирання приміщення з використанням миючих засобів «Біомой» та «HelpixSanity». Непридатний розчин зливається в каналізацію. Ємнічне обладнання миють за допомогою СІР-мийки з використанням засобу «Біомой». Після миття розчин потрапляє до збірника та може використовуватись повторно, а промивна вода надходить до каналізації. На цьому етапі утворюються великі об'єми рідких відходів.

**2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу.** Перед приготуванням середовища проводить перевірку сировини. Сировину яка не відповідає нормам не допускають. Стандартними твердими відходами є пакувальні матеріали від сировини. Даний етап є місцем емісії твердих відходів

**3. Підготовка посівного матеріалу .** В процесі етапа відбувається нарощування посівного матеріалу в інокуляторах.

Так як посівний матеріал використовується для засіву наступного ферментатора, відходи посівного матеріалу не враховуються. Так як *Sacharomyceskefir* факультативним анаеробом, виникає необхідність в аерації, тому під час культивування буде утворюватись невеликий об'єм відпрацьованого повітря.

Цей етап є місцем емісії невеликої кількості газоподібних відходів .

**4. Виробничий біосинтез.** *Sacharomyces kefir* культивується для отримання біомаси. Відпрацьоване повітря після аерації також утворюється в великих об'ємах. Після завершення біосинтезу культуральна рідина проходить центрифугування для відділення біомаси, тому даний етап є місцем емісії рідких відходів

### 9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

#### 9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Розрахунок об'ємів відходів. Для щоденного прибирання готують розчини «Біомою» концентрацією 0,3% та дезинфікувального засобу «HelpixSanity» концентрацією 1%. За один цикл виробництва витрачається 588 л робочого розчину «Біомою», який після миття зливається у каналізацію. Обладнання миють з використанням розчину

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив	Зеленяк Д.О.				РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В						54	65 36
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

«Біомой» та СІР-мийки, об'єм відходів за один цикл 633 л. Мийний засіб

«Біомой» відноситься до класу ІV безпеки, а тому є безпечним для навколишнього середовища. Узагальнена характеристика рідких відходів виробництва наведена у табл. 8.1.

Таблиця 9.1

**Характеристика рідких відходів під час виробництва *Sacharomyces kefir***

Назва складових відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва(л)	Клас небезпеки
0.3%розчин «Біомой»	алкілбензолсульфонат натрію (сульфанол) 5,0-8,0%; лужна протеаза 1,0-1,1% карбонат натрію; диспергатор; наповнювач	63 3	IV
	<b>Усього:</b>	<b>633</b>	

Заходи для зменшення об'ємів відходів. Для миття використовують СІРмийки, що дозволяє зменшити об'єми стічних вод та витрати миючого засобу, методом його повторного використання.

**Утилізація рідких відходів.** Біологічне очищення стічних вод пропонується проводити в аеротенках. Дані споруди представляють собою конструкції для біологічного очищення стічних вод, де цей процес відбувається в аеробному середовищі за інтенсивної подачі стиснутого повітря.

Процес перетворення органічних стоків здійснюється за рахунок активного мулу (конгломератів бактерій-нітрифікаторів), який перебуває у завислому стані завдяки інтенсивному перемішуванню води. Задля підтримання швидкості нітрифікації на заданому рівні частина активного мулу, яка виноситься з очищеною водою, відокремлюється та знову спрямовується в аеротенк.

Принцип функціонування: забруднена вода надходить до зони аерації, взаємодіє з активним мулом, який перемішується з повітрям, що подається через фільтроносні труби. У аеробних умовах органічно зв'язаний Нітроген (азот) перетворюється на амоній, який бактерії *Nitrosomonas* та *Nitrobacter* переводять відповідно у нітрити та солі нітратної (азотної) кислоти. Із зони аерації суміш оборотної води з активним мулом надходить до вбудованого відстійника з наступним осадженням мулу, фільтрацією води через завислий шар та денітрифікації[27]

### 9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Розрахунок об'ємів відходів. Після проведення етапів санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ на виробництві залишаються такі тверді відходи як пакувальна тара для мийних засобів і компонентів поживного середовища. Ці пакувальні матеріали виготовлені із поліетилену високої щільності, який піддається вторинній переробці

Таблиця 9.2

#### Характеристика твердих відходів під час виробництва дріжджів

##### *Sacharomyces kefir*

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Пластикова тара для мийних засобів	HDPE-3– Поліетилен високої щільності	1.8	IV
Пластикова упаковка для компонентів поживного середовища	HDPE-3–поліетилен високої щільності,	0.4	IV
	Усього	2.2	

**Утилізація твердих відходів.** Оскільки на виробництві невеликі обсяги твердих відходів, необхідності зменшення їхніх обсягів немає. Для утилізації тари від миючих засобів і компонентів поживного середовища їх потрібно попередньо відсортувати та відправити до пунктів прийому вторинної сировини. [28]

### 9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

**Розрахунок об'ємів відходів.** Газоподібні відходи утворюються на етапах підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування. Тривалість підготовки посівного матеріалу в інокуляторах становить 288 год, а виробничий біосинтез займає 72 год. Аерацію здійснюють зі швидкістю

1 л/лКР/хв. Для підготовки інокуляту використовують 1 ферментаційний апарат з робочим об'ємом 100 л та інокулятор з робочим об'ємом 10 л, а для виробничого біосинтезу 1 ферментер з робочим об'ємом 1000 л. Отже, приблизний об'єм відпрацьованого повітря за цикл ферментації становить: (таблиця 9.3)

Заходи для зменшення об'ємів відходів

Відпрацьоване аераційне повітря після фільтрування можна використовувати як тепло агент

Таблиця 9.3

#### Характеристика газоподібних відходів під час виробництва

##### *Sacharomyces kefir*

Назва Складової газоподібних відходів	Сировини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (м <sup>3</sup> )	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ	100.8	IV

**Утилізація газоподібних відходів.** Для очищення відпрацьованого

аераційного повітря, на виході повітря з ферментерів встановлюють фільтри тонкої очистки . [29-30]

#### **9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

Підчас біосинтезу дріжджів *Sacharomyces kefir* з використанням виділяється відносно невисока велика кількість відходів, проте вони не становлять загрози навколишньому середовищу.

До рідких відходів , відносяться стічні води, що утворюються на стадії санітарної підготовки виробництва. Очищення цих вод можна проводити в аеротенках за умов інтенсивної аерації.

Найбільшу кількість твердих відходів становить використана тара від санітарних засобів , а також можливий брак сировини

Найбільший об'єм становлять газоподібні відходи, а саме відпрацьоване аераційне повітря. Відпрацьоване аераційне повітря , після проходження фільтру , для позбавлення від спор продуценту , може бути застосоване в розпилювальній сушарці.

Таким чином, виробництво біомаси *Sacharomyces kefir* є екологічно безпечним та не має великої кількості відходів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Кігель Н. Ф. , Шульга Н. М., КЕФІР: СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА МІКРОФЛОРУ ТА ТЕХНОЛОГІЮ. ТИММ НААНУ Електронний ресурс[режимдоступу]:[http://dspace.nuft.edu.ua/bitstream/123456789/19761/1/kefir\\_suchashii\\_pogljad.pdf](http://dspace.nuft.edu.ua/bitstream/123456789/19761/1/kefir_suchashii_pogljad.pdf)
2. ЗВІТ про науково-дослідну роботу за темою № 86.08 „ ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ МІКРОФЛОРИ КЕФІРУ ТА РОЗРОБКА МЕТОДИЧНИХ ВКАЗІВОК ЩОДО ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ” Електронний ресурс[режим доступу]: <http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/zvit86.08.pdf>
3. Патент України на винахід № 98914. Спосіб одержання бактеріального концентрату прямого внесення на основі грибкової кефірної закваски / Даниленко С.Г., Гудима В.В., Кігель Н.Ф. Опубл. 25.06.2012. Електронний ресурс[режимдоступу] <https://uapatents.com/10-98914-sposib-oderzhannya-bakterialnogo-koncentratu-pryamogo-vnesennya-na-osnovi-gribkovo-kefirno-zakvaski.html>
4. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». – Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. – 312 с.
5. Сучасні способи активації процесів розмноження та ферментації пивоварних дріжджів Електронний ресурс[режимдоступу] <https://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/2564/1/Modern%20methods%20of%20processes.pdf>
6. ЗВІТ про науково-дослідну роботу за темою № 86.08 „ ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ МІКРОФЛОРИ КЕФІРУ ТА РОЗРОБКА МЕТОДИЧНИХ ВКАЗІВОК ЩОДО ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ” Електронний ресурс[режим доступу]: <http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/zvit86.08.pdf>
7. Електронний ресурс[режим доступу]: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12016>
8. Електронний ресурс[режим доступу]: <https://www.dissercat.com/content/vidovoe-raznoobrazie-mikroflory-kefirnykh-gribkov-v-severnoi-osetii-i-prakticheskoe-ispolzov>
9. Електронний ресурс[режим доступу]: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20059900/>
10. Електронний ресурс[режим доступу]: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21338789/>

11. Електронний ресурс [Режим доступу]:  
[http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:mcJSvsX\\_1JcJ:scholar.google.com/+інститут+продовольчих+ресурсів&hl=uk&as\\_sdt=0,5](http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:mcJSvsX_1JcJ:scholar.google.com/+інститут+продовольчих+ресурсів&hl=uk&as_sdt=0,5)
12. Електронний ресурс [Режим доступу]:  
[https://vuzlit.ru/256999/analiz\\_yakosti\\_kefiru\\_vitchiznyanih\\_virobnikiv](https://vuzlit.ru/256999/analiz_yakosti_kefiru_vitchiznyanih_virobnikiv)
13. Електронний ресурс[режим доступу]: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=bce&mapno=00010&mapscale=&show\\_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=bce&mapno=00010&mapscale=&show_description=show)
14. Гліколіз і катаболізм гексоз[режим доступу]:  
[https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2017/10/Lektsiia6\\_BE\\_hlikoliz.pdf](https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2017/10/Lektsiia6_BE_hlikoliz.pdf)
15. Saccharomyces Kefir: Biotechnological Potential and Present Status. [режим доступу]:[https://www.researchgate.net/publication/253953302\\_Saccharomyces\\_Kefir\\_Biotechnological\\_Potential\\_and\\_Present\\_Status](https://www.researchgate.net/publication/253953302_Saccharomyces_Kefir_Biotechnological_Potential_and_Present_Status)
16. Ващенко О.В. Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології для студентів напрямку підготовки 6091501 «Харчові технології та інженерія. – Харків: НТУ «ХПІ», 2008. –72с. Електронний ресурс[режим доступу]:  
<http://web.kpi.kharkov.ua/orgchem/wpcontent/uploads/sites/170/2017/02/Metod.Ukaz.lab.rab.Mikrob.1.pdf>
17. Електронний ресурс[режим доступу]: <https://bio-rus.ru/primeryi-specifikacziy/promyishlennyij-fermenter-biorus-1000-1-dlya-veterinarij.html>
18. Принципи класифікації, морфологія та будова клітин дріжджів Електронний ресурс[режим доступу]:  
<http://www.grandbiology.com/biols-1353-1.html>
19. Електронний ресурс[режим доступу]:  
<https://shop.helpix.ua/products/category/cleaning>
20. Електронний ресурс[режим доступу]: <https://farmakos.ua/bimoj.html>
21. Козырева И.И. ,Рамонова Э. В.,Хаев Д. Л.,Цугкиев Б.Г. Штамм saccharomyces Kefir вкпм у-3416, используемый для приготовления кисломолочных напитков. Електронний ресурс[режим доступу]:  
<https://findpatent.ru/patent/244/2449012.html>
22. Електронний ресурс[режим доступу]: <http://lua.pp.ua/3/205995.html>
23. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт. -

проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. К.: НУХТ, 2019. – 243-267 с.

24. Електронний ресурс[режим доступу]: [https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/48653/1/Biotekhnolohiia\\_ta\\_bioinzheneriia\\_%201](https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/48653/1/Biotekhnolohiia_ta_bioinzheneriia_%201)

25. Принцип глюкозооксидазного методу визначення глюкози. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://meduk.net.ua/archives/23315>

26. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Лабор. практикум для студ. напрям 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навчання /Уклад.: Л.М. Буценко, В.О.Красінько. – К.: НУХТ, 2011. – 82 с.

27. Електронний ресурс[режим доступу]: <https://conf.ztu.edu.ua/wp-content/uploads/2021/05/56-1.pdf>

28. БІОТЕХНОЛОГІЇ ПЕРЕРОБКИ ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІ .Електронний ресурс[режим доступу]: [https://knowledge.allbest.ru/ecology/2c0b65635b3bc79b5c43b89521216c37\\_0.html](https://knowledge.allbest.ru/ecology/2c0b65635b3bc79b5c43b89521216c37_0.html)

29. «Промислова та екологічна біотехнологія» . Електронний ресурс[режим доступу]: <https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-mzp18.pdf>

30. «УТИЛІЗАЦІЯ ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ» Електронний ресурс[режим доступу]: <https://core.ac.uk/reader/78066340>