

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СЕРЕБРЯКОВОЇ Валерії Вікторівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Консерванти мікробного походження для потреб сироробства»

керівник роботи ЛИЧ Інна Валентинівна, доцент, кандидат біологічних наук
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024р. № 876-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи: штам *Lactobacillus plantarum* для створення біоконсерванту, на основі бактеріоцину молочнокислої бактерії

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1.Огляд літератури РОЗДІЛ 2. Огляд літератури.РОЗДІЛ 3.Техніко-економічне обґрунтування вибору лікарського засобу. РОЗДІЛ 4.Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату) РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції (напівфабрикату)РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції (напівфабрикату) РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Проєкт заявки на корисну модель.

5. Перелік графічного матеріалу Технологічні схеми : післяферментаційних процесів аркуш формату А₁. Апаратурні схеми : післяферментаційних процесів аркуш формату А₁

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1.Огляд літератури.	01.10.24р.- 10.10.24р	
2	РОЗДІЛ 2. Огляд літератури.	11.10.24р.- 14.10.24р.	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	15.10.24р.- 18.10.24р.	
4	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату)	19.10.24р.- 20.10.24р.	
5	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції.	21.10.24р.- 24.10.24р.	
6	РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції (напівфабрикату).	25.10.24р.- 29.11.24р.	
7	РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.	30.10.24р.- 04.11.24р.	
8	РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель.	05.11.24р.- 08.11.24р.	
11	Оформлення апаратурних та технологічних схем	15.11.24р.- 19.11.24р	
12	Оформлення вступу та реферату	20.11.24 р.- 22.11.24р.	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Валерія СЕРЕБРЯКОВА
(ім'я та прізвище)

Інна ЛИЧ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технології та апаратурної схеми виділення та очищення бактеріоцину молочнокислої бактерії *Lactobacillus plantarum*. Розрахована річна потреба у виробництві бактеріоцину становить 70,8 кг, а потужність виробництва – 2140 л за цикл за 310 трудоднів.

Технологія виділення та очищення бактеріоцину складається з основних процесів (центрифугування культуральної рідини, ультрафільтрація, екстракція етилацетат та концентрування очищеного розчину бактеріоцину, сушіння у вакуумній сушарці, подрібнення, просіювання та фасування на лінії та пакування), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, восьми розділів, списку використаної літератури, технологічної (формат А1) та апаратурної схем (А1). Загальний обсяг роботи – 81 сторінки, 8 таблиць, 3 рисунки.

Ключові слова: бактеріоцин, молочнокислі бактерії, біоконсервант, виділення, очищення, інгібуюча активність, *Lactobacillus plantarum*, пробіотик.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technology and hardware scheme for the isolation and purification of bacteriocin from the lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum*. The calculated annual demand for bacteriocin production is 70.8 kg, and the production capacity is 2140 liters per cycle for 310 working days.

The technology for the isolation and purification of bacteriocin consists of the main processes (centrifugation of the culture liquid, ultrafiltration, ethyl acetate extraction and concentration of the purified bacteriocin solution, drying in a vacuum dryer, grinding, sieving and in-line packaging), which are given in the technical and administrative diagrams.

The qualification work consists of an introduction, eight chapters, a list of references, technological (A1 format) and hardware diagrams (A1). The total volume of the work is 81 pages, 8 tables, 3 figures.

Key words: bacteriocin, lactic acid bacteria, biopreservative, isolation, purification, inhibitory activity, *Lactobacillus plantarum*, probiotic.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ВСТУП.....	7
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.	
РОЗДІЛ 1. МІКРОБІОМА СИРІВ.....	9
1.1. Мікробіологічні процеси при виробництві сиру.....	9
1.2. Особливості мікробіологічних процесів при дозріванні різних видів сирів.....	12
1.3. Вади сирів.....	16
РОЗДІЛ 2. БІОКОНСЕРВАНТИ.....	17
2.1. Традиційні консерванти у технології сирів.....	17
2.2. Біоконсерванти як альтернатива антимікробних препаратів.....	21
2.3. Бактеріоцини молочнокислих бактерій.....	23
2.4. Технологічні аспекти одержання бактеріоцинів молочнокислих бактерій.....	24
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.	
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	29
3.1. Характеристика цільового продукту.....	29
3.2. Розрахунок потреби у цільовому продукті.....	36
3.3. Розрахунок річної потужності виробництва.....	39
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату).....	41
4.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	50
4.2. Специфікація обладнання.....	52
РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції (напівфабрикату).....	54
РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції (напівфабрикату).....	56
6.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки лікарського засобу (іншого цільового продукту).....	59
6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання лікарського засобу (іншого цільового продукту)	
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	62
7.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва субстанції (напівфабрикату).	
7.2. Методи контролю лікарського засобу (іншого цільового продукту)....	63
РОЗДІЛ 8. Проект заявки на корисну модель.....	64
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	73

Вступ

Останніми роками зростає в Україні виробництво та споживання сиру. На виробництво сиру у молочній галузі припадає приблизно 10% від усього обсягу виробництва молочних продуктів. Сироробну продукцію виготовляють більше 150 підприємств України, 66% яких займаються виготовленням твердих сирів, інші пропонують м'які і перероблені (в особливостях плавлені сири (Ляховська, 2020).

Виробництво сиру являє собою досить складний та довготривалий процес, під дією фізико-хімічних, біохімічних та мікробіологічних процесів, що протікають під час виготовлення, відбувається формування характеристик приманних кожному виду сиру : смак, аромат, консистенція та малюнок.

Сформовані якісні показники визначаються рядом факторів, одним із найважливіх факторів є якість молочної сировини, а саме є мікробіологічні показники, до того ж не тільки важливий видовий спектр, який наявний наявної в молоці мікрофлори, а й кількісний (Шугай, 2013).

Отримання стерильної молочної сировини неможливо, навіть при дотриманні усіх необхідних санітарних заходів, бо вже на етапі видоювання в молоко потрапляють сапрофітні бактерії, які знаходяться в сосковому каналі. Також молоко, отримане після доїння неодмінно забруднюється.

Перша група може спровокувати одну із найпоширенішої вади сирів : раннє вспучування та знижують якість готового продукту, а бактеріофаги негативно впливають на молочнокислий процес, тим самим дозволяючи розвиватися контамінантній мікрофлорі (Cotter, 2023).

					НУХТ БТЕК 02.01.14. КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Ар</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Да</i>	Вступ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					7	807
<i>Н.</i>					Кафедра БТМ			
		Стабніков В.П.						

У виробничому процесі сирів мікроорганізми як золотистий стафілокок, сальмонела, лістерія і *Escherichia coli* визначено як найчастіші збудники, що пов'язані з молочною сировиною та готовою продукцією.

Тому дана група мікроорганізмів контролюється міністерством охорони здоров'я, бо можуть являтися причиною харчових отруєнь та нанести шкоди організму людини (Al-Gamal та ін.,2023).

Додаткової уваги потребує контроль плісняви через можливість виробляти канцерогенні та токсичні мікотоксини, які становлять небезпеку для здоров'я людини. Афлатоксин М1 класифіковано як можливий канцероген для людини (Ibrahim,2019).

Існує можливість попередити псування сирів через бактеріальне забруднення чи технологічних вад завдяки використанню захисних бактеріальних препаратів, в основі яких закладені спеціальні штами молочноокислих бактерій, які мають високу інгібуючу активність, фагостійкість та антагоністичною дією до технічно шкідливої мікрофлори.

Хоча і багато інших штамів бактерій здатні продукувати інгібуючі метаболіти-бактеріоцини, майже уся увага сконцетровано на молочноокислих бактеріях, причиною цього являється те, що більшість із даної групи мікроорганізмів має статус GRAS (загальноновизнаними безпечними).

Бактеріоцини представляють собою антимікробні пептиди, які синтезуються молочноокислими бактеріями. З їх відкриття пройшло майже століття і більшість із них були вже досліджені, а деякі із них використовуються навіть і у комерційних цілях, як харчові консерванти (Erfani & Afshar ,2024).

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1.

МІКРОБІОМА СИРІВ

1.1. Мікробіологічні процеси при виробництві сиру

Мікробіологічні процеси при виробництві починаються ще на етапі приймання сировини, для початку у молоці-сировини визначають мікробіологічні показники, а саме : загальна кількість, кількість спор анаеробних мезофільних бактерій, вміст домішок та інгібуючих речовин та на сиропридатність молока, бо сиропридатне молоко має гарно згортатися під дією сичужного ферменту та утворювати щільний згусток, який добре відділяє сироватку.

Наступним етапом є очищення та охолодження молока, щоб запобігти розвитку патогенної мікрофлори. Для цього використовують різні очищувальні сепаратори та фільтри. Охолодження молока відбувається на пластинчастих охолоджувач до температури 6-8°C. Далі молоко направляється на зберігання у резервуари з рубашкою для підтримання необхідної температури, тут очищене молоко може зберігатися від 12 до 24 годин.

Важливим моментом у мікробіологічних процесах при виробництві сиру є дозрівання та підготовка молока до згортання. На даному етапі відбувається частковий розпад білків , який дає важливі для розмноження та росту молочнокислих бактерій азотисті речовини. І розпочинається активність лактококів, які відіграють ключову роль у формуванні смакових ,ароматичних та текстурних властивостях сирів.

					НУХТ БТЕК О2.01.16. КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Ар</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Да</i>	Літературний огляд.Розділ 1.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					9	86
<i>Н.</i>						Кафедра БТМ		
		Стабніков В.П.						

Для знищення шкідливих і хвороботворних бактерій, забезпечення однорідної якості та підвищення стабільності якості сиру для виробництва більшості сортів сиру використовується пастеризоване молоко.

Пастеризація вбиває більшість ферментерів лактози та дозволяє суворіше контролювати підкислення під час більш жорсткого процесу виготовлення сиру, у свою чергу полегшуючи контроль якості сиру. Тому для правильного бродіння сюди необхідно додати закваску. Для деяких сортів сиру, особливо чеддер, пармезан і витриманої гауди, звичайним є додавання в молоко додаткових бактерій (здебільшого видів *Lactobacillus*) для створення унікальних, характерних смаків. Додаткові добавки можуть включати види бактерій, які пригнічують небажані бактерії в сирі та, можливо, мають пробіотичний ефект (Silva & Ribeiro, 2018).

При виготовленні сирів використовують не тільки молоко, що піддавали дозріванню, а й суміш незрілого та зрілого молока. Як у технологіях виготовлення сиру Пармезан та Грано Падано (Zheng & Wang, 2021). Зріле молоко додають до свіжого в кількості від 15 до 40%. Якщо зріле молоко не використовують негайно, то його охолоджують і зберігають за температури 8°C. У зрілому молоці, підготовленому для виробництва сиру, повинно міститися від 3 до 15 млн клітин в 1 см³ молочнокислих бактерій.

Щодо етапу згортання молока, в більшості випадків використовується сичуг, але цінова політика занадто дорога, тож дуже часто використовується замість нього пепсин. Проте пепсин має набагато нижчу активність, тому у технологіях його використовують у 10-15 разів більше. І це може спровокувати появу ваду сиру, таку як гіркий смак. Тому багато останніх досліджень присвячені можливості заміни на рослинні протеази для зсідання молока (Loffi та ін., 2023).

Далі йде процес відділення сироватки. Під час синерезису в сирне зерно переходять мікроорганізми, які захопились білком на етапі зсідання

молока, тому концентрація молочнокислих бактерій приблизно в 4-8 разів більше, ніж у сироватці.

Щоб відділити краще сироватку використовують етап виробництва як друге нагрівання, в залежності від виду сиру використовується різна температура, так для сирів типу голландського температура становить близько 40-43°C, а для сирів типу швейцарського вона становить на рівні 56-60°C. У сирах, з низькою температурою нагрівання кількість мезофільних лактобацил продовжує активно розвиватися і надалі.,а у сирах з високою температурою другого нагріву зупиняється мезофільних бактерій, і починається розвиток термофільних молочнокислих паличок та стрептококів.

Далі починається важливий етап формування та пресування сиру. Відбувається бродіння молочного цукру, що призводить до наростання кислотні і зневоднення сирної маси та її ущільнення. Процес пресування відбувається при температурі, тому молочнокислі бактерії дуже активно розвиваються на цьому етапі.

Соління сиру. Відбувається для покращення смаку та консистенції, також завдяки цьому етапу відбувається пригнічення патогенної мікрофлори, особливої кишкової палички. При технологічному процесі із поверхні сиру виділяються розчинні речовини, такі як молочний цукор, а в середину сиру натомість потрапляє харчова сіль, які інгібує шкідливу мікрофлору, проте пригнічує і розвиток корисної мікрофлори.

Але високий вміст солі у продуктах харчування викликає занепокоєння останнім часом, щодо негативного впливу на організм людини, тому проводяться наукові роботи щодо технологій зі зменшеним вмістом солі (Mozzon та ін.2023).

1.2. Особливості мікробіологічних процесів при дозріванні різних видів сирів

Процес дозрівання сирів відбувається під дією сичужного ферменту та молочнокислих бактерій. Постійна контамінантна мікрофлора представлена лише кишковою паличкою на початку дозрівання та маслянокислими бактеріями на пізніх етапах. У технології сиру типу швейцарського приймають участь також пропіоновокислі бактерії, у сирах типу латвійського за наявності мікрофлори сирного слизу, пліснявілих сирів за наявності відповідної плісняви.

Дозрівання є найважливішим етапом у технології сиру, бо саме в цей час формуються смак і аромат притамані кожному виду сиру. Біохімія дозрівання сирів складається з 3 основних напрямків:

1. Відбувається метаболізм залишкової лактози, лактату та цитрату;
2. Метаболізм жирних кислот та ліполіз;
3. Катаболізм амінокислот та протеоліз.

Дозрівання сиру відбувається за рахунок активності мікроорганізмів, які отримані з молока-сировини та які отримані від внесення стартових заквасок, додаткових заквасок. Також активність відбувається за рахунок ферментів, що вносяться на етапі сквашування, а саме хімозину та сичужного ферменту. Основні продукти дозрівання сиру (пептиди, амінокислоти та жирні кислоти) метаболізуються далі до летких ароматичних сполук через метаболізм жирних кислот і катаболізм амінокислот (Tidona & Giraffa, 2022).

Сири, що дозрівають при участі мезофільних молочнокислих бактерій

Тверді сири з низькою температурою другого нагріву у перші 10 днів мають найбільшу кількість лактококів (приблизно 2,5-3,5 мільярдів клітин на 1г сиру). Відбувається повне збродження лактози і за рахунок цього починається загибель лактококів. Більша частина лактококів відмирає на протязі 1-2 місяців, проте паралельно відбувається нарощення кількості

мезофільних молочнокислих стрептококів *Lactobacillus plantarum* та *Lactobacillus casei* , які у подальшому дозріванні сиру також гинуть.

Чеддер. При технології сиру чеддер робоча температура становить 40-45°C, що сприяє швидкому розмноженню молочнокислих бактерій. Ще більшого ефекту надає етап чедеризації, коли сирний пласт витримують у сирній ванній для наростання кислотності на протязі декількох годин. Протягом перших декількох днів у сирі мікрофлора представлена в основному молочнокислими стрептококами, кількість яких сягає декількох мільярдів в 1г, потім починається поступове відмирання мікроорганізмів.

Вміст молочнокислих паличок в свіжому сирі невеликий, а от в кінці дозрівання їх чисельність більше ніж стрептококів . В зрілому сирі наявні в більшості мезофільні молочнокислі палички (Ardö та ін,2017).

Сир типу голландського . Кількість бактерій в 1г даного виду сиру вже в перші дні досягає 2,5-3,5млрд. Ріст бактерій збільшується у процесі другого нагріву і продовжується до тих пір, поки в сирі не закінчиться молочний цукор (через 5-7діб). В процесі дозрівання поступово розвиваються молочнокислі палички, кількість яких в кінці дозрівання становить 300-400 млн. в 1г.(Murtaza & Hafiz,2014).

Сир,що дозрівають за участі термофільних молочнокислих та пропіоновокислих бактерій

Дана група сирів типу швейцарського відрізняється від минулої технологічними умовами, що визначають особливості розвитку мікроорганізмів. Висока температура другого нагріву різко пригнічує розвиток молочнокислих стрептококів, при цьому зменшується і розвиток молочнокислих паличок. Сир цієї групи більш великого розміру, тому охолодження відбувається повільніше. Відбувається інтенсивний розвиток термофільних молочнокислих паличок.

Пропіоновикислі бактерії розмножуються повільно , максимальний їх розвиток припадає на другу половину дозрівання.

Додатково до лактобацил і *S. thermophilus* , *Propionibacterium freudenreichii* є ключовим видом для виробництва швейцарського сиру, оскільки його ріст пов'язаний з пропіонатом (типовий смак) і виробництвом CO₂ (утворення вічок) під час бродіння лактату,що виробляється закваскою. Додаткові мезофільні *Lactobacillus* також можна додавати до швейцарських сирів, оскільки вони позитивно впливають на формування смаку (Decadt & Vuyst,2023).

Визрівання сирів за участі сирного слизу

Ці сири мають більш високу вологість в порівнянні з сирами голандського типу. Кількість мікрофлори в перші дні визрівання становить 8-9млрд. в 1г. сиру. Кількість паличок не перевищує 70-80млн. в 1г, що пояснюється більш яскравим розвитком стрептококів. У дозріванні сирів, з сирним слизом більшу частину мікрофлори представляють собою бактерії *Brevibacterium* , *Corynebacterium* , *Arthrobacter* та *Microbacterium* spp. Вони розвиваються на поверхні сирів (Dugu та ін.,2018).

Сири, що дозрівають за участі плісняви на їх поверхні (французькі сири «Камамбер», «Брі»)

М'які сири з пліснявою дозрівають у спеціальних камерах з температурним режимом 12-15°C, вологість має становити близько 80-85%.

Найголовніший етап відбувається за рахунок додавання спор пліснявілих грибів родів *Penicillium album* й *Penicillium camamberti*. рН сирної маси становить 4.7-4.9, що дає гарні умови для розвитку плісняви на поверхні сиру (Орлюк,2019).

Сири, що дозрівають за участю плісняви в їх товщі (французький сир «Рокфор», датський сир «Дор блю», італійський сир «Горгонзола», англійський сир «Стілтон» та ін)

Особливість даної групи сирів заключається у наявності блакитної та зеленої плісняви в сирній масі. Спори пліснявілих грибів *Penicillium roqueforti* вносяться довгими голками у непресовану сирну масу. Завдяки повітряним каналам, що утворюються пліснява розростається у товщі сиру. Щоб збільшити вологу сиру, його регулярно обтирають вологою тканиною. Пліснявілі сири дозрівають від 2 до 3 місяців. Також сировиною в більшості випадків виступає коров'яче молоко, але є і виключення, так наприклад для сиру «Рокфор» використовують лише овече молоко (Сливка & Мусій (2020).

1.3.Вади сирів

Вади сирів представляють собою відхилення від прийнятих стандартами показників, які можуть виникнути у різних видах сирів при виробництві через ряд факторів, починаючи від неякісної сировини закінчуючи недотриманням умов зберігання готової продукції.

Вада гіркового смаку з'являється через активний розвиток мамококів та мікрококів, які продукують високий вміст гірких пептидів. Потогенна мікрофлора потрапляє через недотримання санітарних умов або температурного режиму зберігання молока.

Одним із найбільш поширених вад сирів являється вступування. Виділяють раннє та пізнє вступування.

Причиною раннього вступування найчастіше являється розвиток бактерій кишкової палички. Вона може з'явитися через поганий молочнокислий процес, недотримання рН при виробництві або низьких концентраціях доданої солі.

Тому для застереження цього важливо використовувати лише бактеріально чисте молоко, закваску з високою активністю та обов'язково дотримуватись вимог для гарного розвитку молочнокислих бактерій.

Щодо пізнього вспучування . Основною причиною цьому являються бактерії *C. tyrobutyricum* . У сирі виникають умови, які сприяють проростанню спор у вегетативні клітини, які починають виробляти за рахунок ферментації лактату : оцтову ,масляну кислоту та вуглекислий газ.

Це провокує утворенню великих тріщин і вічок неправильної форми(Ropars & Giraud,2017).

Основними методами боротьби з даною вадою є застосування захисних заквасок , в основі яких *L.lactis*, *L.cremoris*, *Lb.plantarum* та інші бактерії молочнокислих бактерій , які здатні продукувати інгібуючі метаболіти (Tabla & Roa,2018).

Підкіркова пліснява з'являється через плісняву роду *Penicillium* *glaucum* або інших видів пліснявілих грибів, через порушення умов соління та дорівання сиру, в результаті чого порушується цілісність кірки і пліснява потрапляє всередину. Щоб упередити ваду сиру необхідно дотримуватись санітарних вимог в приміщеннях .

Внаслідок життєдіяльності мікрококи та гнільних бактерій *Proteus vulgaris*,які розкладають білки,особливо через розпад амінокислоти тирозину можуть утворюватися на поверхні сиру коричневі плями.

Ентерокок *Ent.faecalis* може призводити до вади- запах сірководню, який утворюються в процесі розпаду амінокислот. Причиною цьому являється недостатній посол та низька кислотність під час виробництва. Недопустити це можливо завдяки виокристанню гарної активної закваски, підвищенню температури дозрівання та покращення режимів посолу.

Нориця –це дефект сиру , який проявляється у вигляді порожнеч у тісті сиру.

РОЗДІЛ 2. БІОКОНСЕРВАНТИ

2.1. Традиційні консерванти у технології сирів

Україна одна із країн Європейського Союзу, яка є провідним виробником сиру, далі після Європейського Союзу є США як виробник сиру, на ці напрямки припадає майже 65% від усього світового виробництва. Також є тенденція щодо збільшення виробництва сиру, і до 2027 буде збільшено виробництво на 9% молока, з яких 35% буде направлено на виробництво сиру.

Споживання і самого сиру зростає, так у 2010 році у світі була тенденція 17 кг сиру на душу населення, а вже в 2020 році вона досягла 20 кг на душу населення (Ávila& Garde, 2014).

Більшість сирів обов'язково проходять термічну обробку на етапах виробництва, але сир це продукт який сприйнятливий до забруднення мікроорганізмами, що може призвести до псування сиру, ризику для здоров'я споживачів і скорочення терміну зберігання сиру. Тому у технології сирів додають різні консерванти.

Консерванти це речовини, які можуть перешкоджати мікробному, ферментному і окислювальному псуванню готового сиру. З метою подовження терміну зберігання поживної цінності сиру його консервують за допомогою різних технологічних методів.

					НУХТ БТЕК 02.01.14. КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Ар</i>	<i>№ док ум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Да</i>	Літературний огляд. Розділ 2.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					17	817
<i>Н.</i>					Кафедра БТМ			
		Стабніков В.П.						

Розрізняють фізичне, біологічне та хімічне консервування.

- Фізичні методи консервування : пастеризація, стерилізація, охолодження (дія високих та низьких температур), обробка іонізуючим випромінюванням.
- Біологічне консервування полягає у впливі на продукт безпечних для людини культур мікроорганізмів, що запобігають розвитку небажаної мікрофлори.
- Хімічні методи консервування базуються на додаванні до продуктів певних речовин, які пригнічують розвиток мікроорганізмів. Ці речовини називають консервантами.

Одним із найвідоміших консервантів є сорбат калію, який застосовується у технологіях сирів. Сорбат калію пригнічує ріст аеробних бактерій, дріжджів та грибової мікрофлори. Хоча і сорбат калію умовно являється безпечним консервантом та маю меншу токсичну дію від інших консервантів, є дослідження що констатують негативний вплив на організм людини. Із дослідницьких робіт описані випадки алергічних реакцій, як контактний дерматит та астма, а також зафіксовані випадки непереносимості самої речовини.

Органічну пропіонову кислоту та її солі (E280 – E283) – використовують як найпопулярніший консервант не тільки у всіх технологіях різних видів сирів, а і в загалому для консервації молочних продуктів.

Ще відомим консервантом для сиру являється молочна кислота (E270), мурашина кислота й її солі (E236 – E238).

Бензоат натрію також використовується у сирах, він представляє собою білий кристалічний порошок, не маючи ні запаху ні смаку, використовується у вигляді 0.1% водного розчину. Але бензоат натрію має серйозний недолік – його присмак. Також як антисептичні засоби для поверхонь сиру достатньо

часто використовують бензойну, сорбінову кислоти й їх солі(Nájera & Albisu,2021).

Також для обробки поверхонь сиру часто використовується натаміцин, який отримано біологічним шляхом –аеробною ферментацією *Streptomyces natalensis*. Його використовують задля запобігання розвитку грибкової мікрофлори на поверхні сиру. Європейським союзом дозволено використовувати його у технологіях твердого, напівтвердого та напівм'якого сиру, а його максимальна кількість встановлена на рівні 1 мг/дм² поверхні готового продукту. Також не дозволено , щоб натаміцин потрапляв середину сиру більш ніж на 5 мм (Lucera & Nobile,2014).

Гексаметилентетрамін(уротропін)також може використовуватися як харчовий консервант, проте на рівні Європейського Союзу на даний момент дозволено лише використовувати для сиру Provolone. Причиною цьому є те що уротропін при розпаді виділяє уротропін тому його концентрація не може перевищувати 25 мг/кг (Radicevic & Spiri,2019).

Велику популярність для твердих та плавлених сирів представляють собою консерванти- нітрати, вони попереджають розвиток маслянокислих бактерій, вносять у сир перед закваскою ,кількість має становити не більше 0,01- 0.02%. Але нітрати дозволені не у всіх країнах, так наприклад у Італії, Франції, Греції та Швейцарії вони повністю заборонені. Тому активно зараз шукають альтернативи, так одним із варіантів може слугувати лізоцим,це природній консервант, який добувають із курячого яйця, лізоцим вносять у вигляді кристалів у кількості 2,5г на 100 літрів молока.

Хоча більшість цих консервантів і дозволені для використання як консерванти у технології сирів, споживання них може викликати ряд проблем зі здоров'ям, тому широко обговорювальною темою зараз являється пошук варіантів заміни хімічних консервантів. І важливо що не лише науковці стурбовані впливом хімічних консервантів, а й самі споживачі вже обирають сиру з більш натуральним складом.

Останнім часом у багатьох наукових роботах розглядаються останні розробки щодо використання та ефектів трав'яних екстрактів у виробництві сирів, показуючи, як до різних рецептур можна додавати велику кількість природних сполук. Використання трав і спецій при виробництві є досить популярною практикою у нових технологіях(EFSA ,2014).

Особливою групою консервантів є мікробні консерванти, які вважаються більш безпечною групою консервантів, вони здатні пригнічувати ріст патогенної мікрофлори або виступати у якості антиоксидантів, поглинаючи кисень і при цьому стримуючи окислення сиру. До цієї групи відносяться молочнокислі бактерії, які в процесі своєї життєдіяльності виробляють корисні метаболіти, особливу увагу з яких займають бактеріоцини, що здатні пригнічувати розвиток контамінантних мікроорганізмів.

Бактеріоцини можна вносити у сир як у вигляді вже очищених чи напівочищених консервантів, для продовження терміну придатності або додавати продуценти бактеріоцинів у вигляді заквасок до сирів, задля синтезу бактеріоцинів вже у сирах. Також існує можливість внесення іммобілізованих бактеріоцинів у харчову упаковку для сирів. В підсумку можна сказати, що бактеріоцини привернули велику увагу у технологіях сирів в останній час .

2.2. Біоконсерванти як альтернатива антимікробних препаратів

Молочнокислі бактерії пропонується використовувати як захисні культури, оскільки їх дослідженням займаються вже багато років, а також бо більшість із них визнані безпечними та мають відповідний статус. Також вони показали дуже гарну антигоністичну дію проти патогенів у технологіях сиру (Omar,2017).

Дія захисних культур у технології сиру залежить від багатьох факторів , рівень забрудненості сировини на перших етапах виробництва, які

технологічні параметри застосовуються при виробництві, а саме : час дозрівання сиру, рН , дотримання режимів зберігання готової продукції. Важливо те, що молочнокислі бактерії в своїй меті мають зупинити чи призупинити на час розвиток патогенної мікрофлори на останніх етапах виробництва, а також при зберіганні готового продукту, а не очищувати молоко-сировину від первинної патогенної мікрофлори. Існують 3 антимікробні механізми дії молочнокислих бактерій.

2.2.1. Метаболіти

При виробництві відбувається бродіння молочнокислих бактерій і виробляється ряд метаболітів : молочна, оцтова, пропіонова кислоти, які здатні пригнічувати розвиток певних патогенних бактерій та грибів . Інгібуюча дія відбувається за рахунок зниження рН та денатурацією білків, інгібуванням ферментів та виробленням активних форм кисню, які здатні порушувати клітинний метаболізм, який призупиняє ріст шкідливої мікрофлори. Інші протимікробні засоби молочнокислих бактерій представлена H_2O_2 , жирними кислотами (декановою, коріоловою), діацетилом і ацетоїном і бактеріоцинами. Щодо ацетоїну та діацетилу, тут механізм дії пов'язаний з можливістю діяти на аргінін, тим самим порушуючи структуру деяких білків. Ще один важливий механізм представлений тим що діацетил має змогу зв'язуватися з молекулами ДНК ,що приводить до її розкручуванню. Потрібно відмітити і таку сполуку як реутерин ,що вироблена молочнокислою бактерією *Limosilactobacillus reuteri* , що має дуже широкий спектр інгібуючої дії.

2.1.2. Бактеріоцини

Бактеріоцини –пептиди, які синтезуються в рибосомах , і в основному виробляються грампозитивними бактеріями, в особливостях молочнокислими. Усі бактеріоцини різняться між собою механізмами дії та поділяються на 3 основні класи за своєю бактерицидною дією .

Механізм дії даної групи метаболів був досконало вивчений і основа їх дії лежить у здатності діяти на клітинну оболонку патогенних мікроорганізмів. Утворюються пори, які призводять до зміни потенціалу цитоплазматичної мембрани, що в свою чергу призводить до порушення рушійної сили протонів, із-за чого клітина гине. Деякі бактеріоцини можуть мати 2 механізми дії, наприклад нізін, який може і утворювати пори та паралельно пригнічувати біосинтез клітинної стінки, що дає йому високу інгібуючу активність. Ще один механізм дії полягає у експресії генів та виробництві білку, що дозволяє вбивати клітини. Нізін, лактицин, педіоцин, термофілін, плантацин і ентероцин представляють собою бактеріоцини, які можуть бути застосовані у різних сирах, і мають відповідні наукові дослідження.

2.2.3. Екологічна конкуренція.

Екологічна конкуренція полягає у конкурентному виключенні, захисні культури беруть у цьому частку, і в результат чого випереджають контамінантну мікрофлору за продукти життєдіяльності, а саме за поживні речовини та кисень. Даний вид конкуренції закладений в основу біозахисного механізму лактобацил проти шкідливої мікрофлори в усіх продуктах молочного походження, включаючи сири. Ця стратегія також може бути застосована замість хімічного консервування у сирах (Bintsis & Papademas, 2024).

2.2. Бактеріоцини молочнокислих бактерій

Бактеріоцини молочнокислих бактерій мають серйозну перевагу над іншими продуцентами бактеріоцинів, бо стійкі та активні у широкому діапазоні рН, вони термостабільні і проявляють високу інгібуючу активність як раз проти тієї патогенної мікрофлори, яка найчастіше зустрічається у сирах, а саме: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia*

coli, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* та *Clostridium botulinum*.

Важливою перевагою являється, що молочнокислі бактерії мають чутливість до травних протеаз, включаючи трипсин, хімосин та панкреатин, а отже і не мають негативного впливу на мікробіоту кишково-шлункового тракту (Nájera & Albisu, 2021).

Бактеріоцини були відкриті досить давно і ретельно досліджені, тому деякі з них вже використовуються як комерційні харчові консерванти (Sugrue & Hill, 2024).

Бактеріоцини можуть мати вузький спектр, пригнічуючи таксономічно близькі бактерії, або широкий спектр, пригнічуючи широкий спектр бактерій (Nájera & Albisu, 2021).

Більшість видів лактобактерій відносяться до нормальної мікрофлори організму людини, а отже ця група бактерій і відповідно їх метаболіти, в тому числі і бактеріоцини мають статус GRAS (Generally Recognized as Safe), що дає їм можливість бути застосованими як консерванти для багатьох видів харчових продуктів, включаючи і сири.

У минулих роках класифікація бактеріоцинів включала в себе 4 класи, але в останньому класі особливістю бактеріоцинів було те, що вони склалися з комплексів, які містять як і вуглеводні скелети, так і ліпідні, тому було прийнято рішення перекласифікувати їх в бактеріолізени. Тому нинішня класифікація включає в себе всього 3 класи (Nissen-Meyer, 2007).

Перший клас представляють собою лантибіотики. Які в свою чергу в залежності від особливостей структури поділяються на 2 підкласи: підклас А представлений бактеріоцинами лінійною формою, вони позитивно заряджені та мають молекулярну масу близько 2–4 кДа, діють на грампозитивні бактерії, проникаючи у клітину шляхом створення пор.

Підклас Б лантибіотиків включає глобулярної форми бактеріоцини, які мають негативний або нейтральний заряд. Проте представники першого

класу мають дуже вузьким спектр дії і часто викликають загибель близьких до продуцента штамів.

Усім відомим представником першого класу бактеріоцину є нізин. Він продукується бактерією *Lactococcus lactis*, загалом вважається безпечним (GRAS), і по всьому світу він дозволений для використання як харчовий консервант.

Нізин має таку популярність у світі харчових консервантів через свою високу інгібуючу активність проти грампозитивних мікроорганізмів, включаючи важливу патогенну мікрофлору таку як *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* та *Clostridium botulinum*.

Крім того, нізин є єдиним бактеріоцином, дозволеним для широкого застосування в харчовій промисловості, і останнім часом були проведені безліч досліджень, що дають можливість стверджувати, що нізин може застосовуватися для боротьби з патогенною мікрофлорою у багатьох видах сирів (камамбер, манчего, чеддер) (Ulpathakumbura та ін.,2016).

Бактеріоцин лактацин, який синтезується *L. lactis* може застосовуватися проти великої групи патогенних мікроорганізмів, таких як: *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *E. faecalis*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *L. monocytogenes* (Fernández-González & Castrejón-Jiménez,2021).

До бактеріоцинів 2 класу відносяться невеликі пептиди, з молекулярною масою менше 10 кДа, вони досить термостабільні та кислотостабільні, мають мембрану структуру.

Як і перший клас вони поділяються на 2 підкласи. Підклас II а, педіоцин-подібні чи активні до лістерій бактеріоцини, що мають N-термінальну послідовність амінокислот: тирозин-гліцин-аспарагін-гліцин-валін-цистеїн. В цю групу відносяться дуже багато бактеріоцинів, які включають в себе Pediocin, Lactococcin, Sakacin та інші. Ця група має

позитивний заряд ,в своєму складі містять більше 40 амінокислотних залишків, які мають схожу послідовність амінокислот.

З усієї групи другого класу найбільш вивченим є Педіоцин РА-1. Він синтезується *Pediococcus acidilactici*, він був достатньо вивчений, охарактеризований і тому може бути вже застосований у якості харчового біоконсерванту (Ibrahim ,2019).

Підклас II b включає в себе бактеріоцини, що мають 2 окреми пептиди . До цієї групи належать лактацин F та лактокоцин G плантарицин E/F, плантарицин J/K .

Великої уваги вартує *L. plantarum* , який синтезує бактеріоцин плантацин , який може виступати чудовим біоконсервантом для сирів ,бо має усі необхідні цьому властивості : термостабільність, активність у широкому діапазоні рН та найголовніше інгібуюча активність проти *L. monocytogenes* , *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* та *Clostridium botulinum* . Важливо відмітити, що дані бактеріоцини можуть інгібувати плісняву *Penicillium solitum* , *Aspergillus versicol* та *Cladosporium herbaru* , яка псує сир на процесі дозрівання та зберігання (Cheong & Turner,2014).

Третя підгрупа бактеріоцинів ІІс має свої особливості - це бактеріоцини циркуляційної структури, мають позитивний заряд. Завдяки своїй циркуляційній структурі вони стабільні. Ця підгрупа пригнічує ріст широкого спектру грампозитивних бактерій. Для більшості з цієї групи доведено нетоксичність на організм людини.

Представником даного класу є Рамнозин А ,який був синтезований бактерією *Lacticaseibacillus rhamnosus* ,даний вид бактеріоцину у дослідженнях пригнічував ріст *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* , *Salmonella enterica* та *Staphylococcus aureus* (Jeong & Moon,2015).

Ще одним представником даного класу, якому присвячені наукові роботи є бактеріоцин Ентерокоцин AS-48, за своїми особливостями це круглий пептид, який в своєму складі містить більше 70 амінокислотних

залишків, які зв'язані між собою циркуляційним пептидним зв'язком. Цей бактеріоцин при дослідженнях показав гарну активність *проти Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli та Salmonella enterica* (Oppegård & Nissen-Meyer, 2007).

До останнього –третього класу відносяться термолабільні пептиди, які мають молекулярну масу більше ніж 30 кДа. Але дана група бактеріоцинів не має високого потенціалу у технології сиру через те, що нестабільна при температурі. Сюди відносяться такі представники групи як гелветицини J і ентеролізін A.

Енторілін A це відкриття у світі бактеріоцинів, він був отриманий від бактерії роду *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Ентеролізін A може пригнічувати розвиток окремих ентерококів, педіококів, лактококів і лактобактерій (Nilsen & Holo(2003).

Так як основною проблемою цього класу є залежність від температури, вчені зацікавлені пошуками бактеріоцинів цієї групи, які були б більш стійкими до температури, так у нових роботах є вже певні результати, нещодавно було знайдено бактеріоцин NX371, який був синтезований *Lactobacillus acidophilus* NX2-6, що на 98,15% відповідає гелветицину J, який має антимікробну активність проти грамположитивних і грамнегативних харчових патогенів, таких як кишкова паличка, сальмонела, лістерія, стафілокок та ентеробактер. І найголовнішим є те, що даний бактеріоцин був стабільний при рН 3.0-8.0 та температурі до 60 °C (Meng & Lu, 2021).

2.4. Технологічні аспекти одержання бактеріоцинів молочнокислих бактерій

Синтез бактеріоцинів молочнокислими бактеріями залежить від цілого ряду умов, як і будь-яких інших біологічно активних речовин, так продукування бактеріоцину напряду має відношення від умов росту його

продуцента, а саме : кислотність середовища, його склад , температура та час , який продуцент культивується.

Науковці в свої роботах найчастіше застосовують середовище MРС, але також використовуються і середовищі на дріжджовому екстракті, сухому молоці і тд. Такі середовища досить багаті на білки, вуглеводи, мінеральні речовини, які важливі для хорошого синтезу бактеріоцинів (Trejo-González & Chavarría-Hernández,2022).

Бактеріоцини молочнокислих бактерій мають довгий шлях при синтезуванні , який повинен включати в себе виробництво пребактеріоцину, далі необхвжне розщеплення препептиду на специфічному сайті процесингу, що видаляє лідерну послідовність і транслокацію пробактеріоцину за межі клітинної мембрани. Особливі гени, які необхідні для синтезування бактеріоцинів , згруповуються в 1 чи 2 оперони, що в своєму складі мають різні компоненти , які містяться у хромосомі.

Першим компонентом є структурний ген, який кодує пребактеріоцин, що містить N-кінцеву ділянку (лідерну послідовність типу подвійного гліцину або послідовність типу пептидного сигналу). Два консервативні гліцини присутні на його C-кінці, який розпізнається ABC-транспортерами для обробки лідерної послідовності і допомагає в секреції зрілого бактеріоцину в позаклітинне середовище. У всіх цих процесах послідовність сигнального пептиду (SP) відіграє важливу роль в обробці та секреції бактеріоцинів через загальний транспортний шлях (GSP).

Другим компонентом у синтезі бактеріоцину виступає ген імунінтету ,який представляє собою невеликі білки, які в своєму складі містять від 50 до 150 амінокислот. Ці гени дуже важливі, бо саме вони захищають продуцент від інгібуючої властивості власного бактеріоцину .

Третій компонент - це гени, що кодують білок, який відповідає за обробку, транспортування та секрецію пре-пробактеріоцину.

Четвертий компонент - ген модифікації, який кодує фермент, що відповідає за посттрансляційну модифікацію бактеріоцину.

П'ятий компонент - регуляторний ген, який кодує ген, що бере участь у регуляції синтезу бактеріоцину(Sharma & Tamang,2021).

Наступним етапом після синтезу, але не менш легким є вилучення та очищення бактеріоцинів.

Першим етапом є відділення від біомаси, використовуючи центрифугу, далі в більшості випадків проводять ультрафільтрацію. Щодо очищення та виділення тут в основному використовують осадження пептидів за допомогою солей сульфат амонію, з подальшим очищенням за допомогою діалізу та різноманітні методи хроматографічного розділення. В більшості випадків важливим фактором є рН.

Бактеріоцини можуть використовуватися у сирі як у чистій формі або напівочищеній , а також можливо введення до сиру штаму-продуцента різних видів бактеріоцинів, для подальшого там накопичення. Внесення цих продуцентів можливо через застосування їх у якості захисних заквасок, які будуть вноситися у сир додатково. Це дає змогу значно зекономити на очищенні та виділенні бактеріоцину для комерційного застосування. Але це також має і ряд недоліків, перше це те ,що у технології сирів може бути інший температурний режим, рН, який буде несприятливий для синтезу бактеріоцину у необхідній кількості для гарної інгібуючої активності.

РОЗДІЛ 3.

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Характеристика бактеріоцину

Для вибору продуцентів бактеріоцинів були проаналізовані роботи науковців і на основі даних (табл.3.1) було обрано для подальшого дослідження три молочнокислі бактерії, які мають найбільший інгібуючий ефект проти патогенних мікроорганізмів у сирі, а саме *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*).

Табл 3.1.Інгібуюча активність деяких видів лактобактерій

Молочна кислота бактерія	Патогенний мікроорганізм						
	Staph.sc uiri	B.cere us	Sal.ent erica	E.coli	Ps.aerugin osa	Ps.chrysoge num	C.parapsil osis
Lb.Plantarum	10- 15мм	6- 10мм	10- 15мм	10- 15мм	5мм	10-15мм	6-10мм
Lb.helveticus	10- 15мм	6- 10мм	10- 15мм	10- 15мм	5мм	10-15мм	6-10мм
Lb.rhamnosus	6-10мм	6- 10мм	5мм	6- 10мм	5мм	5мм	5мм
Lb.reuteri	6-10мм	6- 10мм	5мм	6- 10мм	6-10мм	5мм	5мм
Str.thermophiles	6-10мм	5мм	5мм	5мм	Не виявлено	5мм	5мм

					НУХТ БТЕК 02.01.14. КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Ар</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Да</i>	Розділ 3. Техніко-економічне Обґрунтування.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					29	819
<i>Н.</i>					Кафедра БТМ			
		Стабніков В.П.						

Закінчення табл.3.1.

Ent.faecium	5мм	5мм	5мм	5мм	Не виявлено	5мм	5мм
Lactococcus lactis	6-10мм	6-10мм	5мм	6-10мм	6-10мм	5мм	5мм

Для правильного вибору найкращого біологічного агента із 3 бактерій, порівняємо їх концентрацію, інгібуючу активність, час культивування та склад поживного середовища (табл. 3.2).

Табл. 3.2.

Особливості одержання бактеріоцинів за допомогою *Lactobacillus plantarum* B391, *Lactobacillus rhamnosus* CJNU 0519, *Lactobacillus helveticus*

Біологічний агент	Склад поживного середовища,г/л	Концентрація цільового продукту, г/л	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Література
<i>Lactobacillus plantarum</i> B391	Середовище MPC : - дріжджовий екстракт – 4.0; - м'ясний екстракт – 10.0; - гідролізат казеїну – 10.0; - глюкоза – 20.0; - цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0; - ацетат натрію – 5.0; - твін 80 – 1.0; - K ₂ HPO ₄ – 2.0; - MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0.2; - MnSO ₄ · 4 H ₂ O – 0,05.	0.24	24год	pH=6.5; t=30 °C .	P. Fernandes, D. Loureiro, V. Monteiro, C. Ramos, L., A. Nero, S., D. Todorov(2017). <i>Lactobacillus plantarum</i> isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. DOI: 10.1007/s13213-017-1275-1

Закінчення таблиці 3.2.

<p><i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJNU 0519</p>	<p>Середовище МРС : - дріжджовий екстракт – 4.0; - м'ясний екстракт – 10.0; - гідролізат казеїну – 10.0; - глюкоза – 20.0; - цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0; - ацетат натрію – 5.0; - твін 80 – 1.0; - K₂HPO₄ – 2.0; - MgSO₄· 7 H₂O – 0.2; - MnSO₄· 4 H₂O – 0,05.</p>	0.01	3 год	pH=7.0 ; t=37 °C	<p>Y., Jeong, G., Moon.(2015). Antilisterial Bacteriocin from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJNU 0519 Presenting a Narrow Antimicrobial Spectrum. <i>Korean J. Food Sci. An</i> .35, 137-142. doi:10.5851/kosfa.2015.35.1.137.</p>
<p><i>Lactobacillus helveticus</i> 34.9</p>	<p>- Глюкоза – 25.96; - Дріжджовий екстракт – 18.4; - Na₃PO₄ – 0.2; - K₂HPO₄ – 0.2; - MgSO₄· 7 H₂O – 0.01; - твін 80 – 1.0; - Вітамінний розчин – 1.0 мл.</p>	0.06	24год	pH=4.5 t=37 °C	<p>I, Angelescu, S., Grosu-Tudor, L., Cojoc, G., Maria, G., Chiritoiu, C., Munteanu, M., Zamfir.(2022). Isolation, characterization, and mode of action of a class III bacteriocin produced by <i>Lactobacillus helveticus</i> 34.9. <i>World J Microbiol Biotechnol</i> , 9;38(12):220.doi: 10.1007/s11274-022-03408-z.</p>

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Біологічний агент	Компоненти поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн./кг	Вартість компонента (грн.) на 1л середовища	Джерело інформації*
<i>Lactobacillus plantarum</i> В3 91	дріжджовий екстракт – 4.0	1800	7.2	[1]
	м'ясний екстракт – 10.0	2563	25,63	[2]
	гідролізат казеїну – 10.0	1728	17,28	[3]
	глюкоза – 20.0	62	1,2	[1]
	цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0	76	0,76	[4]
	ацетат натрію – 5.0	150	0,8	[1]
	твін 80 – 1.0	330	0.3	[4]
	K ₂ HPO ₄ – 2.0	270	0.5	[1]
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0.2	32	0.006	[5]
	MnSO ₄ · 4 H ₂ O – 0,05	40	0.002	[6]
Вартість 1 л середовища – 53.7 грн				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJNU 0519	дріжджовий екстракт – 4.0	1800	7.2	[1]
	м'ясний екстракт – 10.0	2563	25,63	[2]
	гідролізат казеїну – 10.0	1728	17,28	[3]
	глюкоза – 20.0	62	1,2	[1]
	цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0	76	0,76	[4]
	ацетат натрію – 5.0	150	0,8	[1]
	твін 80 – 1.0	330	0.3	[4]
	K ₂ HPO ₄ – 2.0	270	0.5	[1]

Закінчення таблиці 3.3.

	MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0.2	32	0.006	[5]
	Вартість 1 л середовища – 53.7 грн			
Lactobacillus helveticus 34.9	Глюкоза – 25.96	62	1,6	[1]
	- Дріжджовий екстракт – 18.4	1800	33,12	[1]
	Na ₃ PO ₄ – 0.2	190	0.04	[5]
	K ₂ HPO ₄ – 0.2	270	0.05	[1]
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O – 0.01	32	0.003	[5]
	твін 80 – 1.0	330	0,3	[4]
	Вітамінний розчин – 1.0 мл	10	10	[4]
	Вартість 1 л середовища – 45,1 грн			

Примітка:* - Ціна наведена станом на грудень 2023 р.

[1]-<https://prom.ua/>

[2]-<http://lab-mir.com/index.php>

[3]-<https://agar.com.ua/>

[4]-<https://shop.hlr.ua/ua/>

[5]-<https://mirsemyan.com.ua/ru/>

[6]-<https://himfarminvest.com.ua/>

Табл. 3.4

Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Вихід цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за годину, г/год
-------------------	-----------------------------	-------------------------------	---	-------------------------------	--

Закінчення таблиці 3.4.

<i>Lactobacillus plantarum</i> B391	53,7	0.24	488	24	0.0100
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CJNU 0519	53,7	0.01	5370	3	0.0033
<i>Lactobacillus helveticus</i> 34.9	45,1	0.06	752	24	0.0025

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання бактеріоцину виду плантацин штам *L.plantarum* B391. Вихід бактеріоцину найвищий і при культивуванні ще одним плюсом являється найнижча температура із всіх продуцентів (30 °С), що також означає менші енергетичні витрати.

Ліофілізат бактеріоцину *Lactobacillus plantarum*(мал.3.1)



Мал.3.1

Фізико-хімічні властивості. Бактеріоцин B391 відноситься до другого класу, що представляє собою невеликі (<10 кДа) пептиди, він достатньо термостабільний та має мембранну структуру. Даний бактеріоцин має

широку інгібуючу активність проти найпопулярніших патогенних мікроорганізмів, які зустрічаються у технології сирів.

Плантацин В391 це порошок білого чи жовтуватого кольору, бактеріоцин не має ні смаку ні запаху, він не змінює поживну цінність, внесення його не має негативного впливу на зовнішній вигляд, і особливо на текстуру сиру.

Склад: бактеріоцин бактерії *Lactobacillus plantarum* В391.

Форма випуску. Висушений бактеріоцин, прямого внесення у сирну масу, представлений у вигляді порошку запакованого у саше по 2,5 чи 25г.

Механізм дії: Механізм дії бактеріоцинів проявляє свою антибактеріальну дію, націлюючись на механізми, пов'язані з клітинною оболонкою, і через пори утворення, що призводить до зміни потенціалу цитоплазматичної мембрани, порушує рушійну силу протонів і, зрештою, спричиняє загибель клітини.

Спосіб застосування та дози: представляє біоконсервант прямого внесення у сирну масу перед плавленням.

Норма -0.25г на 1кг сиру.

Умови та термін зберігання:

У сухому, прохолодному місці, без прямої дії сонячного світла, при температурі не вище 12 °С, не більше 24 місяців.

Корисна дія:

- запобігає появі неприємного гірко-присмаку або запаху, а також здуттю твердих сортів сиру на пізніх стадіях витримки;
- продукти зберігають свої первісні характеристики та якість протягом усього терміну зберігання;
- метод застосування заснований не на застосуванні хімічних речовин, а на чисто біологічному антагонізмі мікроорганізмів внаслідок дії бактеріоцинів, що дозволяє пригнічувати розвиток багатьох видів

небажаної мікрофлори, тим самим сприяє збільшенню термінів придатності.

Область застосування:

1.Перспективним є використання бактеріоцинів при виробництві харчових продуктів, таких як м'ясо, молочні продукти, риба, алкогольні напої, салати та ферментовані овочі для їх довгострокового зберігання замість хімічних консервантів, оскільки вони є нетоксичними для людини пептидами.

Показники якості біоконсерванту на основі бактеріоцину

Табл.3.5

Показник	Нормування	Метод контролю
Опис	Порошок білого або жовтого кольору.	Візуально
Ідентифікація	Пептиди з молекулярною масою приблизно 6 кДа	За допомогою гель-хроматографії
Активність бактеріоцину	Наявність чіткої зони інгібування на агарі бактерії <i>S. aureus</i> , як цільового штаму для визначення антимікробної активності	Мікробіологічна діагностика, візуально
Важкі метали	Не більше 0,002%	За п. 2.4.8 ДФУ
Вологість	Не більше 0,5%	За допомогою аналізатора вологості Radwag MA 50/C/P
Мікробіологічна чистота	Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, цвілі і дріждіоподібних грибів.	Згідно ДФУ 1.4, п.2.6.13., п.5.1.4.

Санітарно-мікробіологічні показники:

- БГКП в 1,0 г біоконсерванту - не допускаються;
- *Staphylococcus aureus* в 1,0 г біоконсерванту- не допускаються;

- Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 10,0 г - не допускаються;
- Дріжджі й плісєневі гриби - не більше 5 КУО / г.

Санітарно-хімічні показники на токсичні елементи, не більше :

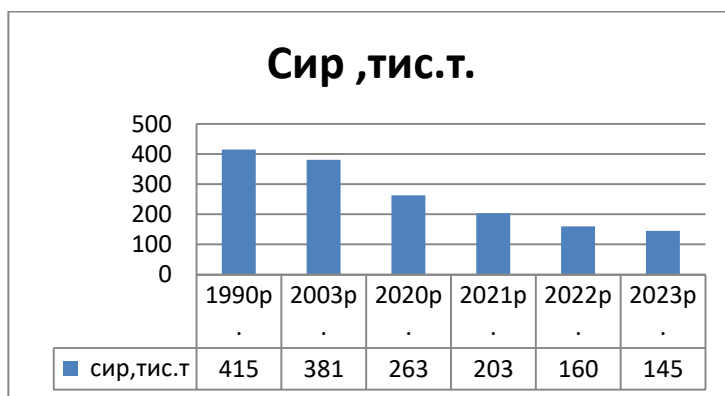
- свинець - 1,0 мг/кг;
- миш'як - 0,2 мг/кг,
- кадмій - 0,2 мг/кг,
- ртуть - 0,03 мг/кг.

3.2.Розрахунок потреби у цільовому продукті

Останніми роками в Україні у довоєнний період функціонувало приблизно 200 молокопереробних підприємств. Так наприкінці 2022 року ,працювало близько 140 підприємств молочної галузі, але звичайно їх кількість в порівняно з 2021 року суттєво зменшилась . 39 підприємств було втрачено за період війни у Харківській, Луганській, Донецькій, Херсонській, Миколаївській, Сумській та Запорізькій областях. Особливим ударом для сироробної галузі було знищення на Миколаївщині «Баштанського сирзаводу» й «Куп'янського МКК»,що знаходився на Харківщині. Також деякі підприємства зупинили свою діяльність через інші проблеми, пов'язані з військовим станом.

Стан сироробної галузі в Україні

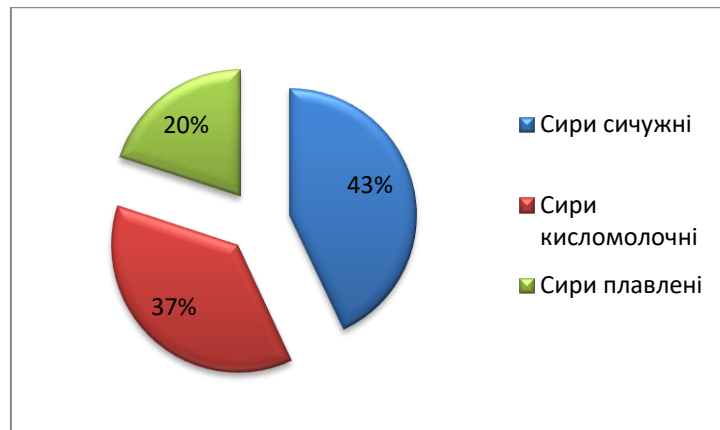
Мал.3.1.



У теперішній час асортимент плавлених сирів налічує більше 60 найменувань, а їхнє річне виробництво сягає майже 200 тис. т і становить приблизно третину загального виробництва сиру в країні.

Аналітика виробництва сирів за 2022-2023р.

Мал.3.2



Отже орієнтуємось на асортимент перероблених сирів, з приблизним виробництвом 29500 тис.т.

Враховуючи, що нізин вже багато років використовується як біоконсервант і немає інших собі аналогів на вітчизняному ринку, а також низьку обізнаність виробників щодо нового бактеріоцину та його властивостей та його впливу на готовий продукт, будемо розраховувати всього на 10% від потужностей підприємств.

29500т. - 100%

2950 т. - 10%

За основу потреби бактеріоцину на 1кг сиру візьмемо бактеріоцин нізин, витрати якого становлять:

Для сирів плавлених сирів -0.05г на 1кг сиру.

Проте опираючись на наукові дослідження показано, що інгібуюча активність бактеріоцину В391 в 2 рази більше ніж нізину (Ibrahim ,2019), що скорочує витрати , а отже витрати бактеріоцину В391 становлять:

Для сирів твердих та напівтвердих -0.025г на 1кг сиру.

Звідси можемо розрахувати нашу потребу, $X=(2950000*0.025/1000)+$
 $=70,8\text{кг}$ – препарату потрібно виготовити на 1рік для виробництву сиру.

3.3. Розрахунок річної потужності виробництва

Знаючи концентрацію бактеріоцину, яку утворює штам *Lactobacillus plantarum* -0.24 г/л, розрахуємо потужність виробництва культуральної рідини для отримання 70,8 кг біомаси:

1л. – 0.24г.

X л. - 70800г.

$X = 295 \text{ м}^3$ культуральної рідини на рік.

З урахуванням втрат цільового продукту при виділенні (30 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини

(V_p): $V_p = 295 \text{ м}^3 / 0,7 = 421.4 \text{ м}^3$

Для проведення наступних розрахунків візьмемо такі початкові дані: час циклу роботи ферментера ТЦФ = ТФ + ТПО = 24 + 10 = 34 год,

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка ЕСВ= 0,3.

При кількості трудоднів рівному 210, кількість продукту за цикл становитиме:

$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} * T_{\text{цф}} / 24 * T_{\text{рд}} = 421400 * 34 / 24 * 310 = 1926\text{л/цикл}$

Отже, кількість циклів становить

$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 421400 / 1926 = 219\text{циклів.}$

K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Приймаємо $K_1 = 1,1$.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 10%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\phi} = \frac{v_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{1926}{1 - 0.1} = 2140 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{зф} = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе

$$V_{гф} = \frac{v_{\phi}}{K_{\phi}} = \frac{2140}{0.6} = 3566,7 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{нф} = 3,2 \text{ м}^3$.
3. Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{зф} = \frac{v_{\phi}}{V_{нф}} = \frac{2140}{3200} = 0.66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,75), отже геометричний об'єм ферментера вибрано правильно.

РОЗДІЛ 4

Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції (напівфабрикату)

Технологія отримання бактеріоцину для технології плавлених сирів включає в себе наступні операції:

1. Відділення біомаси;
2. Концентрування супернатанту;
3. Очищення;
4. Концентрування;
5. Сушіння;
6. Подрібнення і просіювання;
7. Пакування та маркування бактеріоцину.

Вибір способу відокремлення біомаси

В залежності від обраного цільового кінцевого продукту та продуцента, що використовується на сьогодні існують декілька методів відділення біомаси .

Існують такі методи:

- Фільтрування ;
- Сепарування;
- Флотація;
- Центрифугування .

Фільтрування – представляє собою процес відділення твердої фази від рідкої , який здійснюється шляхом проходження отриманої суспензії через фільтруючий матеріал або через полімерну сітку з відповідним діаметром отворів (Данилов ,2008).

					НУХТ БТЕК О2.01.14. КР ПЗ			
<i>З м</i>	<i>А р</i>	<i>№ до к у м.</i>	<i>П і д п</i>	<i>Д а</i>				
		Серебрякова В.			Розділ 4.Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції	<i>Л і т.</i>	<i>А р к.</i>	<i>А р к у ш і</i>
		Лич І.В.					41	41
<i>Н.</i>					Кафедра БТМ			
		Стабніков В.П.						

Переваги:

- ✓ Невелика енергоємність.

Сепарування – являє собою процес розділення суспензій на рідку та тверду фази, який відбувається за рахунок дії відцентрових сил, пропускаючи суспензію через міжтарілчастий простір сепаратора (Карлаш, 2019).

Недоліки:

- ✓ Порівняно вищий механічний вплив на клітини.

Переваги:

- ✓ Можливість автоматизувати процес;
- ✓ Менші втрати біомаси порівняно із фільтрацією та флотацією;
- ✓ більша ефективність порівняно з центрифугуванням.

Флоатація – виділення з рідких твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флоатація заснована на прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу. Недоліком флоатації являються великі втрати біомаси (Плановский, 2013).

Переваги:

- ✓ Економічність;
- ✓ Висока продуктивність;
- ✓ Можливість використання в безперервних процесах.

Центрифугування – процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. При розділенні суспензії у фільтруючих центрифугах в роторі під дією відцентрових сил відбувається фільтрування рідини через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази; рідка фаза проходить через сито і потім через отвори в роторі викидається в кожух центрифуги, а осад відвантажується або під час обертання ротору, або після його зупинки (Lei & Zhu, 2020).

Переваги:

- ✓ менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;

- ✓ можливість автоматизувати процес;
- ✓ високій фактор розділення;
- ✓ розвинена поверхнею осадження;
- ✓ високий ступінь розділення високодисперсних систем.

У центрифугах відбуваються процеси відстоювання і фільтрації в полі відцентрових сил.

Вибір способу виділення цільового продукту з супернатанту

Найголовнішим етапом у післяферментаційних процесах є етапи виділення та очищення цільового продукту (бактеріоцину) із культуральної рідини.

Для виділення та очищення бактеріоцинів в практиці в основному застосовуються 3 наступні методи :

- 1)Осадження,в більшості випадків сульфат амонієм, цей метод є найбільш популярним;
- 2)Іонний обмін –метод хроматографічного розділення;
- 3)Екстракція .

Метод екстракції. Суть методу полягає у вилученні цільового продукту з розчину чи твердої маси використовуючи певний екстрагент. В основі має бути закладена гарна розчинність у екстрагенті речовини, що вилучається і нерозчинність усіх інших складових.

Екстракцію можна використовувати також і для термолабільних речовин(Поперечний,2014). Отриманий цільовий продукт , після екстракції, має отримати чистоту не менше 85-90% для викристання в якості біоконсерванту. Залишок відсотків складають домішки, які в основному представлені іншими видами пептидів.

Після закінчення процесу екстракції, відбувається декантація та розділення на 2 фази, у верхній фазі міститься екстракт , а у нижня фаза представлена водною фазою,причиною цьому є що густина води 997 кг/м³ , в густина етилацетату становить 902 кг/м³.

Після закінчення процесу екстракції ,першою зливається водна фаза ,яка буде направлена на утилізацію,а далі за допомогою іншого трубопроводу екстракт буде направлятися на коцентрування зо допомогою вакуум-випарної установки.

Взагалі екстракція буває декількох видів одно-чи багатоступенева . Різниця полягає у тому що в процесі одноступенової екстракції підбирають екстрагент, який дозволяє отримати максимально можливу кількість бактеріоцину за один раз з водного розчину. Декілька етапів екстракції проводять для того,щоб вилучення цільового продукту було кращим.

Одноступенева екстракція звичайно являється більш доцільно. Через економічну сторону ,така екстракція буває або періодичної дії або безперервної. Безперервний спосіб дає змогу пришвидшити процес та обладнання може використовуватися невеликих параметрів, але на підприємствах даний метод використовується дуже рідко, через його складність, бо при цьому способі не забезпечується якісна декантація, що призводить до погано розділення та розшарування фаз, тому в основному використовується на виробництві періодичний спосіб екстракції, який більш простий та ефективний .

Гарним варіантом для екстракції є відцентрові екстрактори. Їхньою головною перевагою є достатньо короткиц час контакту екстрагенту та рідини, що інколи може мати ключову роль у технології , і тому даний тим екстракторів має перевагу над іншими типами. При проходженні екстракції у відцентровому екстракторі виникає велика швидкість контакту оброблюваних рідин, тим самим забезпечуючи гарну ефективність масообмінних процесів та якісне розділення фаз.

Ці апарати достатньо компактні , так як невеликі обсяги беруть участь у масообмінних процесах, екстрактори представляють собою установки з мінімально пожежо- й вибухонебезпечністю. Зважаючи на той факт, що контактний час в цих екстракторах невеликий , вони ідеально підходять для

вилучення нестабільних цільових продуктів, а також легко емульгуючих рідин та сумішей компонентів, які мають дуже схожу густину.

Для вибору найкращого екстрагенту існує ряд вимог ,а саме:

1. вибірковість стосовно цільового компонента;
2. висока екстракційна ємність за цільовим компонентом;
3. легко здійснювана реєстракція;
4. добре розшарування фаз;
5. безпека при роботі;
6. низька собівартість вартість.

Найголовнішою вимогою ,яка стосується розчинника це його вибіркова здатність і нерозчинність у суміші, які піддається екстракції.В аналізуючій літературі повідомляється,що бактеріоцин молочнокислої бактерії може екстрагуватися етилацетатом, до того ж сам етилацетат має ряд переваг:

- має низьку собівартість ;
- умовно безпечний ;
- нетоксичний;
- має гарні екстракційні властивості;
- легко випарюється за допомогою вакуум-випарної установки.

Метод осадження . При даному методі використовують або органічні сполуки, по типу спирта або метод так званого висолювання, де використовуються солі сульфат амонію для осадження білкових сполук. В процесі осадження в осад випадає близько 40-80% солей, тому важливим наступним етапом є вимивання солей за допомогою діалізу або хроматографії .

Іонообмінна хроматографія. Даний метод достатньо часто використовується для отримання високоочищених цільових продуктів, так через колонки, які містять відповідні іонообмінні смоли, пропускають нативний розчин, з якого необхідно вилучити цільову фракцію. Для цього використовують смоли або з позитивним зарядом або з негативним, вибір

залежить від того, який заряд має цільовий продукт. Бактеріоцини бувають як з позитивним зарядом, так і з негативним зарядом, але бактеріоцини молочнокислих бактерій найчастіше мають позитивний заряд. Принцип методу полягає в наступному: концентрат, який містить цільовий продукт пропускають через іоннообмінну смолу, яка має протилежний заряд від цільового продукту, який сорбується на смолі, який потім елюють певним елюатом, отримуючи чистий продукт. Також для кращого очищення можна ще раз очистити розчин, але використовуючи вже смолу з протилежним зарядом, тоді на іоннообмінній смолі осядуть домішки, які залишилися.

Отже, метод очищення за допомогою іонообмінної хроматографії має свої переваги:

- отримання цільових продуктів високого ступеня очищення;
- якісне відділення від домішок;
- достатньо швидкий процес;
- використання доступного та простого обладнання та матеріалів;
- можливість повністю автоматичного процесу;
- економічна перевага;
- відсутність небезпечного впливу на навколишнє середовище (Zhang & Ai, 2018).

Вибір способу концентрування цільового продукту

Наступним етапом, але не менш важливим є концентрація отриманого екстракту бактеріоцину.

Взагалі методи концентрування бувають декількох типів баромембраного та теплового. До першого типу відносять ультрафільтрацію, діалізацію та зворотнього осмосу. До теплових процесів належить вакуум-випарювання. Випарювання представляє собою процес, при якому відбувається концентрація розчину за рахунок випарювання розчинника. При цьому відбувається вилучення частини розчинника із загального об'єму

розчину за температури кипіння, тому що у класичних випарних установках випарований розчин має залишатися у рідкому стані.

Повністю вилучити розчинник дуже важко ,це можливо лише якщо розчинена речовина перебуває у рідкому чи розплавленому стані при робочій температурі.

Вакуумне випарювання зазвичай використовується для термолабільних речовин, робоча температура у цьому випадку становить 50-60 °С. Вакуум-випарювання має більше позитивних сторін ніж під тиском,але має єдиний недолік:витрати пари набагато більші на 1 кг розчинника, бо із-за низького тиску теплота випарювання розчинника зростає.

Трубчасті вакуум-випарні установки найчастіше використовують на підприємствах,і мають багато різних модей залежності від необхідних параметрів.У даному типі апарату рідина,яка випаровується перебуває однієї сторони стінок труб, а теплоносій знаходиться з іншої сторони. Трубчасті вакуум-випарні установки можуть мати або природній або вимушений потік розчину.Основною перевагою вакуум-випарювання від баромембранних методів є невисока вартість обладнання.

Недоліками даного методу є великі витрати пари, увакуумні установки потребують значних витрат при експлуатації та значної кількості робочого місця.Великі енерговитрати пов'язані з потребою у підтриманні заданих температур на належному рівні (Elayaraja& Balasubramanian,2014).

Основною складовою у баромембранних процесах,що по факту представляють собою фільтраційні апарати,які використовуються і в процесі зворотнього осмосу , ультрафільтрації, нанофільтрації та мікрофільтрації ,являються напівпроникні мембрани, вони виготовляються із різних матеріалів, таких як кераміка, нановуглець чи полімер,мембрани підбираються в залежності від того чи низькомолекулярні чи високомолекулярні частинки треба вилучити .

Для методу зворотнього осмосу найчастіше використовуються апарати наступного типу: плоскокамерні, трубчасті і рулонні.

У процесі ультрафільтрації ті ж самі, окрім рулонних. А от для процесу мікрофільтрації додатково можуть використовуватися ще й патронні фільтри. В основі процесу ультрафільтрації закладена дія під різницею тисків, яка становить в межах 0,2- 1,0 МПа з кожної сторони мембрани.

Метод ультрафільтрації чудово підходить для розділення систем, в яких маса компонентів, що розчинились набагато більше молекулярної маси самого розчинника.

Сам процес ультрафільтрації дуже схожий з процесом зворотнього осмосу, у них схожі конструкції самих апаратів та як і мембрани, що використовуються у процесах. Різниця полягає лише у різних способах відведення профільтрованих речовин від поверхні використаної мембрани. Саме із-за того використовуються для ультрафільтрації менш проникні мембрани, які мають гарний рівень дисперсності (Ворфоломеєв, 2017).

4.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації $V_{кр} = 2140$ л

b. концентрація цільового продукту-0.24г/л,

c. концентрація біомаси -6г/л,

d. втрати на стадіях виділення цільового(бактеріоцину)продукту складають 30 % :

кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає 2140 л $\times 0,00024$ кг/л = 0.514кг.

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям для отримання бактеріоцину

№ з/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 30 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 2. Зберігання культуральної рідини						
1.	ТП 2.1 Зберігання культуральної рідини	КР	2140л	-	2140л	Збірник КР 2,5м3
ТП 3 Відокремлення культуральної рідини						
2	ТП 3.1 Відділення культуральної рідини від біомаси	Культуральна рідина	2140л	-	-	Осаджувальна центрифуга Продуктивність –2,5 м3 л/год
		Супернатант	2140л	5%	2033 л	

Продовження таблиці 4.1.

		Волога біомаса(90% вологість)	115,6кг	-	115,6кг	Утилізація
ТП 4. Ультрафільтрація.						
3	ТП 4.1 Ультрафільтрація фугату	Супернатант	2033л	-	-	Ультрафільтраційна установка Продуктивність – 3м3/год
		Концентрат (K=10)	203,3л	5%	193л	
		Пермеат	-	-	1840л	
ТП 5. Екстракція бактеріоцину.						
4	ТП 5.1 Екстракція	Концентрат	193л	-	-	Екстрактор, робочий об'єм 500л
		Екстрагент (етилацетат)	193л	-	-	
		Екстракт	194л	10%	175л	
		Рафінат	192л	-	192л	
ТП 6. Концентрування бактеріоцину.						
5.	ТП 6.1.1 Вакуум-випарювання елюату бактеріоцину	Екстракт бактеріоцину	175л	-	-	Вакуум-випарна установка
		Концентрований екстракт (K=5)	35л	2%	34,3л	Продуктивність – 200кг/год
ТП 7. Сушіння бактеріоцину.						

Закінчення таблиці 4.1.

6.	ТП 7.1.	Концентрований екстракт	34,3л	-	-	Вакуум сушильна шафа. Об'єм завантаження-55л
	Сушіння бактеріоцину	Висушений бактеріоцин (вологість 10%)	0,554кг	5%	0,529кг	
ТП.8. Подрібнення та просіювання						
7.	ТП 8.1 Подрібнення на молотковій дробарці	Висушений бактеріоцин (вологість 10%)	0,529кг	1%	0,523кг	Дробарка шнекова ВВ-50. Продуктивність – 10 кг/год
8.	ТП 8.2 Просіювання на віброситі	Подрібнений бактеріоцин	0,523кг	1%	0,518кг	Вібросито XZS
ПМВ 9. Пакування, маркування та відвантаження						
9.	ПМВ 9.1 Фасування, пакування, маркування саше порошку цільового продукту та вторинного	Просіяний бактеріоцин(вологість 10%)	0,518кг	-	-	машина для фасування і упаковки в саше Модель S110
		Упакований у саше бактеріоцин(по 2.5 г)	0,518кг	1%	0,514кг	
		Пакування пакетів саше у вторинну упаковку	206 пакетів саше	-	-	Картонне пакування

4.2. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання ділянки стадій отримання бактеріоцину.

Таблиця 4.2.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
Д-10	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий автоматичний GD1. Діапазон: 1–100кг (л). Матеріал – нержавіюча сталь. Виробник: Tschritter GmbH (Німеччина) .
Н-2 Н-4 Н-6 Н-11 Н-13 Н-15	Перистальтичний насос	6	Перистальтичний насос Серія: Rotho Розхід - від 8 до 712 л/год, тиск - до 8-15 бар, Виробник: «Ватерпас» (Україна)
Р-1	Збірник для культуральної рідини	1	Об'єм апарату – 2,5 м3 ; матеріал – нержавіюча сталь . Виробник «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна)
Ц-3	Центрифуга осаджувальна	1	Центрифуга-декантер фірми Flottweg серії Z моделі С7Е (Німеччина), продуктивність до 10 м3 /год.
УФ-5	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка Cogent® Process-Scale Продуктивність установки – 2500 л/год Виробник: «MilliporeSigma» (Німеччина) .
Р-7	Реактор	1	Збірник об'ємом 250 л Матеріал – нержавіюча сталь Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
Е-9	Екстрактор	1	Екстрактор з нержавіючої сталі марки AISI 316 оснащений перемішуючим пристроєм, загальний об'єм 500л, ("STS", Україна)

Закінчення таблиці 4.2.

Р-12	Збірник екстракту	1	Реактор-змішувач об'ємом 200 л з перемішуючим пристроєм (0-680 об/хв) з рубашкою. Матеріал – нержавіюча сталь Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай)
ВВ-14	Вакуум-випарна установка	1	ВВУ-500, «Промвіт» (Україна), об'ємом – 500 л; продуктивність по випареній вологи – 200 кг/год; виконаний із сталі 316L
Р-16	Збірник	1	Реактор хімічний з нержавіючої сталі обладнаний мішалкою на 40 л.. Виробник : JCT, Chine .
ВС-17	Вакуум-сушильна шафа	1	Вакуум-сушильна шафа СВ-50 об'ємом камери 55 л; максимальна температура сушіння - 200 °С.
Д-18	Дробарка	1	Дробарка лабораторна молоткова Perten Instruments LM 120 (Україна) з діаметром отворів сита 0,5 мм, продуктивність 20 кг/год
ВС-19	Вібросито	1	Вібраційне сито SWECO Модель LS18_55 (2 фракції) Діаметр сита – 450 мм .
ФПА-20	Фасувально-пакувальний апарат	1	Горизонтальна машина для фасування і упаковки в саше Модель S110 Продуктивність - 110 шт/год .

**РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ
БАКТЕРІОЦИНУ**

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина після ферментації перекачується у збірник (Р-1) для зберігання. Далі за допомогою насоса (Н-2) направляється до центрифуги.

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1. Відділення біомаси

Культуральну рідину розділяють на біомасу і нативний розчин за допомогою осаджувальної центрифуги (Ц-3). Під час центрифугування контролюють $n=10000$ об/хв. Далі супернатант подають на стадію ультрафільтрації (до ТП 3.1).

за допомогою перистальтичного насоса (Н-11) надходить у збірнику (Р-12) і по закінченню процесу подається на вакуум-випарювання (до ТП 5.1).

ТП 5. Концентрування бактеріоцину

ТП 5.1 Вакуум-випарювання

Концентрат бактеріоцину (від ТП 4.1), зі збірника (Р-12) за допомогою перистальтичного насоса (Н-13) подають до вакуум-випарного апарату (ВВУ-14), де за допомогою насиченої пари фільтрат позбавляється зайвої вологи. Фільтрат упарюється в 5 разів при температурі 40 - 50°C. Далі готовий концентрат до закінчення процесу за допомогою перистальтичного насоса (Н-15) подають у збірник (Р-16) і по закінченню процесу подають на сушіння (до ТП 6.1).

					НУХТ БТЕК 02.01.14. КР ПЗ			
<i>З м</i>	<i>А р</i>	<i>№ док ум.</i>	<i>П і д п</i>	<i>Д а</i>	Розділ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ БАКТЕРІОЦИНУ	<i>Л і т.</i>	<i>А р к.</i>	<i>А р к у ш і</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					54	874
<i>Н.</i>						Кафедра БТМ		
		Стабніков В.П.						

ТП 6. Сушіння бактеріоцину

ТП 6.1 Сушіння бактеріоцину

Сушіння концентрат відбувається у вакуум сушильній шафі (ВС-17). Температура сушіння – 40-50 °С. Вмикаємо шафу і починається просушування бактеріоцину. Після сушіння продукт подається на стадію подрібнення. (до ТП 7.1.)

ТП 7. Подрібнення та просіювання

ТП 7.1 Подрібнення та просіювання бактеріоцину

Висушений бактеріоцин (від ТП 6.1) подрібнюють на дробарці (Д-18). Після подрібнення порошок просіюють на ситі з отворами 0,3мм(С-19) і відправляють на наступну стадію.

ПМВ 8. Пакування, маркування і відвантаження

ПМВ 8.1. Фасування бактеріоцину в саше-пакети

Фасування подрібненого бактеріоцину здійснюється за допомогою фасувально-пакувального апарату (ФПА-24) з точністю зважування для сипучих продуктів $\pm 0,3$ г.

ПМВ 8.2. Пакування та маркування.

На саше (від МПВ 8.1) наносять етикетки з інструкцією, датою виробництва.

ПМВ 8.3. Фасування флаконів у групову тару

Готові флакони (від МПВ 8.2) пакують у групову тару (по 10 пакетів) та відвантажують на склад.

ЗВ 9. Знешкодження відходів

ЗВ 9.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи, які утворюються направляються та стадію очищення. Очищення стічних вод здійснюють в окситенках, потім направляються в каналізацію.

ЗВ 9.2. Знешкодження газоподібних відходів

Газоповітряні відходи утворюються під час сушіння цільового продукту. Такі відходи знешкоджують за допомогою біологічного методу.

ЗВ 9.3. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи ,отримані після упаковки направляються на вторинну переробку.

РОЗДІЛ 6. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції (напівфабрикату)

6.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки лікарського засобу (іншого цільового продукту)

Більшість захисних культур для технології сирів випускаються у вигляді сухого порошку. Суха форма характеризується високим терміном зберігання, зручністю транспортування та зберігання, не вимагає суворого дотримання температурного режиму.

Обґрунтування вибору товарної форми

На сьогоднішній день пакування сухого порошку здійснюється у декількох видах первинної упаковки:

- ✚ скляні флакони;
- ✚ пластикові флакони;
- ✚ багатошарові пакетики саше.

Як первинну упаковку доцільно обрати багатошарові пакетики саше, оскільки вони забезпечують захист від вологи, проходження кисню всередину упаковки та світла на рівні зі склом, але при цьому мають меншу вартість.

Як відомо, скло є хімічно інертним, непористим, жорстким пакувальним матеріалом, що забезпечує майже 100% бар'єр для вологи та кисню.

Найкращим матеріалом, що застосовується у виготовленні пакетів-саше являється алюмінієва фольга, що буває різної товщини, її використовують бо вона здатна захистити продукт від вологи та кисню на відмінно від скла.

					НУХТ БТЕК 02.01.14. КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Ар</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Да</i>	Розділ 6. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					57	87
<i>Н.</i>					Кафедра БТМ			
		Стабніков В.П.						

Вологобар'єрні властивості полімерів також враховуються як важливий фактор при виборі упаковки.

Багато полімерів використовують як додактовий захист від впливу навколишнього середовища, у цю групу відносяться поліпропілен , поліетилентерефталат, циклоолефінові сополімери, металоцени та інші полімери .

6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання лікарського засобу (іншого цільового продукту)

Обґрунтування способу висушування

Кінцевою формою біоконсерванту на основі бактеріоцину є сухий порошок, оскільки при його використанні стабільність та якість препарату майже не змінюється впродовж усього терміну зберігання.

Для отримання порошкоподібних препаратів можуть застосовуватися такі методи:

- сушіння за допомогою розпилювальної сушарки;
- вакуумна сушка;
- сублімаційна сушка (ліофілізація) (Guergoletto та ін.,2012).

Сушіння за допомогою розпилювальної сушарки

Недоліки:

- ✓ Підвищення витрат сушильного агента і енергії, як на нагрівання сушильного агента, так і на розпорощення вихідного рідкого продукту.

Переваги:

- ✓ Стійкі в роботі і дозволяють отримувати висушувані матеріали у вигляді однорідного порошку.

Вакуумна сушка

Недоліки:

- ✓ Низька продуктивність;
- ✓ необхідність застосування ручної праці;

- ✓ Витрата часу на завантаження й вивантаження матеріалу, наслідок-тривалість процесу.

Переваги:

- ✓ Сушіння матеріалів при невисоких температурах, як наслідок менша витрата тепла.

Вакуум-сушильні апарати як і ліофільні сушарки використовуються для сушіння термолабільних препаратів, різниця полягає з сублімаційними сушарками полягає в тому, сушіння відбувається при кімнатній температурі чи може бути підвищеною до температурного режиму, який витримує цільовий продукт. В основному дані сушильні шафи використовують ся для невеликої кількості вологого продукту. Її перевагами також є , що даний тип сушарки малогабаратний і може бути використана як на великих підприємствах так і на малих, і додатково має дуже просту конструкцію.

Сублімація

Сублімація являється один із найзручнішим та найпрактичніших методів сушіння, використовується в основному для сушіння термолабільних речовин. Даний вид сушіння умовно складається з 3 етапів : заморожування, первинна сушка й вторинна сушка. Ліофілізація дозволяє продовжити терміни зберігання продукції, та в цілому являється один із методів консервування, може використовуватися для продуктів різного біологічного походження, наприклад у технології отримання сухої плазми донорської крові, також використовується у технології вакцин та сироваток , у технології пробіотиків та різних заквасок. Загалом, сублімація має популярність як у фармацевтичній промисловості, так і у харчовій .

Недоліки представлені:

- ✓ Створення високого вакууму для повноти висихання;
- ✓ Доволі тривалий процес сушіння;
- ✓ Має дуже великі енергозатрати.

Перевагами:

- ✓ живі клітини, які направляються на сублімацію, завдяки температурам та додаванням кріопротекторів не інактивуються в процесі сублімації;
- ✓ зберігається дисперсність фази продукту;
- ✓ сублімований продукт має великі терміни зберігання;
- ✓ у процесі сушіння на продукт відсутній вплив високих температур.

Обґрунтування стадії подрібнення та просіювання

Є безліч способів подрібнення цільового продукту, і вибір залежить від фізичних властивостей продукту, так і необхідного розміру частинок. Важливе значення при виборі відіграє міцність. Так наприклад крихкі та тверді матеріали, цукор чи зерно подрібнюють за допомогою розтирання чи розбивання. Якщо цільовий продукт має більш пластичний матеріал тоді важливо кутерувати. В залежності від типу дії та конструкції апарати для подрібнення поділяються на дробарки щоківі, конусні, валкові, молоткові, барабанні; бігуни, кульові, стрижневі, вібраційні, колоїдні млини тощо.

Щокова дробарка у своїй конструкції має дві поверхні, які знаходяться під невеликим кутом, що зближуються в нижній частині.

Переваги:

- ✓ Вони не займають багато місця та мають просту конструкцію.

Недоліки:

- ✓ Застосовуються для крупного і середнього дроблення.

Молоткова дробарка. Принцип дії полягає у тому, що сировина подрібнюється за допомогою ударів молотків, які рухаються, і додаткових ударів самого продукту об рельєфну поверхність стінок корпусу апарату.

Переваги:

- ✓ Використовують для дрібного і тонкого подрібнення.

Недоліки:

- ✓ Під час подрібнення частина матеріалу може зазнати переподрібнення.

Валкова дробарка. В основі покладено транспортування продукту за допомогою живильника через воронку у апарат, де відбувається захоплення

валками, які обертаються при однаковій швидкості назустріч один одному, подрібнюються та вивантажуються через нижню частину апарату.

Переваги:

- ✓ Найбільш ефективні для матеріалів помірної твердості, компактні та надійні в роботі, матеріал не переподрібнюється.

Недоліки:

- ✓ Малопродуктивні(Guergoletto та ін.,2012).

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

Контроль виробництва бактеріоцину

Активність бактеріоцину

Прояв інгібуючої активності бактеріоцину визначали за допомогою методом посіву на агарових середовищах і спостерігаючи за інгібуючою активністю проти штамів-антагоністів. Для цього на середовищах роблять лунки ,які мають діаметр близько 5мм, і наповнюють безклітинною культуральною рідиною об'ємом 100 мкл. Для негативного контролю можна застосовувати фосфатний буферний розчин. Пластини залишали на декілька годин при кімнатній температурі та після чого інкубували при 37 °С упродовж 24 годин.

Активність бактеріоцину визначали шляхом спостереження чіткої зони інгібування на агарі. *S. aureus* використовували як цільовий штам для визначення антимікробної активності (Gaspar та ін.,2016).

Вологість кінцевого продукту

Визначення та контроль вологості готового бактеріоцину можна проводити за допомогою сучасного лабораторного обладнання, так наприклад використовуючи електронний аналізатор фірми Radwag MA 50/C/P, виробництва Польщі

За допомогою даного аналізатора можна визначити показник вологості всього за 5-20 хвилин. В основі закладено більше 90 програм сушіння, які можна завести на різні типи продукції (Romano та ін.,2014).

					НУХТ БТЕК 02.01.14. КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Ар</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Да</i>	Розділ 7. Контроль виробництва.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					62	82
<i>Н.</i>					Кафедра БТМ			
		Стабніков В.П.						

**Карта постадійного контролю стадій ділянки виробництва
бактеріоцину**

Табл.7.1.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
ТП 1. Стадії виробництва бактеріоцину				
Кт.1.1 Зберігання культуральної рідини	Температура	Термометр технічний	Під час процесу зберігання	t = 4 °C
Кт 2.1 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, частота обертання, час, температура	Годинник, датчик обертів, Термометр технічний	Під час процесу центрифугування	t = 4 °C n=10000 об/хв τ =40 хв
Кт 3.1 Ультрафільтрація	Супернатант, температура, час, діаметр пор мембрани	Термометр, годинник, перевірка діаметру пор	Під час процесу ультрафільтрації	t = 4 °C τ =40 хв, d = 0,22 мкм
Кт 4.1 Екстракція бактеріоцину	Концентрат, концентрація етилацетату, температура, час	Термометр технічний, дозатор, годинник	Під час процесу екстракції	t = 4 °C, C = 1:1 τ =1 год
Кт 5.1 Вакуум-випарювання	Екстракт, температура, час, концентрація	Термометр технічний, годинник	Під час процесу концентрування	t = 40-50 °C K=5
Кт 6.1 Сушіння бактеріоцину	Температура, тривалість, тиск	Технічний термометр, годинник,	Під час висушування	P=6,65 Па, t=60±3 °C, τ = 1 год
Кт 7.1 Подрібнення та просіювання бактеріоцину	Діаметр частинок	Сито	Діаметр частинок визначається після процесу подрібнення	d=0.3мм
Кт 8.1 Пакування цільового продукту	Пакетик-саше Вага одного пакетика	Ваги	Під час пакування	m=3 г, m = 30 г Відповідність дати та номеру серії

РОЗДІЛ 8. Проєкт заявки на корисну модель

ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІОЦИНУ В391 НА ОСНОВІ

ВИСОКОПРОДУКТИВНОГО ШТАМУ *Lactobacillus plantarum* В391 У

ЯКОСТІ БІОКОНСЕРВАНТУ ДЛЯ СИРІВ

Галузь і застосування корисної моделі

Винахід належить до галузі промислової біотехнології. Винахід належить до галузі промислової біотехнології, зокрема до удосконалення технології виготовлення сирів, спрямованих на покращення якості та сиру, подовження терміну зберігання та зміни хімічних консервантів на безпечні для здоров'я населення. Запропонована корисна модель стосується синтезу бактеріоцину В391, який виявляє інгібуючу активність проти *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* і кількох штамів *Listeria monocytogenes*, з подальшим його використанням у якості консерванту у технології виробництва сиру.

Бактеріоцин призначений для подальшої трансформації у харчову добавку для застосування у молочній промисловості з метою продовження терміну зберігання сирів, та покращення їх якості та безпечності.

Корисна модель може бути впроваджена в рамках системи заходів на промислових підприємствах з метою оптимізації біотехнологічної технології виробництва плантацину В391 у якості біоконсерванту. Розширення вітчизняного ринку антимікробними препаратами на основі бактеріоцину молочнокислої бактерії дасть змогу виробляти більш безпечні молочні продукти.

					НУХТ БТЕК 02.01.14. КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Ар</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підп</i>	<i>Да</i>	РОЗДІЛ 8. Проєкт заявки на корисну модель.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
		Серебрякова В. Лич І.В.					63	64
<i>Н.</i>					Кафедра БТМ			
		Стабніков В.П.						

Відомі аналоги та їх основні недоліки

Як продуценти для бактеріоцинів найчастіше застосовується наступний клас бактерій: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* та *Oenococcus*. Бактеріоцини молочнокислих бактерій мають серйозну перевагу над іншими продуцентами бактеріоцинів, бо стійкі та активні у широкому діапазоні рН, вони термстабільні і проявляють високу інгібуючу активність як раз проти тієї патогенної мікрофлори, яка найчастіше зустрічається у сирах, а саме: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* та *Clostridium botulinum*.

Важливою перевагою являється, що молочнокислі бактерії мають чутливість до травних протеаз, включаючи трипсин, хімосин та панкреатин, а отже і не мають негативного впливу на мікробіоту кишково-шлункового тракту (Nájera & Albisu, 2021).

Бактеріоцини були відкриті досить давно і ретельно досліджені, тому деякі з них вже використовуються як комерційні харчові консерванти (Sugrue & Hill, 2024).

Бактеріоцини можуть мати вузький спектр, пригнічуючи таксономічно близькі бактерії, або широкий спектр, пригнічуючи широкий спектр бактерій (Nájera & Albisu, 2021).

Більшість видів лактобактерій відносяться до нормальної мікрофлори організму людини, а отже ця група бактерій і відповідно їх метаболіти, в тому числі і бактеріоцини мають статус GRAS (Generally Recognized as Safe), що дає їм можливість бути застосованими як консерванти для багатьох видів харчових продуктів, включаючи і сири.

У минулих роках класифікація бактеріоцинів включала в себе 4 класи, але в останньому класі особливістю бактеріоцинів було те, що вони склалися з комплексів, які містять як і вуглеводні склаові, так і ліпідні,

тому було прийнято рішення перекласифікувати їх в бактеріолізину. Тому нинішня класифікація включає в себе всього 3 класи (Nissen-Meyer ,2007).

Перший клас представляють собою лантибіотики. Які в свою чергу в залежності від особливостей структури поділяються на 2 підкласи : підклас А представлений бактеріоцинами лінійною формою , вони позитивно заряджені та мають молекулярну масу близько 2–4 кДа, діють на грампозивні бактерії,проникаючи у клітину шляхом створення пор.

Підклас Б лантибіотиків включає глобулярної форми бактеріоцини , які мають негативний або нейтральний заряд. Проте представники першого класу мають дуже вузьким спектр дії і часто викликають загибель близьких до продуцента штамів.

Усім відомим представником першого класу бактеріоцину є нізин. Він продукується бактерією *Lactococcus lactis* ,загалом вважається безпечним (GRAS) , і по всьому світу він дозволений для використання як харчовий консервант.

Крім того, нізин є єдиним бактеріоцином, дозволеним для широкого застосування в харчовій промисловості, і останнім часом були проведені безліч досліджень, що дають можливість стверджувати, що нізин може застосовуватися для боротьби з патогенною мікрофлорою у багатьох видах сирів (камамбер, манчего, чеддер)(Ulpathakumbura та ін.,2016).

Бактеріоцин лактацин, який синтезується *L. lactis* може застосовуватися проти великої групи патогенних мікроорганізмів (Fernández-González & Castrejón-Jiménez,2021).

До бактеріоцинів 2 класу відносяться невеликі пептиди, з молекулярною масою менше 10 кДа, вони досить термостабільні та кислотостабільні ,мають мембрану структуру .

Як і перший клас вони поділяють ся на 2 підкласи.Підклас II а, педіоцин-подібні чи активні до лістерій бактеріоцини, що мають N-термінальну послідовність амінокислот:тирозин-гліцин-аспарагін-гліцин-

валін-цистеїн. В цю групу відносяться дуже багато бактеріоцинів ,які включають в себе Pediosin, Lactococcin, Sakacin та інші.Ця група має позитивний заряд ,в своєму складі містять більше 40 амінокислотних залишків,які мають схожу послідовність амінокислот.

З усієї групи другого класу найбільш вивченим є Педіоцин РА-1 . Він синтезується *Pediosoccus acidilactici*, він був достатньо вивчений , охарактеризований і тому може бути вже застосований у якості харчового біоконсерванту (Ibrahim ,2019).

Підклас II b включає в себе бактеріоцини,що мають 2 окреми пептиди . До цієї групи належать лактацин F та лактокоцин G плантарицин E/F, плантарицин J/K .

Великої уваги вартує *L. plantarum* ,який синтезує бактеріоцин плантацин ,який може виступати чудовим біоконсервантом для сирів, бо має усі необхідні цьому властивості :термостабільність,активність у широкому діапазоні рН та найголовніше інгібуюча активність проти *L. monocytogenes* , *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* та *Clostridium botulinum* . Важливо відмітити ,що дані бактеріоцини можуть інгібувати плісняву *Penicillium solitum* , *Aspergillus versicol* та *Cladosporium herbaru* ,яка псує сир на процесі дозрівання та зберігання (Cheong & Turner,2014).

Третя підгрупа бактеріоцинів Пс має свої особливості-це бактеріоцини циркуляційної структури,мають позитивний заряд.Завдяки своїй циркуляційній структурі вони стабільні. Ця підгрупа пригнічує ріст широкого спектру грампозитивних бактерій. Для більшості з цієї групи доведено нетоксичність на організм людини.

Представником даного класу є Рамнозин А ,який був синтезований бактерією *Lactocaseibacillus rhamnosus* ,даний вид бактеріоцину у дослідженнях пригнічував ріст *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* , *Salmonella enterica* та *Staphylococcus aureus* (Jeong & Moon,2015).

Ще одним представником даного класу, якому присвячені наукові роботи є бактеріоцин Ентерокоцин AS-48, за своїми особливостями це круглий пептид, який в своєму складі містить більше 70 амінокислотних залишків, які зв'язані між собою циркуляційним пептидним зв'язком. Цей бактеріоцин при дослідженнях показав гарну активність проти *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Salmonella enterica* (Orpegård & Nissen-Meyer, 2007).

До останнього – третього класу відносяться термолабільні пептиди, які мають молекулярну масу більше ніж 30 кДа. Але дана група бактеріоцинів не має високого потенціалу у технології сиру через те що нестабільна при температурі. Сюди відносяться такі представники групи як гелветицини J і ентеролізін A.

Енторілін A це відкриття у світі бактеріоцинів, він був отриманий від бактерії роду *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Ентеролізін A може пригнічувати розвиток окремих ентерококів, педіококів, лактококів і лактобактерій (Nilsen & Holo (2003).

Так як основною проблемою цього класу є залежність від температури, вчені зацікавлені пошуками бактеріоцинів цієї групи, які були б більш лояльні до температури, так у нових роботах є вже певні результати, нещодавно було знайдено бактеріоцин NX371, який був синтезований *Lactobacillus acidophilus* NX2-6, що на 98,15% відповідає гелветицину J, який має антимікробну активність проти грам позитивних і грам негативних харчових патогенів, таких як кишкова паличка, сальмонела, лістерія, стафілокок та ентеробактер. І найголовнішим є те, що даний бактеріоцин був стабільний при pH 3.0-8.0 та температурі до 60 °C (Meng & Lu, 2021).

Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

Задача корисної моделі полягає у створенні високоефективного біоконсерванту для сирів на основі штаму *Lactobacillus plantarum* B391, що

продукує бактеріоцин В391, який відомий як плантарицин, який представляє великий інтерес як бактерицидний агент для *L. monocytogenes* та інших патогенів, таких як *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* і *Clostridium botulinum*. Ця властивість робить цей вид чудовим кандидатом для використання в якості біозахисних культур (Sanna та ін., 2023).

Поставлена задача вирішується тим, що із штаму *Lactobacillus plantarum* В391, отримують бактеріоцин В391, який синтезується дуже специфічним шляхом, що включає виробництво пребактеріоцину, подальше розщеплення препептиду на специфічному сайті процесингу, що видаляє лідерну послідовність і транслокацію пробактеріоцину за межі клітинної мембрани (Tamang, 2021).

Отриманий бактеріоцин В391 дуже стабільний у часі та стійкий до високих температур на відмінно від багатьох інших бактеріоцинів. Його широкий спектр дії проти багатьох *Listeria* spp., а також *E. faecalis* і *Cl. perfringens* робить цей протимікробний білок потенційним кандидатом для застосування з точки зору біобезпеки в сироробстві.

Опис запропонованого способу

На біосинтез бактеріоцинів, як і інших біологічно активних речовин, впливають умови росту продуцента: склад і кислотність середовища, температура і час культивування.

Велика кількість наукових робіт присвячена саме середовищу для культивування молочнокислих бактерій. Найбільшу увагу заслуговує саме стандартне середовище МРС, яке найчастіше використовується для вирощування молочнокислих бактерій, це середовище було відкрито Де Маном, Рогоза і Шарпом, вже багато років використовується саме для культивування цієї групи, але можуть використовувати і інші середовища.

Склад середовища (г/л):

- дріжджовий екстракт – 4.0;

- м'ясний екстракт – 10.0;
- гідролізат казеїну – 10.0;
- глюкоза – 20.0;
- цитрат амонію (двозаміщений) – 2.0; - ацетат натрію – 5.0; - твін 80 – 1.0;
- K₂HPO₄ – 2.0;
- MgSO₄ · 7 H₂O – 0.2.

Виділення та ідентифікація *Lb. plantarum* B391

6 різних колоній було виділено із французького сиру, і які були вирощено на середовищі MPC, але ідентифікація показала, що лише *Lb. plantarum* B391 виявив антибактеріальну активність під час скринінгу проти патогенної мікрофлори. Ідентифікація шляхом секвенування рРНК 16 с підтвердила ідентифікацію як *Lb. plantarum*.

Ріст *Lb. plantarum* B391 та бактеріоцину B391 виробництво

Зразок 100 мкл 18-годинної культури *Lb. plantarum* B391 висівали в 100 мл бульйону MRS та інкубували в колбах на 250 мл при 30 °C протягом 48 год. інкубаційного періоду проводилися виміри зміни рН, визначали протягом усього часу інгібуючу активність проти патогенної мікрофлори та контролювали зміни оптичної густини на спектрофотометрі.

Продуктування бактеріоцину B391

Ріст *Lb. plantarum* B391, зміни рН середовища та інгібуючу активність бактеріоцину контролювали постійно на протязі 48 годин. Максимальна активність бактеріоцину була через 24 години культивування на середовищі MRS і становила 6400 КУО/мл, при подальшому культивуванні інгібуюча активність пішла на спад і через 48 годин становила 3200 КУО/мл. Рівень рН протягом цього часу змінювався у межах від 6,52 до 4,71. А оптична густина зросла від 0,179 до 8,416 за 18 годин.

Часткове очищення бактеріоцину В391

Бактеріоцин, який був синтезований молочнокислою бактерією *Lb. plantarum* В391, був очищений частково за допомогою осадження сульфат амонію. *Lb. plantarum* В391 інкубували в 500 мл бульйону МРС при 30 °С протягом 18 год. Отриманий супернатант направляли на центрифугування на 10 хвилин (10000 об/хв., 4 °С), проводили корекцію рН до 6.0 за допомогою додавання 1м NAOH та фільтрували через мембранний фільтр з діаметром пор 0,22 мкм, а потім осаджували 40% сульфатом амонію протягом ночі при 4 °С. Осад збирали центрифугуванням (13000 об/хв, 60 хв, 4 °С), розчиняли в 14 мл 25 мМ буфера з ацетату амонію (рН 6,5) і завантажували на колонку SepPack C18. Елюювання проводили ізопропанолом. Після того перевіряли на інгібуючу активність та відправляли на подальші процеси.

Наступним завданням є концентрація цільового продукту. Фракція з вищою активністю випарювалась під вакуумом при температурі 55 °С за допомогою роторного випарника для отримання концентрату бактеріоцину. Наступною метою є одержання сухого порошку.

Реферат.

Винахід належить до галузі промислової біотехнології, зокрема до розробки біоконсервантів у технології сирів, що дозволяють замінити відомі консерванти на більш безпечний аналог. Запропонована корисна модель стосується синтезу бактеріоцину В391, що продукується *Lb. plantarum* В391, культивууючись на класичному середовищі МРС, при цьому володіє високою інгібуючою активністю проти патогенних мікроорганізмів.

Винахід передбачає синтезування бактеріоцину В391 молочнокислої бактерії з метою отримання біозахисної добавки, так як геномодифікований штам *Lb. plantarum* В391 синтезує досить велику кількість бактеріоцину,

який в свою чергу достатньо стабільний як при високих та низьких температурах , а також при різних значеннях рН.

Незважаючи на те, що була проведена велика робота з вивчення очищення, структури та характеристик бактеріоцину, що синтезується молочнокислими бактеріями, більшість бактеріоцинів не можна було широко та ефективно використовувати в харчових продуктах через вузький антимікробний спектр, низьку термостабільність та високу вартість виробництва.

Список використаної літератури.

1. О., В.Ляховська(2020). ВИРОБНИЦТВО МОЛОКА ТА МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ В УКРАЇНІ: РЕГІОНАЛЬНІ АСПЕКТИ. *АГРОСВИТ № 9*. DOI: 10.32702/2306-6792.2020.9.93.
2. М., О. Шугай(2013).Безпечність та якість сиру:як поліпшити мікробіологічні показники якості сиру. Інститут продовольчих ресурсів НААН України .УДК 637.333/579.67.
3. Martin JGP, Cotter PD(2023). Filamentous fungi in artisanal cheeses: A problem to be avoided or a market opportunity? *Helicon*,31;9(4):e15110. doi: 10.1016/j.helicon.2023.e15110.
4. M.S. Al-Gamal , A. Ibrahim , O. Sharaf, A. Radwan, N. M. Dabiza, A. M. Youssef , M. F. El-ssayad (2019).The protective potential of selected lactic acid bacteria against the most common contaminants in various types of cheese in Egypt. *Helion*,5. doi.org:10.1016/j.helicon.2019.e01362.
5. Erfani , G. Shakeri, M. Moghimani, A. Afshar. (2024).Specific species of probiotic bacteria as bio-preservative cultures for control of fungal contamination and spoilage in dairy products. *International Dairy Journal*,151. doi.org:10.1016/j.idairyj.2023.105863.
6. Sugrue I, Ross RP, Hill C(2024). Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials. *Nat Rev Microbiol*, 10 doi:10.1038/s41579-024-01045-x.
7. C.,C. Silva,S., P. Silva,S.,C. Ribeiro(2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front Microbiol*,9;9:594. doi: 10.3389/fmicb.2018.00594.
8. X. Zheng , X. Shi, B. Wang(2021). A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. *Front Microbiol* ,29;12:703284. doi: 10.3389/fmicb.2021.703284.
9. C. Loffi , E. Bortolazzo, A. Garavaldi,V. Musi,P. Reverberi,G. Galaverna, S. Sforza, T. Tedeschi(2021). Reduction in the Brining Time in Parmigiano Reggiano

Cheese Production Minimally Affects Proteolysis, with No Effect on Sensory Properties. *Foods*. Apr 3;10(4):770. doi: 10.3390/foods10040770.

10. M. Mozzon, R. Foligni, C. Mannozi, F. Zamporlini, N. Raffaelli, Aquilanti (2020). Clotting Properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) Aqueous Extract in Milk of Different Species. *Foods*, 27;9(6):692. doi: 10.3390/foods9060692.

11. F. Tidona, M. Zago, D. Carminati, G. Giraffa (2022). The Reduction of Salt in Different Cheese Categories: Recent Advances and Future Challenges. *Front Nutr*, 4;9859694. doi: 10.3389/fnut.2022.859694.

12. Y. Ardö, P., H. McSweeney, A. A. Magboul, V., K. Upadhyay, P., F. Fox (2017). Chapter 18 - Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. *Chemistry, Physics and Microbiology*, 445-482. doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1.

13. M., A. Murtaza, S. Ur-Rehman, F., M. Anjum, N. Huma, I. Hafiz (2014). Cheddar cheese ripening and flavor characterization: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 54(10):1309-21. doi: 10.1080/10408398.2011.634531.

14. H. Decadt, L., D. Vuyst (2023). Insights into the microbiota and defects of present-day Gouda cheese productions. *Current Opinion in Food Science*, 52. doi: 10.1016/j.cofs.2023.101044.

15. I., C. Duru, P. Laine, M. Andreevskaya, L. Paulin, S. Kananen, S. Tynkkynen, P. Auvinen, O., P. Smolander (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *Int J Food Microbiol*, 20;281:10-22. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017.

16. Ю. Орлюк, (2019). ПРОЦЕС ВИЗРІВАННЯ СИРІВ ЗА УЧАСТІ СИРНОГО СЛИЗУ. *ПРОДОВОЛЬЧІ РЕСУРСИ*, 7(12), 128–135. doi: 10.31073/foodresources2019-12-14.

17. І. Сливка, О. Цісарик, Л. Мусій (2020). Технологія м'якого сиру камамбер з використанням різних бактеріальних препаратів. *Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Харчові технології*, 22 (94), 71-79. doi: 10.32718/nvlvet-f9414.

18. J. Ropars ,M. López-Villavicencio,A. Snirc , S. Lacoste,T. Giraud(2017). Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*.1;12(3):e0171387. doi: 10.1371/journal.pone.0171387.
19. R. Tabla,A. Gómez,A. Simancas,J.,E. Rebollo,F. Molina,I. Roa(2018). Early blowing in raw goats' milk cheese: gas production capacity of Enterobacteriaceae species present during manufacturing and ripening. *J Dairy Res*,85(3):331-338. doi: 10.1017/S0022029918000511.
20. M. Ávila, N. Gómez-Torres , M. Hernández , Sonia Garde(2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*,172.doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.002.
21. A.,I. Nájera,S. Nieto,L., J., R. Barron,M. Albisu(2021). A Review of the Preservation of Hard and Semi-Hard Cheeses: Quality and Safety. *Int J Environ Res Public Health*,18(18):9789. doi: 10.3390/ijerph18189789.
22. Lucera, M. Mastromatteo, A. Conte, A., V. Zambrini, M. Faccia, M., A. Del Nobile(2014). Effect of active coating on microbiological and sensory properties of fresh mozzarella cheese. *Food Packaging and Shelf Life*,1,24-29.doi:10.1016/j.fpsl.2013.10.002.
23. T. Radicevic, S. Jankovic, S. Stefanovic, D. Nikolic, J. Djinovic-Stojanovic, D. Spiric(2019). Determination of natamycin (food additive in cheese production) by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*,333. doi: 10.1088/1755-1315/333/1/012096.
24. EFSA (2014). Scientific Opinion on the Re-Evaluation of Hexamethylene Tetramine (E 239) as a Food Additive. *The EFSA Journal*, 12, 3696.doi:10.2903/j.efsa.2014.3696.
25. R., C. Lima, A., P. Azevedo de Carvalho ,C., P. Vieira, R., V. Moreira , C. , A Conte-Junior(2021). Green and Healthier Alternatives to Chemical Additives as Cheese Preservative: Natural Antimicrobials in Active Nanopackaging/Coatings. *Polymers*,13(16):2675. doi: 10.3390/polym13162675.

26. A. Gálvez, H. Abriouel, R. López, N., B. Omar. (2017) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1), 51-70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001.
27. L., V. Souza, E. Martins, I. Moreira, A., F. de Carvalho (2022). Strategies for the Development of Bioprotective Cultures in Food Preservation. *Int J Microbiol*. 2022:6264170. doi: 10.1155/2022/6264170.
28. T. Bintsis, P. Papademas. (2024). The Application of Protective Cultures in Cheese: A Review. *Fermentation*, 10(3), 11. doi:10.3390/fermentation10030117.
29. I. Nájera, S. Nieto, L., J., R. Barron, M. Albisu (2021). A Review of the Preservation of Hard and Semi-Hard Cheeses: Quality and Safety. *Int J Environ Res Public Health*, 18(18):9789. doi: 10.3390/ijerph18189789.
30. Sugrue I, Ross RP, Hill C (2024). Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials. *Nat Rev Microbiol*, 10 doi:10.1038/s41579-024-01045-x.
31. S. Elayaraja, N. Annamalai, P. Mayavu, T. Balasubramanian (2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(1) doi: 10.12980/APJTB.4.2014C537.
32. C. Oppegård, P. Rogne, L. Emanuelsen, P., E. Kristiansen, G. Fimland, J. Nissen-Meyer (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 13(4):210-9. doi: 10.1159/000104750.
33. C.P. Ulpathakumbura, C. Senaka Ranadheera, N.D. Senavirathne, L.P.I.N.P. Jayawardena, P.H.P. Prasanna, Janak K. Vidanarachchi (2016). Effect of biopreservatives on microbial, physico-chemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Food Bioscience*, 21-25. doi:10.1016/j.fbio.2015.12.003
34. J., C. Fernández-González, A. Martínez-Tapia, G. Lazcano-Hernández, B., E. García-Pérez, N., S. Castrejón-Jiménez (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals (Basel)*, 11(4):979. doi: 10.3390/ani11040979.

35. O., O. Ibrahim (2019). "Classification of Antimicrobial Peptides Bacteriocins, and the Nature of Some Bacteriocins with Potential Applications in Food Safety and Bio-Pharmaceuticals". *EC Microbiology* 15.7 ,591-608.
36. R. Sanna,F. Piras,G. Siddi , M., P. Meloni ,M. Demontis ,V. Spanu ,G. Nieddu, M. Cuccu, E.,P. De Santis,C. Scarano(2023). Use of commercial protective cultures in portioned sheep milk cheeses to control *Listeria monocytogenes*. *Ital J Food Saf*8,12(1):10484. doi: 10.4081/ijfs.2023.10484.
37. Y.,L. Cheong, A. Sandhu, J. Jayabalan, T., K. Le, N., T. Nhiep, H.,T. MyHo, J. Zwielehner, N. Bansal, M., S. Turner(2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*,91-97. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.011
38. Y.,J. Jeong,G.,S. Moon(2015). Antilisterial Bacteriocin from *Lactobacillus rhamnosus* CJNU 0519 Presenting a Narrow Antimicrobial Spectrum). *Korean J Food Sci Anim Resour*,35(1):137-42. doi: 10.5851/kosfa.2015.35.1.137.
39. C. Oppegård,P. Rogne,L. Emanuelsen,P., E. Kristiansen,G. Fimland,J. Nissen-Meyer (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol*,13(4):210-9. doi: 10.1159/000104750.
40. T. Nilsen, I., F. Nes, H. Holo(2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol*,69(5):2975-84. doi: 10.1128/AEM.69.5.2975-2984.2003.
41. F. Meng, X. Zhu, H. Zhao, T. Nie, F. Lu, Z. Lu, Y. Lu(2021). A class III bacteriocin with broad-spectrum antibacterial activity from *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 and its preservation in milk and cheese. *Food Cotrol*,121. doi:10.1016/j.foodcont.2020.107597.
42. L. Trejo-González ,A., E. Gutiérrez-Carrillo,A., I. Rodríguez-Hernández ,M. Del Rocío López-Cuellar, N. Chavarría-Hernández(2022). Bacteriocins Produced by LAB Isolated from Cheeses within the Period 2009-2021: a Review. *Probiotics Antimicrob Proteins*,14(2):238-251. doi: 10.1007/s12602-021-09825-0.

43. B.,R. Sharma,P.,M. Halami, J., P. Tamang(2021). Novel pathways in bacteriocin synthesis by lactic acid bacteria with special reference to ethnic fermented foods. *Food Sci Biotechnol*,26;31(1):1-16. doi: 10.1007/s10068-021-00986-w.
44. В. Борцюх, М. Шугай (2016). Бактеріоцини молочнокислих бактерій як природні консерванти харчових продуктів.*Продовольчі ресурси*, 4(06), 167–175.ISSN 2616-7204.
45. Н., Є. Кузьо, Н., С. Косар, В., В. Малиха(2023). ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕНДЕНЦІЙ РОЗВИТКУ РИНКУ МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ УКРАЇНИ ТА НАПРЯМИ АКТИВІЗАЦІЇ МАРКЕТИНГОВОЇ ДІЯЛЬНОСТІ НА НЬОМУ ВИРОБНИКІВ СИРУ. *Менеджмент та підприємництво в Україні: етапи становлення та проблеми розвитку*, № 1 (9). УДК 658.8:338.4:637.1.
46. [Електронний ресурс] – Режим доступу :<https://413.com.ua/ua/p276212525-antimikrobnuj-agent-nisin.html>. (дата звернення 13.09.2024).
47. O., O. Ibrahim (2019). “Classification of Antimicrobial Peptides Bacteriocins, and the Nature of Some Bacteriocins with Potential Applications in Food Safety and Bio-Pharmaceuticals”. *EC Microbiology* 15.7 ,591-608.
48. P. Fernandes, D. Loureiro, V. Monteiro, C. Ramos, L., A. Nero, S., D. Todorov(2017). *Lactobacillus plantarum* isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. *Annals of Microbiology* . 67, pages433–442. DOI: 10.1007/s13213-017-1275-1.
49. І., П. Данилов (2008). Апарати мікробіологічної промисловості. Біотехнологія,Харьків НТУ С.271 .
50. Ю., В. Карлаш ,Є., О. Омельчук . Основи проектування біотехнологічних виробництв/ Київ НУХТ – 2019 – с. 253.
51. .А.,Н. Плановский . Процессы и аппараты химической технологии: Изд. 5. – 1962. – 848 с.
52. Lei S, Zhao R, Sun J, Ran J, Ruan X, Zhu Y(2020). Partial purification and characterization of a broad-spectrum bacteriocin produced by a *Lactobacillus*

plantarum zrx03 isolated from infant's feces. Food Sci Nutr.doi: 10.1002/fsn3.1428. PMID: 32405378; PMCID: PMC7215221.

53. І. Черевко,А., М. Поперечний. Процеси і апарати харчових виробництв: підручник/ О., І. Черевко,А., М. Поперечний. 2-е видання, доп. та випр. Х.: Світ Книг, 2014. 495 с.

54. Zhang J, Yang Y, Yang H, Bu Y, Yi H, Zhang L, Han X, Ai L(2018). Purification and Partial Characterization of Bacteriocin Lac-B23, a Novel Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* J23, Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2018.02165.

55. S. Elayaraja , N. Annamalai,P. Mayavu, T. Balasubramanian(2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac J Trop Biomed*,4(1) doi: 10.12980/APJTB.4.2014C537

56. Фізичні методи очищення рідин: конспект лекцій / Уклад.: О.М. Терентьєв, А.В. Ворфоломєєв. – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 162 с.

57. Реактор-змішувач об'ємом 30 л . Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай) [Електронний ресурс] .Режим доступу :<https://ua.achievehem.com/>.

58. Реактор хімічний з нержавіючої сталі обладнаний якорною мішалкою на 250л. Виробник : JCT, Chine.[Електронний ресурс] .Режим доступу <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-304-and-316l-stainless-steelchemical-reactor-stirrer62028576539.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.31f023b7NLzqjc>.

59. Онлайн-каталог БИОТЕХНО – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/pilotnaya-fermentatsiya/reaktor-s-meshalkoy-50-l/>.

60. Реактор-змішувач об'ємом 200 л. Виробник: «ACHIEVE CHEM» (Китай) [Електронний ресурс] .Режим доступу :<https://ua.achievehem.com/>.

61. Емкости из нержавеющей стали от 30 до 20000 литров. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://stprom.com.ua/p15745045-emkostinerzhaveyuschej-stali.html>.

62. Реактор хімічний з нержавіючої сталі обладнаний якорною мішалкою на 40л. Виробник : JCT, Chine.[Електронний ресурс] .Режим доступу <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-304-and-316l-stainless-steelchemical-reactor-stirrer62028576539.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.31f023b7NLzqjc>.
63. Вакуумна сушильна шафа. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: https://medservice.net.ua/p1368929584-shafa-sushilnavakuumna.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjwwNWKBhDAARIsAJ8HkhhdgjifTO04jyRguG5zT1pbOFpMRrsMg7wpcge40SkEz7SBXVSEQP4aAs2XEALw_wcB.
64. Дробарка лабораторна молоткова Perten Instruments LM 120 (Україна). [Електронний ресурс] .Режим доступу : https://chemtest.com.ua/laboratornaya_molotkovaya_melnica_perten_instruments_lm_120
65. Вібраційне сито SWECO. [Електронний ресурс] .Режим доступу :<https://vibro-separator.ru/kruglij-separator>.
66. Горизонтальна машина для фасування і упаковки в саше Модель S110. [Електронний ресурс] .Режимдоступу:https://www.peterbinder.ru/catalog/gorizontalnye_mashiny_dlya_fasovki_i_upakovki_v_sashe/model_S110/ .
67. Guergoletto K., Sivieri K., Tsuruda A., et al.(2012). Food Industrial Processes Methods and Equipment. Dried Probiotics for use in functional food applications. Benjamin Valdez (ed.), InTech, Shanghai, China. 2012. P. 227—235.
68. Broeckx G, Vandenneuvel D, Claes IJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm.* 2016 May 30;505(1-2):303-18. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002.
69. Du T, Xu J, Zhu S, Yao X, Guo J, Lv W.(2022). Effects of spray drying, freeze drying, and vacuum drying on physicochemical and nutritional properties of protein

- peptide powder from salted duck egg white. *Front Nutr.*;9:1026903. doi: 10.3389/fnut.2022.1026903.
70. Broeckx G, Vandenneuvel D, Claes IJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm.* 2016 May 30;505(1-2):303-18. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002.
71. Guergoletto K., Sivieri K., Tsuruda A., et al.(2012). Food Industrial Processes Methods and Equipment. Dried Probiotics for use in functional food applications. Benjamin Valdez (ed.), InTech, Shanghai, China. 2012. P. 227—235.
72. C. Gaspar, G.G. Donders, R. Palmeira-de-Oliveira, J.A. Queiroz, C. Tomaz, J. Martinez-de-Oliveira and A. Palmeira-de-Oliveira(2018). Вироблення бактеріоцину пробіотичним штамом LaKS400 *Науково-дослідний центр охорони здоров'я*.
73. Romano A., Blaiotta G., Di Cerbo A., et al.(2014). Spray-dried chestnut extract containing *Lactobacillus rhamnosus* cells as novel ingredient for a probiotic chestnut mousse. *J. Appl. Microbiol* Vol. 116. P. 1632—1641.
74. R. Sanna, F. Piras, G. Siddi, M., P. Meloni, M. Demontis, V. Spanu, G. Nieddu, M. Cuccu, E., P. De Santis, C. Scarano(2023). Use of commercial protective cultures in portioned sheep milk cheeses to control *Listeria monocytogenes*. *Ital J Food Saf* 8,12(1):10484. doi: 10.4081/ijfs.2023.10484.
75. B., R. Sharma, P., M. Halami, J., P. Tamang(2021). Novel pathways in bacteriocin synthesis by lactic acid bacteria with special reference to ethnic fermented foods. *Food Sci Biotechnol*, 26;31(1):1-16. doi: 10.1007/s10068-021-00986-w.
76. P. Fernandes, D. Loureiro, V. Monteiro, C. Ramos, L., A. Nero, S., D. Todorov(2017). *Lactobacillus plantarum* isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. *Annals of Microbiology*. 67, pages 433–442. DOI: 10.1007/s13213-017-1275-1.
77. S. Elayaraja, N. Annamalai, P. Mayavu, T. Balasubramanian(2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(1) doi: 10.12980/APJTB.4.2014C537