

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

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

«До захисту в ЕК»  
Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри

Пирог Т.П.  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**  
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: «Культивування *Lactobacillus bulgaricus* з метою використання у виробництві йогурту»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

Філіпенко Анастасія Андріївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Волошина Ірина Миколаївна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Рецензент

Шкотова Л.В.

(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань. \_\_\_\_\_

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь Бакалавр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри  
біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“ ” 20 року

**З А В Д А Н Н Я**

**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

**Філіпенко Анастасії Андріївни**

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Lactobacillus bulgaricus* з метою використання у виробництві йогурту»

керівник роботи Волошина І.М., доц., к.т.н.,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27” жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем роботи до 31.01.2021

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 50 м<sup>3</sup>,  
коефіцієнт заповнення ферментера становить 0,7 ,  
цільовий продукт йогурт, виробничий штам *Lactobacillus bulgaricus*.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Характеристика цільового продукту

Характеристика біологічного агента

Техніко-економічне обґрунтування

Обґрунтування вибору технологічної схеми

Специфікація обладнання

Опис технологічної схеми

Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва йогурту формату А1- аркушів 1

Апаратурна схема виробництва йогурту формату А1 - аркушів 1



## РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений ділянці підготовчих робіт та виробничого культивування *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* з метою одержання закваски для йогурту.

У дипломному проекті обґрунтовано вибір штаму та основні технологічні аспекти до ферментаційних стадій і виробничого культивування, викладено технологічний процес ділянки одержання біомаси *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, який включає в себе блок допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії підготовки посівного матеріалу (в колбі, 5 л інкуляторі) та вирощування культури у виробничому ферментері, об'ємом 50 л.

Як новизну проекту запропоновано використання стійкого до ампіциліну штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* СНСС 15466, який володіє низькою пост продукцією молочної кислоти та підвищеним синтезом екзополісахаридів, що дозволяє отримувати достатньо густі кисломолочні продукти (в тому числі і йогурти) з приємним смаком.

**Ключові слова:** *йогурт, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *кисломолочні продукти, біосинтез, поживне середовище.*

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ .....	10
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування .....	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого – біохімічні ознаки <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .....	16
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту .....	19
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт .....	19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	23
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	24
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів. ....	25
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	26
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ....	27
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу .....	27
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	27
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	31
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	31
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища .....	34
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	35
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	37
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	47
7.2. Мікробіологічний контроль.....	47
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	52
7.3.1. Концентрація біомаси.....	52
7.3.2. Концентрація цільового продукту .....	54

7.3.3. Концентрації джерела вуглецю та азоту .....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	57

## ВСТУП

Кисломолочні харчові продукти виробляють шляхом сквашування молока або вершків заквашуваними композиціями молочнокислих бактерій. Молочна кислота, яка наявна в цих продуктах, покращує обмін речовин, підсилює перистальтику кишечника та разом з антибіотичними речовинами, які також синтезуються молочнокислими бактеріями, пригнічує розвиток патогенних мікроорганізмів, які можуть потрапляти в організм людини через шлунок. Молочні білки в процесі сквашування молока розпадаються до пептидів та амінокислот, які значно легше засвоюються організмом людини. Також молочнокислі бактерії виробляють такі вітаміни, як В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, С, які підсилюють корисні властивості кисломолочних продуктів у порівнянні з свіжим молоком [1, 2].

Використання ефективних заквашуваних препаратів – це обов'язкова та необхідна умова виробництва якісної кисломолочної продукції, оскільки закваска відіграє важливу роль у формуванні смаку, консистенції та запаху, а також обумовлює харчову і біологічну цінність кисломолочної продукції [3].

Для отримання кисломолочних продуктів використовується кілька форм заквасок – це рідкі або сухі закваски, сироватка з попередніх виробничих партій. Найчастіше зараз використовують сухі закваски - ліофільно висушені бактеріальні концентрати, адже вони здатні не втрачати свої властивості протягом тривалого часу. Ще однією перевагою ліофільних заквасок є зручність у транспортуванні, оскільки вони не вимагають особливо суворих умов, як, наприклад, рідкі або заморожені закваски.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Вступ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Філіпенко А.А.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Волошина І.М.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>			<i>Кафедра БТМ</i>			

Навіть такий недолік, як подовжена лаг-фаза (за рахунок часу, коли культури вбирають необхідну життєдіяльності кількість води) компенсується названими вище перевагами. Таким чином, можна дійти висновку, що ліофілізовані заквашувані препарати є останнім словом у технології отримання заквасок [4].

**Актуальність.** Розробкою концентрату молочнокислих бактерій в вигляді ліофілізованих препаратів займались чимало дослідників як в нашій країні, так і за кордоном. Процес отримання препарату включає в себе такі етапи: накопичення клітин молочнокислих бактерій в поживному середовищі, їх осадження шляхом центрифугування або сепарування та ліофільне висушування, при якому потрібно зберегти максимально можливу кількість життєздатних клітин [1, 5].

Якість цих препаратів в основному залежить від якості застосовуваних заквасок. Тому, створення конкурентоспроможних підприємств по виробництву заквашуваних препаратів, продукція яких не поступалася ні по якості, ні по собівартості іноземним аналогам залишається досить актуальною у нашій країні. Це сприяє підвищенню конкурентоздатності продукції та збільшенню на ринку частки заквашуваних препаратів вітчизняного виробництва.

На сьогодні в Україні наявне лише одне підприємство (Державне дослідне підприємство Інституту продовольчих ресурсів), яке займається власною розробкою і виробництвом заквашуваних препаратів та кілька підприємств, які займаються фасовкою та продажем готових заквашуваних культур, але якість даної продукції на даний момент не досягла рівня європейських аналогів, а обсяги виробництва низькі і в основному під замовлення окремих виробників кисломолочних продуктів або для продажу в супермаркетах. Наразі лідером в галузі розробок і виробництва бактеріальних заквасок протягом багатьох років є німецька фірма “Hr. Hansen”.

**Новизна роботи:** використання стійкого до ампіциліну штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 15466, який має низьку пост продукцію молочної кислоти та підвищений синтез екзополісахаридів, що дозволяє отримати досить густі кисломолочні продукти (в тому числі і йогурти) з приємним смаком [6].

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

**Йогурт** – це традиційний кисломолочний продукт країн Балканського півострова і Туреччини, який отримують шляхом сквашування молока культурами термофільного стрептокока (*Streptococcus thermophilus*) і болгарської палички (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) [7].

Йогурт виготовляють такими способами: термостатним та резервуарним [1, 4].

При **термостатному способі** в підготовлене до заквашування молоко, вносять закваску, розливають у дрібну тару, яку розміщують в термостатній камері. Після сквашування йогурт вносять у холодильну камеру, де він охолоджується і дозріває. Таким чином отримують густий йогурт з незруйнованим згустком [1].

При **резервуарному способі** сквашування молока відбувається у спеціальних ємностях з мішалками. Отриманий згусток перемішують, охолоджують і фасують. Таким чином отримують усі типи рідких питних йогуртів, в тому числі з фруктовими та іншими наповнювачами.

Останній спосіб є більш економічно вигідним, адже вихід продукції на одиницю використаної виробничої площі більший у 1,5-2 рази, а витрати ручної праці нижчі на 25% [1].

Для отримання йогурту наведеними вище двома способами, необхідно застосовувати сухий заквашуваний концентрат з такими характеристиками [7, 8].

**Склад:** ліофільно висушена культура *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* не менше  $10^{10}$  КУО/г. Допоміжні речовини: лактози моногідрат, фруктоза, кремнію діоксид колоїдний.

					НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Акрцшів
Розроб.		Філіпенко А.А.						
Перевір.		Волошина І.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ		

**Форма випуску.** Ліофілізат для прямого внесення для виготовлення кисломолочних продуктів у пластикові флакони по 0,5 г готового продукту, у картонній пачці вкладено 10 флаконів. Також, раціонально випускати ліофілізат у поліетиленових пакетиках по 0,5 – 1 г по 10 пакетиків в пачці, для тих хто готує кисломолочну продукцію в домашніх умовах.

**Санітарно-мікробіологічні показники** сухої бактеріальної закваски для виготовлення йогурту на основі *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [8,9]:

- БГКП в 1,0 г закваски - не допускаються;
- *Staphylococcus aureus* в 1,0 г закваски - не допускаються;
- Патогенні мікроорганізми, в тому числі сальмонели в 10,0 г - не допускаються;
- Дріжджі й плісневі гриби - не більше 5 КУО / г.

**Санітарно-хімічні показники** на токсичні елементи, не більше [7]:

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

**Корисна дія.** Лікувально-профілактичні властивості йогурту обґрунтовані здатністю *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* приживатися в кишечнику людини. Компоненти препарату дозволяють захищати травну систему від впливу гнильної мікрофлори і патогенних мікроорганізмів, запобігають утворенню токсичних продуктів білкового розпаду і абсорбції їх в кров.

**Спосіб застосування.** Для приготування закваски вміст флакону розчиняють 5 мл очищеної води з розрахунку на 1 дозу препарату. Необхідно відміряти певну кількість води, після чого відкрити флакон з порошком, ввести у нього частину води і акуратно перемішати до утворення рівномірної суспензії жовтувато-блідого або білувато-сірого

кольору. Після цього суспензію із флакона вносять в ємність із залишком відміряної води. 5 мл готового розчину містить 1 дозу препарату. Не рекомендовано зберігати препарат після розчинення.

Залежно від рецептури закваску готують на цільному або знежиреному молоці доброї якості, яке стерилізують за температури 121 °С з витримкою 15-20 хв (при приготуванні лабораторної закваски) або пастеризують при 92-95 °С з витримкою 20-30 хв (при приготуванні виробничої закваски). Відразу ж після термічної обробки молоко охолоджують до температури заквашування і вносять в нього закваску в кількості 1-3 % залежно від умов.

**Умови зберігання.** Суху закваску можна зберігати не більше 6 місяців за температури +2 –+8 °С. Можна зберігати не більше 12 місяців за температури -12 – -18 °С [8].

## РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування

На сьогодні *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, є одним з найважливіших представників молочнокислих бактерій, що використовуються у виробництві заквашуваних препаратів для йогуртів, сирів, а також функціональних кисломолочних продуктів і пробіотиків, які використовують для лікування дисбактеріозу.

Нині у світі є багато штамів, що використовуються у виробництві йогурту, але одним з основних є виділений у 1919 році штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 [10]. Який є ефективним при застосуванні в різних заквашуваних композиціях, але весь час здійснюються наукові дослідження по скринінгу та селекції більш ефективніших штамів, які володіють кращими технологічними та пробіотичними властивостями, стійкістю до дії антибіотиків, а також здатністю формувати ліпші органолептичні показники готового харчового продукту, а саме:

1. Продукувати оптимальну кількість молочної кислоти, для того, щоб йогурт був не занадто кислим, а мав лише приємну кисличку;
2. Продукувати максимальну кількість полісахаридів, які забезпечують максимальну густоту готового продукту, утримують воду і запобігають виділенню сироватки в процесі реалізації.

Розглянемо наукові публікації за останні роки та виберемо оптимальний штам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (табл. 2.1) для виробництва йогурту.

					НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата				
Розроб.		Філіпенко А.А.			РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Волошина І.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ		

Таблиця 2.1.

**Перспективні штами *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* з метою одержання заквашуваної композиції для виробництва йогурту**

Назва штаму, літ. джерело	Склад поживного середовища, г/л	Концен-трація клітин, КУО/мл	Тривалість культивування, год	Переваги застосування штаму
Штам CHCC15466 [6]	бактопротеозопептон - 10; бактомясний екстракт - 10; дріжджовий екстракт-5; декстроза – 20; сорбітанмоноолеат - 1; цитрат амонію - 2; ацетат натрію - 5; сульфат магнію – 0,1; сульфат марганцю – 0,05; гідроортофосфат калію – 2.	$2 \times 10^9$	20	Продукує високу концентрацію полісахаридів, чим формує якісну текстуру йогурту. Виділяє невелику кількість молочної кислоти і надає йогурту приємного м'якого смаку. Стійкий до дії ампіциліну.
Штам CCM 7712 (Selur 6) [11]	бактопротеозопептон - 10; бактомясний екстракт - 10; дріжджовий екстракт-5; декстроза - 20; сорбітанмоноолеат - 1; цитрат амонію - 2; ацетат натрію - 5; сульфат магнію – 0,1; сульфат марганцю – 0,05; гідроортофосфат калію – 2.	$5 \times 10^8$	18	Володіє антагоністичними властивостями щодо ряду патогенних мікроорганізмів.
Штам CHCC 7159 [12]	Знежирене сухе молоко – 95	$1 \times 10^9$	20	Покращує текстуру йогурту і надає приємного смаку.
Штам NRRL B-30892 [13]	Знежирене молоко – 100	$4 \times 10^8$	17	Пригнічує розвиток патогенних бактерій в кишечнику, зменшує алергічні та запальні реакції на подразники, збільшує поглинання вітамінів.
Штам NCFM [28]	ПС №5 : $MnSO_4 \times 5H_2O$ - 0,05; цистеїн - 0,1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,2; $2KH_2PO_4 \times H_2O$ - 2,0; амоній лимоннокислий - 2,0; $CH_3COONa \times 3H_2O$ - 5,0; пептон сухий ферментативний - 10,0; глюкоза - 20,0; печінковий екстракт - 100,0; дріжджовий автолізат - 50,0; гідролізат знежиреного молока - 330,0; твін-80 - 1,0;	$1 \times 10^7$	24	Температура 37 °С; рН 6,5 (регулюють 5%-м розчином аміаку); надлишковий тиск 0,03-0,04 МПа; 10%-на доза посівного матеріалу від об'єму культуральної рідини.
Штам NCFM [29]	ПС №6: молочної сироватки - 170; екстракту висівок - 10; картопляного екстракту - 10; знежиреного молока - 10; натрію оцтовокислого - 0,765; марганцю сірчаноокислого - 0,17;	$1 \times 10^7$	24	Температура 37±1 °С; рН 6,8-7,0 (регулюють 5%-м розчином аміаку); надлишковий тиск 0,03-0,04 МПа. Упродовж процесу біосинтезу періодично (щогодини на 1,0 хв) вмикають перемішуваний пристрій (70 об/хв).

Аналізуючи дані таблиці 2.1, можемо дійти висновку, що штами *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7712 та NRRL B-30892 є рекомендовані для застосування у пробіотичних композиціях, при чому обидва штами бажано застосовувати сумісно з іншими видами молочнокислих бактерій (наприклад – *Streptococcus thertnophilus*). У свою чергу штами *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 15466 та CHCC 7159 необхідні для застосування у промисловому виробництві молочнокислих продуктів, при чому вони мають практичну цінність як заквашувана композиція у суміші з іншими молочнокислими бактеріями, так і у вигляді закваски чистої культури. Також варто відмітити, що штам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 15466 відрізняється тим, що покращує смакові якості продукту (менш кислий і приємний смак, які є необхідні справжньому йогурту [14]) в той час, як продукція на основі інших штамів має більш кислий або терпкий присмак. Штам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 15466 є «штамом з високими текстуруючими властивостями», який при інокуляції в середовищі при співвідношенні  $1 \times 10^5$ –  $1 \times 10^6$  КУО/г при температурі інкубації 43 °С при рН 4,55 має напругу зсуву ферментованого молока, що перевершує 25 Па, що призводить до більш густої консистенції продукту і нівелює необхідність додавання спеціальних згущувачів, що значно підвищує рентабельність виробництва йогурту.

Тому для одержання заквашуваної сухої культури для виробництва йогуртів обрано штам *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 15466.

Для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 15466 використовується середовище MRS наступного складу, г/л [6]:

- бактопротеозопептон – 10;
- бактомясний екстракт – 10;
- бактодріжджовий екстракт – 5;
- декстроза – 20;
- сорбітанмоноолеат – 1;

цитрат амонію – 2;  
ацетат натрію – 5;  
сульфат магнію – 0,1;  
сульфат марганцю – 0,05;  
гідроортофосфат калію – 2.  
рН 6,5

## **2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого – біохімічні ознаки *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus***

*Морфолого-біохімічні ознаки Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

За морфологічними ознаками клітини *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* є неспороутворюючі, грампозитивні, нерухомі. Мають форму паличок із заокругленими кінцями, довжина яких варіює від 2 до 9 мкм, товщина – 0,8 мкм. Розміщення клітин поодинарне, розмножуюються поділом перегородкою (рис. 2.1.) [3,5].

На щільних поживних середовищах *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* утворюють колонії, в основному невеликого розміру, діаметром 2-5 мм, з рівним краєм, випуклі, плоскі, блискучі, непрозорі, білого або світло сірого кольору з темнішим центром (рис. 2.2). Оскільки для росту необхідні збагачені вітамінами та факторами росту поживні середовища, то на стандартних середовищах типу МПА не ростуть [3,5].

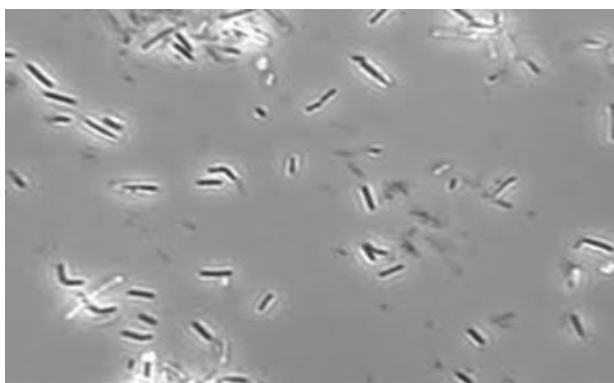


Рис. 2.1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* під світловим мікроскопом



Рис. 2.2. Колонії *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* на щільному поживному середовищі MRS.

*Фізіолого-біохімічні ознаки Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Оптимальними фізичними та фізико-хімічними умовами росту для *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* є: температура  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; мікроаерофільні умови, рН 6,5, але можливий ріст навіть при рН < 4,0 [3].

Мікроорганізм є хемогетеретрофом – використовує вуглеводи як джерело вуглецю та енергії. Енергію отримують в результаті гомоферментативного молочнокислого бродіння. Для росту на поживних середовищах потрібні фактори росту і вітаміни [3].

Як субстрат для молочнокислого бродіння *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* використовує такі цукри як глюкоза, целобіоза, галактоза, лактоза, мальтоза, саліцин, сахароза, і трегалоза та інші, тому мешкає в середовищах з високим вмістом цукру, таких як шлунково-кишковий тракт людини і тварин. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, знижуючи рН середовища, зберігає в кишечнику таке середовище, в якому інгібуються життєдіяльність сторонніх мікроорганізмів чим і проявляються пробіотичні властивості [6, 10].

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* містять набір протеаз, які беруть участь в дозріванні деяких сортів сирів. Специфічна пептидаза *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – пролідаза гідролізує білки з високим вмістом

проліну. Також мікроорганізм синтезує пептидоглікангідролазу – специфічний фермент, який відповідає за гідроліз пептидоглікану, важливого компонента клітинної стінки бактерій [20, 21].

*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* продукує позаклітинні полісахариди, що покращують структуру, підвищують стабільність і запобігають синерезису йогурту [5, 22].

Бактерія проявляє імуностимулюючу дію і здатна виживати при проходженні через шлунково-кишковий тракт, тому й використовується для отримання пробіотичних препаратів для людини або сільськогосподарських тварин [14, 23, 24].

Ще однією з особливостей молочнокислих бактерій є потреба в додаткових факторах росту. Для росту потрібен ряд вітамінів, амінокислот, а також пуринів і піримідинів. Вирощують молочнокислі бактерії в основному на складних середовищах, що містять високі концентрації дріжджового автолізу, томатного соку, молочної сироватки і навіть крові. Отже, молочнокислі бактерії є своєрідними «метаболічними інвалідами», які, очевидно, в силу своєї спеціалізації (ріст на молоці) втратили здатність до синтезу багатьох метаболітів. З іншого боку, їм притаманна здатність, якої немає в інших мікроорганізмів: вони можуть використовувати молочний цукор (лактозу). Тобто *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* є ауксотрофними мікроорганізмами [20].

На клітинну стінку молочнокислих бактерій впливають такі антибіотики як лізоцим, пеніцилін, в наслідок дії яких утворюються протопласти. Також, як і усі прокаріоти, ці бактерії є чутливими до стрептоміцину та неоміцину, які гальмують процес зв'язування амінокислот, до еритроміцину, який порушує функцію субодиниці 50S, до левоміцетину, який пригнічує включення амінокислот у білки, до актиноміцину, який порушує синтез РНК, до мітоміцину С, який перешкоджає синтезу ДНК [25].

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агенту

Згідно першого видання Бергі таксономічний статус *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* займає таке положення [18]:

- Домен: Бактерії
- Відділ – *Firmicutes*
- Клас – *Firmibacteria*
- Родина – *Lactobacillaceae*
- Рід – *Lactobacillus*
- Вид – *delbrueckii*
- Підвид – *bulgaricus*

За філогенетичною класифікацією *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* відносяться до групи грампозитивних бактерій, підгрупи *Clostridium* (низький вміст ГЦ у ДНК) [19].

### 2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Процес біосинтезу біомаси лактобактерій складається з таких етапів: синтез білків; синтез нуклеїнових кислот; синтез полісахаридів; синтез ліпідів.

Глюкоза за гліколітичним шляхом перетворюється на піруват, який за допомогою піруватдегідрогенази утворює ацетил-КоА. Ацетил-КоА йде в цикл трикарбонових кислот та на синтез ліпідів. В ЦТК з ізоцитрату під дією ізоцитратдегідрогенази утворюється 2-оксоглутарат, який є попередником чотирьох амінокислот: глутамату, глутаміну, аргініну та проліну. Під дією малатдегідрогенази з малату утворюється оксалоацетат, який є попередником таких амінокислот, як аспартат, лізин, метіонін, треонін та ізолейцин. Піруват є попередником амінокислот піруватної родини: аланіну, валіну, лейцину та серину.

Складнішим є синтез ароматичних амінокислот. Еритрозо-4-фосфат та фосфоенолпіруват конденсуються з утворенням C7 – сполуки, яка в подальшому циклізується. Загальним попередником біосинтезу

ароматичних амінокислот є хоризмат, з якого утворюються фенілаланін, триптофан та тирозин. Попередником гістидину є 5-фосфорибозилпірофосфат, який утворюється з рибозо-5-фосфату, що надходить з пентозофосфатного циклу.

Попередником синтезу фосфоліпідів є діацил-3-фосфогліцерин, який утворюється внаслідок двох послідовних приєднань ацильної частини від ацил-АПБ до спиртової групи 3-фосфогліцерину. Діацил-3-фосфогліцерин активується за участю ЦТФ під дією фосфатидцитиділтрансферази з утворенням ЦДФ-діацилгліцерину, який за участі серину та фосфатидилсеринсинтази утворює фосфатидилсерин.

Попередником жирних кислот є ацетил-КоА. Першою реакцією у синтезі жирних кислот є утворення ацетил-АПБ з ацетил-КоА та АПБ. Далі під дією 3-кетоацил-АПБ-синтетази ацетил-АПБ утворює ацетоацетил-АПБ, який за участі 3-кетоацил-АПБ-редуктази перетворюється на  $\beta$ -гідроксибутирил.  $\beta$ -гідроксибутирил під дією  $\beta$ -гідроксиацил-АПБ-дегідратази утворює кротоніл-АПБ, який за участі НАДФН та еноіл-АПБ-редуктази перетворюється на бутирил-АПБ. Точкою розгалуження синтезу насичених та ненасичених жирних кислот є  $\beta$ -гідроксидеканоіл-АПБ (C10-АПБ).

Попередником піримідинових нуклеотидів є карбомоїлфосфат та аспартат, який утворюється з оксалоацетату. Карбомоїлфосфат утворюється з CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> і двох молекул АТФ за участю ферменту карбомоїлфосфатсинтетази. Конденсація карбомоїлфосфату з аспартатом дає карбомоїласпартат, який перетворюється на перший проміжний продукт із піримідиновим кільцем, оротат. Реакція оротату з 5-фосфорибозилпірофосфатом, що утворився в пентозофосфатному циклі, дає оротидинмонофосфат (ОМФ), який далі декарбоксилюється в уридинмонофосфат (УМФ).

Синтез пуринових нуклеотидів є складнішим. З 5-фосфорибозилпірофосфату, що утворився в пентозофосфатному циклі,

утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотида, надходять із бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (ІМФ), який в наступних реакціях утворює АТФ і ГТФ. Попередниками пептидоглікану, який входить до клітинної стінки біфідобактерій, є УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін, які синтезуються з глюкозамін-6-фосфату. Фосфатна група з положення 6 переноситься у положення 1 з утворенням глюкозамін-1-фосфату, який далі за участі ацетил-КоА та ацетилтрансферази, дає N-ацетилглюкозамін-1-фосфат, який зв'язується з УДФ. На останньому етапі УДФ-N-ацетилглюкозамін реагує з ФЕП з утворенням УДФ-N-ацетилмурамової кислоти [30].

Ферменти: 1 – інвертаза (КФ. 5.3.1.9); 2 – фруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 3 – фосфотриозальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 4 – гліцеральдегідкіназа (КФ. 1.2.1.12); 5 – гексокіназа (КФ.4.2.1.11); 6 – глюкозофосфатізомераза (КФ.1.3.5.1); 7 – фосфотриозкіназа (КФ. 1.2.1.12); 8 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ.1.2.4.1); 9 – триозофосфатізомераза (КФ.2.3.3.1); 10 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.4.2.1.3); 11 – фосфогліцераткіназа (КФ.1.1.1.42); 12 – фосфогліцератфосфомутаза (КФ. 1.2.4.2); 13 – енолаза (КФ.6.2.1.5); 14 – піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40); 15 – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (КФ.4.2.1.2.); 16 – глюконат-6-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.1.1.37.); 17 – транскетолаза (КФ.2.3.3.1); 18 – глюкозофосфатізомераза (КФ.4.1.1.64.); 19 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ. 2.7.11.4.); 20 – піруваткарбоксилаза (КФ.3.5.1.25.); 21 – піруватдегідрогеназа (КФ. 2.7.7.23.); 22 – цитратсинтаза (КФ. 5.1.3.2.); 23 – аконітаза (КФ.2.7.2.3.); 24 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ. 2.3.1.38.); 25 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ. 2.3.3.1.); 26 – сукцинаттіюкіназа (КФ. 1.1.1.100.); 27 – сукцинатдегідрогеназа (КФ.4.2.1.59.); 28 – фумараза (КФ. 2.7.7.9.); 29 – малатдегідрогеназа (КФ.

4.3.2.2.); 30 – ацетилтрансацелаза (КФ.2.7.1.69.); 31 – 3-кетоацил-АПБ-синтетаза (КФ.2.3.3.1.).

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Болгарська паличка (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) вперше була виявлена у 1905 році болгарським мікробіологом Стаменом Григоровим в традиційному кисломолочному продукті – болгарському йогурті. Для одержання кисломолочних продуктів з лікувально-профілактичними властивостями до складу заквасок вводять болгарську паличку, що утворює антибіотичні речовини [33, 34].

Закваски на основі штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* використовуються для виготовлення таких кисломолочних продуктів як болгарський, турецький і грецький йогурти, кефір, кумис [36].

Загальний обсяг виробництва молока в Україні знаходиться в межах 11-11,5 млн. тон. За підсумком. 2019 року відзначається подальше зростання даного показника на 1% за рахунок поліпшення утримання корів в с/г підприємствах [34].

За даними Державної служби статистики України станом на кінець 2014 року в Україні вироблено 269,36 тис. тон кисломолочних продуктів (з яких тільки 76,5 тис. тон – йогурти) [34].

Враховуючи, що закваску *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* використовують для виготовлення здебільшого йогурту, тоді будемо враховувати саме ці продукти як основу для розрахунку потужності виробництва [35, 36].

Як відомо, для виробництва йогурту, є необхідним вносити суміш заквашуваних мікроорганізмів у кількості, що складає – 1 мл закваски ( $10^7$  КУО/мл) на 1 л молока. На йогурти по всій Україні йде 76 500 000 л молока.

					НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Філіпенко А.А.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Волошина І.М.						
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Розрахуємо необхідну кількість культуральної рідини для заквашуваного матеріалу:

в 1 мл (0,01 л) культуральної рідини –  $10^7$  КУО.

Для забезпечення всієї України нам потрібно:

0,01 л закваски – 1 л молока

x л закваски – 76 500 000 л молока

$x = 76\,500\,000 * 0,01 / 1 = 76\,500$  л закваски

Для забезпечення потреби у заквасці для йогурту для всієї України необхідно 76 500 л культуральної рідини закваски.

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва**

Серед вітчизняних виробників бактеріальних заквасок для молочної промисловості варто виділити Державне дослідне підприємство Інституту продовольчих ресурсів Національної академії аграрних наук України. Також закваски виробляють Державне дослідне підприємство бактеріальних заквасок "Альба-ТІММ", також відомо, що власне виробництво заквасок має компанія «Яготинський маслозавод»[35, 37, 38].

Є інші виробники, які пропонують свою продукцію в якості пробіотичних препаратів. В Україні ацидофільні пробіотики виробляють два підприємства: ТОВ фірма «О.Д. Пролісок» (Симбітер ацидофільний), с. Вільшанка, Київська обл. та ООО «Астрафарм» (Біфацил), м. Вишневе, Київська обл. Імпортуються наступні лактовоїсні пробіотики: Ацидолак (Енестія Бельгіум НВ/Буделпак Хамонт Н.В./С.А., Бельгія/Данія), Ентерожерміна (ДОППЕЛЬ Фармасьютікалс С.Р.Л., Італія), Ентерол-250 (Біокодекс, Франція), ЙОГУРТ ("Pharmascience Inc.", Канада), Лактовіт-ФОРТЕ (Мепро Фармасьютікалз Пвт. ЛтД./Юнімакс Лабораторіес, Індія), Мутафлор (Ардейфарм ГмбХ, Німеччина), Нормагут (Ардейфарм ГмбХ, Німеччина), Пробілак (Юніфарм, Інк., США), Пробіовіт (Дженом Біотек Пвт. Лтд., Індія), Хілак ("Merckle GmbH"/"ratiopharm International GmbH", Німеччина) [38].

Оскільки росту споживання йогуртів не очікується, і в країні велика кількість імпортих заквасок, тому метою є забезпечення ринку заквасок України на 10 %. Тоді річна потужність буде становити:

76 500 л закваски – 100 %

x л закваски – 5 %

$$x = 76\,500\,000 \cdot 5 / 100 = 3\,825 \text{ л/рік}$$

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

Річна кількість культуральної рідини – 3 325 л. Час циклу роботи ферментера при культивуванні *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* становить 30 години.

1 цикл (2 дня) – 35 л

x циклів – 3 325 л

$$x = 95 \text{ циклів (190 діб)}$$

Враховуючи відносно невелику кількість культуральної рідини, виробництво буде проводитися протягом 190 днів. Розрахуємо скільки культуральної рідини отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів  $T_{рд} = 190$ , тоді кількість продукту на добу ( $V_d$ ) становитиме:

$$V_d = V_{гп} / T_{рд} = 3\,325 \text{ л} / 190 = 17,5 \text{ л/добу культуральної рідини.}$$

Кількість культуральної рідини за цикл ( $V_{цк}$ ) буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 17,5 \times 42) / 24 = 33,6 \text{ л/цикл.}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (20 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). Підготовка ферментатора включає в себе такі етапи: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1,5 год), стерилізація (2 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (0,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (0,5 год), ліофільне висушування (35

год ). Загальна кількість часу на виробничий цикл становить 62 год. Оскільки цикл ферментація та ліофільне висушування може відбуватись паралельно, то сумарний час на отримання готового продукту складатиме 42 години (62-20 год) або 2 доби.

$K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

Геометричний об'єм ферментера становитиме:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 35 / 0,7 = 50 \text{ л}$$

де  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення ферментера,  $K_{\text{зап}} = 0,7$ .

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{\phi} = 50$  л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\phi} = 35/50 = 0,7$ , що не перевищує максимально можливого значення (0,75).

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування для накопичення біомаси культури *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* здійснюють в 20 л ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7. Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{роб}} = 20 \times 0,7 = 14 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 14 л культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 14 \times 0,1 = 1,4 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати при культивуванні в колбах в термостаті.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* у 20 л ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у два етапи.

## РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Оскільки середовище MRS випускається готовим у сухому вигляді, то доцільно буде використати вже придбане готове поживне середовище, для того, щоб не здійснювати його підготовку самостійно на підприємстві, адже об'єми виробництва є дуже невеликі (робочий об'єм виробничого ферментера становить 35 л) і для одержання однієї партії культуральної рідини необхідно лише 1750 г поживного середовища.

Режим підготовки поживного середовища - розвести 50 г середовища в 1 л очищеної води. Режим стерилізації  $t = 112^{\circ}\text{C}$ ,  $T = 30$  хв [17].

#### 4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оптимумом росту для *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* є наступні умови: температура  $37^{\circ}\text{C}$  та рН 5,5-6,0. Саме такі умови є сприятливими для розвитку інших анаеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів, тому культивування *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* необхідно проводити в строго асептичних умовах, для запобігання розвитку контамінації. Тому потрібно проводити стерилізацію ферментаційного обладнання, поживного середовища та усіх інших речовин, які вносяться у інокулятори та ферментер, також в процесі підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування має відбуватися постійна перевірка культури на мікробіологічну чистоту [39].

					НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрцшів
Розроб.		Філіпенко А.А.						
Перевір.		Волошина І.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ			

Оскільки по відношенню до кисню *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* є факультативним анаеробом, тому культивування слід проводити в анаеробних умовах, перемішування культуральної рідини проводять періодичне та неінтенсивне лише для рівномірного розподілу клітин мікроорганізму та поживних речовин у всьому об'ємі культуральної рідини.

Оскільки *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* виділяє в поживне середовище молочну кислоту, що призводить до значного зниження рН і відповідно за таких умов ріст даного мікроорганізму припиняється, то в процесі культивування необхідно підтримувати рівень рН в межах 6,8-7,0. цього можна досягти через періодичне додавання до культуральної рідини розчину лугу [39].

Для підготовки посівного матеріалу обираємо інокулятор об'ємом 5 л:

Лабораторний ферментер BIOSTAT® В plus, що автоклавується, має робочий об'єм від 0,5 до 10 л і призначений для культивування мікроорганізмів та клітинних культур. Створюючи цей ферментер, розробники прагнули аби він став світовим стандартом серед настільних ферментерів і біореакторів нового покоління. Змінні місткості для мікробних клітинних культур готові до застосування «прямо з упакування». Ферментер є вдосконаленою модифікацією Biostat B-DCU (рис. 4.1) [32].



Рис. 4.1. Лабораторний ферментер BIOSTAT® В plus [32]

Одиночна або подвійна установка має такі додаткові опції: – вбудовану систему подачі газу з можливістю збагачення живильного середовища киснем для оптимального ведення процесу як для мікробних, так і клітинних культур; – для клітинних культур подання газу здійснюється через напівпроникну мембрану; – вбудований термостат або система «сухого» обігрівання системи (опції) для вимірювання оптичної густини середовища (турбодиметрії) і системи вимірювання Redox – потенціалу для «безпухирцевої» щадної аерації культури [32].

Щоб задовольнити річну потребу, необхідно використовувати ферментер об'ємом 50 л. Для цього, ми можемо використовувати ферментер, який призначений для культивування мікроорганізмів глибинним способом, а саме ферментер марки BIOSTAT® D DCU [31].

BIOSTAT® D DCU, розроблений з урахуванням сучасних технологій і напрямів дизайну включає в себе всі необхідні компоненти для надійної і зручної роботи з мікроорганізмами або культурами клітин [31].

Модуль постачання – характеризується відкритою конструкцією з системою термо устаткування, газовими входами і виходами [31].

Стандартизованість, повністю завершена система SIP. Контрольна башта дозволяє отримати одиночну або здвоєну конфігурацію, забезпечена контрольною системою DCU, сенсорною панеллю і вбудованою системою подачі газу [31].

Ферментатор має плоску верхню кришку, нижню систему перемішування, різні бічні і верхні порти, порт для пробо відбору типу Sanitary TC [31].

Особливості апарату:

- Поодинокі або здвоєні конфігурації.
- Вбудований набір підсилювачів. Вбудований модуль дозування газів: Airflow (Культивування мікроорганізмів), O<sub>2</sub>-Enrichment (Культивування мікроорганізмів), Gas Flow Ratio Control (Культивування мікроорганізмів), Advanced Additive Flow (Для культур клітин).

- Контролер приводу мішалки.
- До 6 вбудованих перистальтичних насосів на посудину.
- Потрійна система зважування для мішків до 5 л (Flexboy®) або скляних бутлів на 2 л встановлена безпосередньо на контрольну вежу, має 3 вбудованих тензометричних датчика з максимальним навантаженням 6 кг і дискретністю 0,1 м.
- Відкрита конструкція, змонтована на рамі, включає вхідну і випускні газові лінії.
- Температура стерилізації до 130 °С. 19 "кольоровий сенсорний дисплей.
- Швидке перемикання між вікнами процесів в подвійних системах.
- Детальний огляд кожного судини. Індикація статусу контролера.
- Програмне забезпечення BioPAT® MFCS / win.
- Ставлення розмірів H: D (загальне): 2: 1 або 3: 1.
- Поздовжнє наглядове вікно.
- Матеріал, що контактує з продуктом - нержавіюча сталь AISI 316L, EPDM, боросилікатне скло; зовнішній - нержавіюча сталь AISI 304.
- Пневматичний пристрій підйому кришки - доступно для обсягів 30 - 200 л.
- 6-ти лопатева дискова мішалка або 3-х лопатева сегментна [31].



Рис. 4.2. Ферментер фірми BIOSTAT® D DCU [31].

В даній роботі будемо використовувати ферментатор BIOSTAT® D DCU, що повністю задовольняє наші вимоги.

#### **4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря**

Оскільки *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* є аеротелорентними по відношенню до кисню, тому культивування слід проводити в анаеробних умовах.

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

Використання дезінфікуючого засобу є швидким та ефективним способом очищення та знезараження поверхні від мікроорганізмів, накопичення яких може призвести до зараження продукту.

Ефективні дезінфікуючі засоби мають володіти малою токсичністю, широким спектром антимікробної активності, зручністю у застосуванні, багатофункціональністю і тривалим терміном зберігання концентратів і робочих розчинів. Проте слід зазначити, що тривале використання дезінфікуючого засобу призводить до стійких форм мікроорганізмів, тому для кращого результату необхідно змінювати дезінфікуючий засіб кожні 10 – 14 днів або використовувати декілька типів.

У таблиці 4.1. наведено ряд засобів для дезінфекції обладнання та приміщення, які є концентратами, це «Хлорантоін», «Дезактив-М», «Дезекон», «Максисан», «Діацил Максі», «Гембар», «Полідез».

Згідно таблиці 4.1. однакові діючі речовини але з різним відсотковим числом мають «Дезекон» та «Максисан», «Дезактив-М» та «Полідез». Тому використання цих засобів по черзі є неможливим, оскільки є ризик появи резистентних мікроорганізмів та контамінації продукту. Виходячи з економічної точки зору, ми можемо вибрати «Дезекон», оскільки вартість даного засобу за 1 л є нижчою в порівнянні з засобом «Максисан», «Дезактив-М» та «Полідез».

У якості другого дезінфікуючого засобу згідно таблиці 4.1. вибираємо з «Хлорантоїну», «Діацил Максї» та «Гембару». Припустимо, що на 1 м<sup>2</sup> затрачається 100 мл засобу. Концентрація робочого розчину «Гембар» становить 0,5%, а «Хлорантоїну» 0,2% відповідно, але використання даних засобів не є екомічним. Тому оптимальним варіантом є використання засобу «Діацил Максї» згідно таблиці 4.1.

Отже, у даному дипломному проєкті для дезінфекції приміщення (стіни, підлога, двері, вікна) та обладнання, інвентарю обираємо такі дезінфікуючі засоби, як «Дезекон» та «Діацил Максї», адже вони мають найменшу концентрацію робочого розчину та є економічно вигідними.

Для миття обладнання від залишків поживного середовища та інших речовин використовують каустичну або кальциновану соду.

Каустична сода (їдкий натрій) представляє собою їдку корозійну активну речовину, добре очищає від жиру та масляних речовин, органічних залишків. Проте є шкідливою для людини, відноситься до 2-го класу небезпеки за ГОСТ 12.1.007. Тому, враховуючи фізико-хімічні властивості, ми не можемо використовувати дану речовину, оскільки після миття ферментеру можуть залишитись частинки засобу всередині, що є небезпечним для пробіотика.

Кальцинована сода є більш безпечною для використання, відноситься до 3-го класу небезпеки - помірна небезпечна речовина за ГОСТ 12.1.007. Отже, враховуючи фізико-хімічні властивості обох речовин, а також їхню вартість (табл. 4.1.), обираємо у якості миючого засобу для ферментаційного обладнання кальциновану соду.

## Порівняльна характеристика дезінфікуючих та миючих засобів, дозволених для використання МОЗ України

№	Назва засобу	Вміст діючих речовин	Показання для застосування	Концентрація робочого розчину, %	Ціна, грн./л або грн./кг
1	Хлорантоїн	1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн-дихлорантин 21,5 – 23,5%	Дезінфекція приміщень та обладнання працівників фармацевтичної, біотехнологічної промисловості	0,2	196
2	Дезактив-М	Алкілдиметилетилбензиламоній хлорид 4,5 – 5,5%	Дезінфекція виробничих приміщень та обладнання фармацевтичної та біотехнологічної промисловості	0,2	150
3	Дезекон	Суміш четвертинно амонієвих сполук 5,5%	Дезінфекція приміщень та обладнання у фармацевтичній, біотехнологічній промисловості	0,2	135
4	Максисан	Суміш четвертинно амонієвих сполук 50%	Дезінфекція приміщень та обладнання для фармацевтичного та біотехнологічного виробництва	0,25	495
5	Діацил Максі	Дідецилдиметиламонію хлорид 6,75%	Дезінфекція приміщень та обладнання для фармацевтичного виробництва	0,25	126
6	Гембар	Гуанідинова полімерна сполука 25%	Дезінфекція приміщень та обладнання промислових підприємств фармацевтичної, біотехнологічної галузі	0,5	150
7	Полідез	Перекис водню 5-15%; алкілдиметилбензиламоній хлорид 5-18; пар	Дезінфекція приміщень та обладнання промислових підприємств фармацевтичної, біотехнологічної галузі	0,5	140
8	Кальцинована сода	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Миття обладнання	0,5	6
9	Каустична сода	$\text{NaOH}$	Миття обладнання	0,5	17

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

Поживне середовище має компоненти, які потрібно стерилізувати за різних режимів стерилізації. Тому для підготовки посівного матеріалу I та II генерації ми поживне середовище наступного складу розбиваємо на 3 композиції:

<b>Компонент поживного середовища, кг (л)</b>	<b>Вміст, г/л</b>
Молочна сироватка	170
Знежирене молоко	10
Екстракт висівок	10
Картопляний екстракт	10
Натрій оцтовокислий	0,765
Марганець сірчаноокислий	0,17

Композиція А: молочна сироватка та знежирене молоко стерилізують за температури 105 °С, тиску 0,05 МПа протягом 15-20 хв.

Композиція Б: екстракт висівок та картопляний екстракт стерилізують за температури 112 °С, тиску 0,05 МПа протягом 40 хв.

Композиція В: натрій оцтовокислий марганець сірчаноокислий стерилізують за температури 131 °С, тиску 0,15 МПа протягом 40 хв.

Вважаючи, що об'єм нашого апарату 50 л, то ми будемо основну частину поживного середовища (композиція А) стерилізувати у попередньо очищеному і простерилізованому ферментаторі. Всі інші композиції Б та В стерилізувати в колбах в автоклаві і вносити в ферментатор.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Апаратурна схема виконана на листку формату А1 та відповідає процесам, зображеним на технологічній схемі із зазначенням точок контролю процесу.

*Таблиця 5.1.*

### Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Виробник, марка	Технічна характеристика
1	2	3	4	5
Ін-1	Інокулятор	1	BIOSTAT® B plus	Вбудована система подачі газу з можливістю збагачення живильного середовища киснем для оптимального ведення процесу як для мікробних, так і клітинних культур; – для клітинних культур подання газу здійснюється через напівпроникну мембрану; – вбудований термостат або система «сухого» обігрівання системи (опції) для вимірювання оптичної густини середовища (турбодиметрії) і системи вимірювання Redox – потенціалу для «безпухирцевої» щадної аерації культури Інокулятор оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 5 л

					НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>		Літ.	Арк.	Акрцшів	
Розроб.	Філіпенко А.А.								35	
Перевір.	Волошина І.М.						Кафедра БТМ			
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.	Пирог Т.П.									

1	2	3	4	5
Фм-2	Виробничий ферментер	1	Ферментер фірми BIOSTAT® D DCU	<p>Матеріал, що контактує з продуктом - нержавіюча сталь AISI 316L, EPDM, боросилікатне скло;</p> <p>зовнішній - нержавіюча сталь AISI 304. Ферментер оснащений паровою сорочкою, перемішуючим пристроєм.</p> <p>Контролер приводу мішалки.</p> <p>Температура стерилізації до 130 °С. 19 "кольоровий сенсорний дисплей.</p> <p>Програмне забезпечення BioPAT® MFCS / win. Об'єм 50 л.</p>

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу включає в себе допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та культивування).

Креслення технологічної схеми (дод. 2) зроблене на аркуші формату А1, де зображені допоміжні роботи та технологічний процес.

Технологічну схему біосинтезу наведено у графічній частині дипломної роботи.

### ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва включає в себе підготовку виробничих приміщень, персоналу і технологічного устаткування.

#### ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка виробничого персоналу здійснюється відповідно до вимог підприємства. Особи, що приходять на роботу, піддаються медичному обстеженню. Проводяться інструктажі. Персонал, що працює з отруйними, сильнодіючими речовинами і мікроорганізмами проходить спеціальне навчання. Робітники, які не пройшли навчання не мають доступу до роботи.

Персонал повинен бути забезпечений спецодягом та засобами індивідуального захисту. Даний етап включає в себе зміну одягу на технологічний та обробку рук дезінфікуючим розчином етанолу. Під технологічним одягом мається на увазі одяг із безворсової тканини, призначений для захисту матеріалів, напівпродуктів та готового продукту від вторинної контамінації мікроорганізмами та механічними частинками, які виділяє персонал.

					НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата					
Розроб.		Філіпенко А.А.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Волошина І.М.							37
Реценз.							Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

### **ДР 1.1.1 Навчання та інструктаж персоналу**

Підприємство забезпечує навчання персоналу, службові обов'язки, ознайомлення з новим обладнанням та технологіями.

Навчання персоналу забезпечує саме підприємство. На підприємстві існують такі види навчань:

1. Основне навчання: проводиться один раз на рік; персонал ознайомлюється з теорією і практикою;

2. Вхідне навчання: проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду приходить новий робітник;

Подальше навчання: здійснюється систематично.

### **ДР 1.1.2. Перевірка знань персоналу**

Навчання персоналу проходить систематично з подальшим оцінюванням практичної ефективності проведення навчання.

## **ДР. 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів**

### **ДР. 1.2.1. Приготування розчину Жавель-Клейд**

Для приготування 0,014% розчину Жавель-Клейд на 1 виробничу зміну, з урахуванням генерального прибирання, 4 таблетки розчиняють на 34 л води (1 таблетка на 10 л). Розчин готується на 40 л, в який через вентиль подається холодна водопровідна вода (20-25 °С).

### **ДР. 1.2.2. Приготування розчину Гембар**

Для приготування 0,5% розчину запасного дезінфікуючого засобу на 1 виробничу зміну, з урахуванням генерального прибирання, 200 мл концентрату розчиняють у 34 л води. Розчин готують на 40 л, в який через вентиль подається холодна водопровідна вода (20-25 °С).

### **ДР 1.2.3. Приготування розчину Біомой**

Для приготування 0,3% розчину Біомой, який обрано в якості миючого засобу для ферментаційного обладнання та реакторів, подають 34 л концентрату в СІР-мийку та настроюють концентрацію на сенсорі СІР-станції – 0,5%.

### **ДР 1.3 Підготовка приміщень**

#### **ДР 1.3.1. Генеральне прибирання**

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовується розчин Жавель-Клейд 0,014%. Прибирання здійснюється один раз на місяць. Розчином обробляють поверхні лабораторних приміщень: стіни, підлогу, вікна та двері. Стіни, двері і інші поверхні протирають поролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючим розчином, потім цим же розчином миють підлогу.

Після закінчення прибирання є обов'язковим мікробіологічний контроль.

#### **ДР 1.3.2. Щоденне прибирання приміщень**

Здійснюється 1 раз на зміну і включає в себе миття підлоги. Прибирання відбувається у гумовому взутті, гумових рукавичках і фартуху.

При вологому прибиранні приміщень використовують розчин Жавель-Клейд. Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

### **ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій**

#### **ДР 1.4.1. Миття**

Миття обладнання здійснюється водопровідною водою із використанням миючого засобу Біомой. Миття відбувається за температури 50-60 °С протягом 20–30 хв із застосуванням СІР-мийки. Відпрацьований розчин подається на знешкодження відходів.

#### **ДР 1.4.2. Технічний огляд**

Проводять для виявлення нещільності в комунікаціях та запірній арматурі на обладнаннях. У разі їх знаходження проводять підтягнення різьбових з'єднань.

### **ДР 1.4.3. Ополіскування**

Зовнішні частини обладнання обробляють дезінфікуючим розчином Жавель-Клейд 0,014%. Після миття ферментер ополіскують водопровідною водою при температурі 30-40 °С упродовж 10 хв. Відпрацьований розчин зливається і направляється на стадію знешкодження відходів.

### **ДР 1.4.4. Перевірка на герметичність**

Перевірка на герметичність ферментера проводиться за допомогою стисненого повітря. Перед набором тиску в апарат вносять (поміщають) невелику кількість легкої галогенвмісної речовини, зазвичай чотирихлористий карбон (ССЦ), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С. збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через нещільності і виявляються у разі наближення щупа течією пошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату цим методом становить 1,5-2 год.

### **ДР 1.4.5. Стерилізація**

Після перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у сорочку подають глуху пару, а у ферментер подають гостру пару за температури 130 °С і стерилізують упродовж години.

При закінченні стерилізації зупиняють подачу гострої пари  $P = 0,28$  МПа, ставлять всі вузли під паровий захист та знижують тиск. Під час зниження тиску проводять охолодження до температури 40.

## **ДР 2. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів**

### **ДР 2.1. Приготування 20% розчину $\text{NH}_4\text{OH}$**

Для періодичної нейтралізації до рН 5,5, виробничого біосинтезу та підготовки інокуляту в посівних апаратах і колбах використовують 20% розчин  $\text{NH}_4\text{OH}$  (у розрахунку 1 мл розчину на 1 л середовища). Потрібно приготувати

2400 мл 20% розчину. Для цього в 2400 мл води вносять 480 г гідроксиду амонію. Розчин готують в ємностях на 5 л.

### **ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища**

#### **ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах**

Необхідно приготувати 600 мл поживного середовища, склад компонентів наведено у табл 6.1.

*Таблиця 6.1.*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл середовища**

<b>Компонент поживного середовища, кг (л)</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 600 мл середовища, г (мл)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм колби, V, мл</b>
Молочна сироватка	170	102	<b>А</b>	<b>1000</b>
Знежирене молоко	10	6		
<b>Вода</b>		<b>300</b>		
Екстракт висівок	10	6	<b>Б</b>	<b>500</b>
Картопляний екстракт	10	6		
<b>Вода</b>		<b>200</b>		
Натрій оцтовокислий	0,765	0,46	<b>В</b>	<b>200</b>
Марганець сірчаноокислий	0,17	0,102		
<b>Вода</b>		<b>100</b>		
<b>Всього</b>		<b>600</b>		

#### **ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А**

На електронних вагах зважують 102 г молочної сироватки, 6 мл знежиреного молока, наважку вносять у ємність об'ємом 1 л, додають 300 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 105 °С, тиску 0,05 МПа протягом 15-20 хв.

### **ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б**

На електронних вагах зважують 6 г екстракту висівок, 6 г екстракту картопляного. Наважку вносять у колбу об'ємом 500 мл, додають 200 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 40 хв.

### **ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В**

На електронних вагах зважують 0,46 г натрію оцтовокислого, 0,102 г марганцю сірчаноокислого. Наважку вносять у колбу об'ємом 200 мл, додають 100 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

### **ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі**

Необхідно приготувати 3,5 л посівного матеріалу (600 мл з попередньої ферментації та і 2,1 л нового поживного середовища) склад компонентів наведено у табл. 6.2

*Таблиця 6.2.*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,1 л середовища**

<b>Компонент поживного середовища, кг (л)</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 2,1 л середовища, г (мл)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм колби, V, мл</b>
1	2	3	4	5
Молочна сироватка	170	357	А	5000
Знежирене молоко	10	21		
<b>Вода</b>		<b>2122</b>		
Екстракт висівок	10	21	Б	500
Картопляний екстракт	10	21		
<b>Вода</b>		<b>158</b>		

1	2	3	4	5
Натрій оцтовокислий	0,765	1,6	<b>В</b>	<b>500</b>
Марганець сірчаноокислий	0,17	0,36		
<b>Вода</b>		<b>198</b>		
<b>Всього</b>		<b>2900</b>		

### **ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А**

На електронних вагах зважують 357 г молочної сироватки, 21 мл знежиреного молока, наважку вносять у ємність об'ємом 5 л, добавляють 1122 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 105 °С, тиску 0,05 МПа протягом 15-20 хв.

### **ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б**

На електронних вагах зважують 21 г екстракту висівок, 21 г екстракту картопляного. Наважку вносять у колбу об'ємом ємність об'ємом 500 мл, добавляють 158 мл питної води, перемішують. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 40 хв.

### **ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В**

На електронних вагах зважують 1,6 г натрію оцтовокислого, 0,36 г марганцю сірчаноокислого. Наважку вносять у колбу об'ємом 500 мл, добавляють 198 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

### **ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментаторі**

Необхідно приготувати 31,5 л поживного середовища, склад компонентів наведено у табл. 6.3.

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 35 л середовища

Компонент поживного середовища, кг (л)	Вміст, г/л	Кількість для приготування 31,5 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
1	2	3	4	5
Молочна сироватка	170	5,36	А	50 (ферментатор)
Знежирене молоко	10	0,315		
<b>Вода</b>		<b>22,3</b>		
Екстракт висівок	10	0,315	Б	5 (колба)
Картопляний екстракт	10	0,315		
<b>Вода</b>		<b>1,87</b>		
Натрій оцтовокислий	0,765	0,024	В	2 (колба)
Марганець сірчаноокислий	0,17	0,0054		
<b>Вода</b>		<b>0,97</b>		
<b>Всього</b>		<b>31,5</b>		

**ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А**

Через об'ємне-ваговий дозатор у ферментатор об'ємом 50 л подають 5,36 кг молочної сироватки, 0,315 л знежиреного молока, доливають 14,3 л питної води і перемішують. Приготовлений розчин стерилізують при температурі 105 °С, тиску 0,05 МПа протягом 15-20 хв і охолоджують

**ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б**

На електронних вагах зважують 0,315 кг екстракту висівок, 0,315 кг екстракту картопляного. Наважку вносять у колбу об'ємом ємність об'ємом 5 л, добавляють 1,87 л питної води, перемішують. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С, тиску 0,05 МПа упродовж 40 хв. Після охолодження до температури 37 °С передають у ферментатор.

### **ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В**

На електронних вагах зважують 0,024 кг натрію оцтовокислого, 0,0054 кг марганцю сірчаноокислого. Наважку вносять у ємність об'ємом 2 л, добавляють 0,97 л питної води, перемішують. Закривають ємність ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після охолодження до температури 37 °С передають у ферментатор.

### **ТП 4. Підготовка посівного матеріалу**

#### **ТП 4.1. Одержання культури I генерації**

У флакон із ліофілізованим штамом *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* робочої посівної серії піпеткою в асептичних умовах вносять 3 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію. Вміст флаконів струшують і за допомогою піпетки по 1 мл пересівають у 3 пробірки з 9 мл середовища MRS. Середовище MRS готується та стерилізується співробітниками лабораторії.

Пробірки поміщають у анаеростат і вирощують при температурі 37 °С упродовж 12 год.

#### **ТП.4.2. Одержання культури II генерації**

Беремо колбу з стерильною композицією А і додаємо туди у стерильних умовах композицію Б та В. Після чого розливаємо у 3 заздалегідь простерилізовані та охоложені колби об'ємом 750 мл і в кожну вносимо в асептичних умовах по 200 мл розчину.

Культуру першої генерації вносимо в колби з розрахунком одна пробірка на одну колбу. Вміст колб ретельно перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою й інкубують у анаеростаті при температурі 37±1 °С упродовж 24 годин при ретельному перемішуванні вмісту ємності кожні 4 год. Після вирощування колби використовують для засіву інокулятора.

### **ТП 4.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі**

Для вирощування рідкого посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 5 л у засівну колбу в асептичних умовах передають 2,1 л, який містить: 1,5 л розчин композиції А; 0,2 л розчину композиції Б; 0,2 л розчину композиції В. Потім готове поживне середовище самопливом передають у простерилізований інокулятор.

У стерильних умовах в інокулятор вноситься рідкий посівний матеріал 600 мл. Вирощування інокуляту проводять при температурі 37 °С упродовж 12 год. Без подачі повітря, але з періодичним перемішуванням (70 об/хв) кожні 4 год.

У процесі вирощування посівного матеріалу проводиться відбирання проби з періодичністю в 4 год.

### **ТП 5. Біосинтез**

#### **ТП 5.1. Виробниче культивування**

У попередньо простерилізованому ферментері об'ємом 50 л знаходиться частина стерильного поживного середовища 27,6 л (композиція А) та вносять у стерильних умовах композицію Б та В з колб. У стерильне поживне середовище у загальній кількості 31,5 л вноситься посівний матеріал 3,5 л самопливом.

Культивування проводять при температурі 37 °С протягом 24 годин з періодичним перемішуванням 70 об/хв кожні 4 год. Накопичення біомаси проводять з періодичною нейтралізацією культуральної рідини 20 %-ним розчином гідроксиду натрію до встановлення активної кислотності на рівні (5,5±0,1) од. рН. Перша нейтралізація проводиться приблизно через 3 години, а потім через кожні 1,5 години.

Процес ферментації вважається завершеним, якщо у культуральній рідині концентрація *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* становить приблизно становить  $1 \times 10^7$  та якщо час ферментації наблизився до 24 годин.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 7.1. Карта постадійного контролю

Основні точки контролю передферментаційної підготовки виробництва та процесу біосинтезу пробіотика наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

#### Карта постадійного контролю біосинтезу отримання закваски для йогурта

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
1	2	3	4	5
Кх, Кт 1.2.1. Приготування розчину Жавель-Клейд	Концентрація розчину Жавель-Клейд, температура	Хімічний метод, термометр на колонці подачі води	Після приготування розчину	C = 0,014%, T = 40 °C
Кх, Кт 1.2.2 Приготування розчину Гембар	Концентрація розчину Гембар, температура	Хімічний метод, термометр на колонці подачі води	Після приготування розчину	C = 0,5%, T = 40 °C
Кх, Кт 1.2.3 Приготування розчину Гембар	Концентрація розчину Біомой, температура	Хімічний метод, термометр на колонці подачі води	Після приготування розчину	C = 0,3%, T = 40 °C
Кт 1.4.1 Миття обладнання	Температура миючого розчину, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції	T = 60 °C
Кт 1.4.3 Ополіскування	Температура дезінфікуючого розчину, час ополіскування	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	t = 60 °C, τ = 30 хв

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.10 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>	<i>Філіпенко А.А.</i>				<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Волошина І.М.</i>						
<i>Реценз.</i>					47		
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог Т.П.</i>						

Кт 1.4.4 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час проведення операції	$P = 0,2$ МПа $t = 30$ хв
Кт, Км 1.4.5 Стерилізація	Тиск, температура пари, тривалість процесу, ефективність стерилізації	Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час проведення операції	$P = 0,28$ МПа $t = 1$ год, відсутність мікробіоти
Кт, Кз 2.1 Приготування гідроксиду амонію	Температура, концентрація приготованого розчину	Термометр технічний, хімічний метод	Після приготування розчину	$t = 30$ °С, $C = 20\%$ ,
Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $t = 30$ хв, $t = 105$ °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $t = 40$ хв, $t = 112$ °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний	$P = 0,15$ МПа, $t = 40$ хв, $t = 131$ °С, відсутність мікробіоти

			контроль після стерилізації	
Кт, Км 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, t = 105 °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 112 °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131 °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час пастерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, t = 105 °С, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр	Тиск визначається безперервно під час	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 112 °С, відсутність

композиції Б		технічний, мікробіологічний контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	мікробіоти
Кт, Км 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131 °С, відсутність мікробіоти
Кт.4.1 Одержання культури І генерації	Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, висів на чашки Петрі	Періодично, кожні дві години	t = 37 °С τ = 12 год КУО сторонньої мікрофлори <1
Кт.4.2 Одержання культури ІІ генерації	Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, висів на чашки Петрі	Періодично, кожні дві години	t = 37 °С τ = 24 год КУО сторонньої мікрофлори <1
Кт.4.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, висів на чашки Петрі	Періодично, кожні дві години	t = 37 °С τ = 12 год КУО сторонньої мікрофлори <1
Кт, Кх, Км 5.1 Виробниче культивування в ферментері	Температура вирощування, тривалість, кислотність середовища, кількість обертів мішалки, тиск, концентрація бар	Термометр технічний, годинник технічний, манометр технічний, датчик рН, датчик кількості обертів, хімічний метод, мікробіологічний контроль	На початку, протягом процесу і в кінці	τ = 24 год, t = 37 °С, рН = 6,5, N = 70 об/хв, P = 0,05 МПа, Сбар = 0,16г/л відсутність сторонньої мікробіоти

## 7.2. Мікробіологічний контроль

Полягає у визначенні фізіологічного стану культури *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* та контролю на відсутність сторонніх мікроорганізмів.

Спочатку здійснюється мікроскопія мазків, виготовлених із культуральної рідини та пофарбованих по Граму. В мазках мають бути лише Грам-позитивні палички, що за своїми ознаками, відповідають опису клітин *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (рис. 7.1). При виявленні клітин іншої морфології культуральну рідину необхідно перевірити на наявність контамінуючої мікрофлори шляхом висіву на поживні середовища.

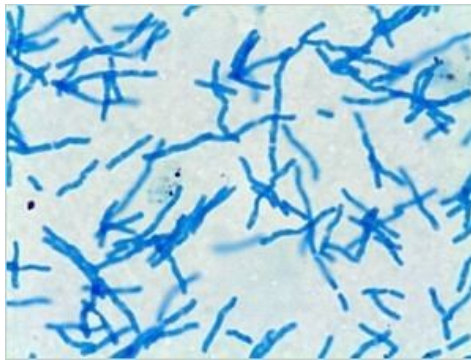


Рис. 7.1. Мікрофотографія забарвлених за Грамом клітин *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

**Висів на поживні середовища** відбувається шляхом поверхневого та двошарового посіву на м'ясопептонний агар, м'ясопептонний агар з 5% глюкози та поверхнево на агаризоване середовище Сабуро. Висівають по 0,1 мл культуральної рідини у чашки Петрі в 3 повторностях. Культуральну рідину рівномірно розподіляють по всій поверхні поживного середовища шпателем Дригальського.

Посіви на МПА інкубують при температурі 37°C. Результати посівів враховують через 24 і 48 годин. Посіви на агаризованому середовищі Сабуро інкубують при температурі 22 °C протягом 5 діб [17].

Після інкубації посівів протягом вказаних термінів на поживних середовищах МПА не мають виявити росту сторонніх мікроорганізмів, на твердому агаризованому середовищі Сабуро - росту грибів. У випадку при виявленні у посівах сторонніх мікроорганізмів контроль відбувається повторно на подвоєній кількості зразків препарату. У разі росту сторонніх мікроорганізмів при повторному висіві зразків, хоча б в одній пробірці, серію бракують.[17]

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

#### **7.3.1. Концентрація біомаси**

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії. Оптичну густина культуральної рідини вимірюють на фотоелектроколориметрі, за  $\lambda = 540$  нм, довжина світлового шляху 5 мм, якщо прилад зашкалює, тоді роблять розведення культуральної рідини. Розведення виконують до тих пір, доки прилад не покаже вірну оптичну густина. Отримане значення на ФЕК множать на кількість розведень та визначають кількість абсолютно сухої біомаси (г/л) за допомогою калібрувального графіка.

Для визначення кількості життєздатних лактобактерій використовують метод Коха. Суть якого полягає у висіві певного об'єму культуральної рідини лактобактерій на агаризованому поживному середовищі в чашках Петрі і підрахунку колоній, беручи до уваги, що кожна колонія – потомство однієї життєздатної клітини. Визначення цим методом включає в себе три етапи: приготування розведень, посів на поживне середовище в чашки Петрі і підрахунок колоній. Чисельність популяції мікроорганізмів зазвичай досить велика, тому для отримання ізольованих колоній необхідно приготувати ряд послідовних розведень. Розведення готують у 0,85% розчині NaCl. Для приготування розведень стерильний розчин розливають по 9 мл у стерильні сухі пробірки. Потім 1 мл суспензії стерильною піпеткою вносять в пробірку з 9

мл стерильного розчину - це 1-е розведення,  $10^{-1}$ . Отримане розведення перемішують новою стерильною піпеткою, вбираючи в піпетку і випускаючи з неї отриману суспензію. Цю процедуру виконують 3-5 разів, потім цією ж піпеткою відбирають 1 мл отриманої суспензії і вносять в 2-у пробірку - отримують 2-е розведення,  $10^{-2}$ . Таким же чином виконують і наступні розведення. Далі на поживне середовище чашки Петрі скляною піпеткою вносять точно вимірний об'єм (0,1 мл) відповідного розведення і розподіляють його стерильним скляним шпателем по поверхні середовища. Підрахунок, як правило, проводять, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності чорним або олівцем по склу відзначають прораховану колонію точкою на зовнішній стороні дна чашки. При великій кількості колоній дно чашки Петрі ділять на сектори, підраховують число колоній в кожному секторі і результати підсумовують.

Однією з основних характеристик пробіотичних бактерій вважається життєздатність, оскільки лише життєздатні мікроорганізми здатні приносити користь організму людини та тварин.

Для визначення життєздатності пропонується використовувати датчик Aber Futura – це прості та компактні системи для онлайн виміру концентрації життєздатних клітин, які розроблені з врахуванням всіх професійних потреб біотехнолога (рис.7.2)



Рис. 7.2. Датчик для визначення життєздатності клітин Aber Futura

Датчик кріпиться на ферментер та в онлайн режимі вимірює концентрацію біомаси.

Суть роботи: Кожна життєздатна клітина, тобто з цілісною плазматичною мембраною, створює заряд, діелектрична природа плазматичної мембрани дозволяє накопичувати даний заряд. Датчик вимірює даний заряд і таким чином визначає кількість життєздатності клітин, результат надзвичайно точний оскільки, заряд залежить від типу клітини і прямо пропорційний об'єму клітин, які містять непошкоджену мембрану.

### **7.3.2. Концентрація цільового продукту**

Відбувається шляхом висіву розведених зразків культуральної рідини та підрахунку кількості колоній.

**Хід роботи.** 1 мл культури вносять у пробірки, що містять по 9 мл середовища ПС № 1 та перемішують шляхом 12-15 кратного прокачування, отримуючи при цьому 1 дозу лактобактерій в об'ємі 10 мл середовища. З цих пробірок роблять послідовні десятикратні розведення від  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$ . Пробірки з розведеннями досліджуваних зразків препарату і робочим стандартним зразком у поживних середовищах (починаючи з  $10^{-1}$ ) поміщають в анаеростат при температурі  $(37 \pm 1)$  °C і інкубують протягом 4-х діб.

Після закінчення інкубації відмічають розведення, в яких наявний ріст колоній лактобактерій.

Якщо вміст живих мікробних клітин в культуральній рідині менше ніж  $10^7$ , а в 1 мл  $10^7$ , тоді контроль потрібно повторити на подвоєній кількості зразків [17].

### **7.3.3. Концентрації джерела вуглецю та азоту**

#### ***Визначення концентрації глюкози***

Джерелом вуглецю в поданому середовищі є глюкоза. Для її визначення використовують глюкозооксидазний метод.

**Суть методу:** в присутності ферменту глюкозооксидази глюкоза окислюється киснем повітря з утворенням в ході реакції перекису водню, який в присутності ферменту пероксидази окислює ортотолуїдин до забарвленої сполуки, інтенсивність забарвлення якої пропорційна концентрації глюкози в розчині [26].

**Хід роботи:** У центрифужні пробірки вносять 1,1 мл розчину хлориду натрію, 0,4 мл розчину сульфату цинку і 0,4 мл 0,3 н розчину NaOH та перемішують. При цьому відбувається утворення дуже тонкого гелю гідрату окису цинку, в який додають 0,1 мл калібрувального розчину, знову перемішують і центрифугують при швидкості 3000 об / хв протягом 10 хвилин.

До 1 мл рідини вносять 3 мл робочого реактиву і обережно перемішують. Фоториметрують через один і той же проміжок часу, з додаванням робочого реактиву в кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см з червоним світлофільтром (довжина хвилі 625 нм). Паралельно готують контрольний дослід, де беруть фізіологічний розчин хлориду натрію.

Розрахунок відбувається за правилом пропорцій або за калібрувальним графіком, для побудови якого на одній осі відкладають концентрацію глюкози, а на іншій - величину екстинкції [26].

### ***Визначення концентрації амінного азоту***

Джерелом азоту в поживному середовищі ПС №1 є амінокислоти та пептиди, що містяться в бактопротеозопептоні, бактомясному екстракті та бактодріжджовому екстракті, які можна визначити шляхом формольного титрування.

**Принцип методу** полягає в блокуванні формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп [27].

**Хід роботи.** У склянку місткістю 50 мл вносять необхідний обсяг аналізованого розчину препарату, місткістю 1,5 - 5,0 мг амінного азоту, і доводять загальний обсяг дистильованої водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють в досліджуваний розчин, рН якого доводять до значення 7,0 з допомогою розчину натрію гідроксиду (0,1 моль/л) або розчину соляної кислоти (0,1 моль/л).

У ході визначення електроди повинні весь час залишатися зануреними в розчин. До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну, перемішують і, не виймаючи електроди, титрують зміст розчином натрію гідроксиду (0,1 моль/л) до рН 9,1. Проводять два паралельних вимірювання.

При титруванні необхідно використовувати бюретку місткістю 5 мл.

Амінний азот розраховують за формулою:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{A \cdot 1000}$$

де А - кількість рідкого зразка (мл), взятого на аналіз; 100 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки; 1000 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в грами [27].

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Тихомирова Н.А.* Технология и организация молока и молочных продуктов: учебник / Н.А. Тихомирова. – М.: ДеЛи Принт, 2007 – 560 с.
2. *Шендеров Б.А.* Микробная экология и функциональное питание. Пробиотики и функциональное питание / Б.А. Шендеров. — М.: ГРАНТЬ, 2001. — 286 с.
3. *Квасников Е.И.* Молочнокислые бактерии и их роль в народном хозяйстве / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 391 с.
4. *Боднарчук О.В.* Вплив технологічних режимів приготування закваски на формування її смако-ароматичних речовин / О.В. Боднарчук // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. – Т. 1, № 3(57), ч. 4. – С. 15–21.
5. Dairy engineering: advanced technologies and their applications / ed. by Murlidhar Meghwal, Megh R. Goyal, Rupesh S. Chavan. – New Jersey: Apple Academic Press Inc., 2017. – 398 p.
6. Патент України № 114511 Стійкий до ампіциліну текстуруючий штам молочнокислих бактерій / Е. Йохансен, К.І. Серенсен, А. Кібеніч. – Опубл. 2017.
7. ДСТУ 4343:2004 Йогурти. Загальні технічні умови. – К.: Держспоживстандарт України, 2005. – 15 с.
8. ГОСТ 34372-2017 Закваски бактериальные для производства молочной продукции. Общие технические условия. – М.: Стандартинформ, 2018. – 24 с.
9. Мікробіологія молока і молочних продуктів з основами ветеринарно-санітарної експертизи: навч. посібник / [Бергілевич О.М., Касянчук В.В., Салата В.З. та ін.; за ред. д.вет.н., проф. В.В. Касянчук]. – Суми: Університетська книга, 2010. – 320 с.
10. *Penaud S.* The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution / S. Penaud, M. van de Guchte, C. Grimaldi et al // PNAS – 2006. – Vol. 103, N 24. – P. 9274–9279.

11. Patent EP 2494027 A2. New strains of lactic acid bacteria and their combinations producing probiotic preparations / R.Rogelj, V.N. Kostadinova, B.B. Matijasic. –publ. 2012.

12. Патент РФ № 2446209. Способ получения штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* с низкой степенью постпродуцирования молочной кислоты, полученные текстурирующие штаммы (варианты), молочный продукт и способ его получения с использованием текстурирующих штаммов / Е.Н. Симсен, А.Х. Йохансен. – опубл. 2012.

13. Patent US № 7901925 B2. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strain and compositions / Gregory G. Wojrab. - publ. 2011.

14. *Tropcheva R.* Sensory properties of Bulgarian yogurts, supplemented with *Lactobacillus* as probiotic adjuncts / R. Tropcheva, R.Georgieva, V. Paskov // *J. Texture Stud.* – 2014. – Vol. 45., I. 3 – P. 187-194.

15. Харчова біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, О.І. Скроцька, Н.В.Кігель. – К.: Ліра-К, 2016. – 408 с.

16. *Пирог Т. П.* Загальна біотехнологія: Підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.

17. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник / Т.П. Пирог, Л.Р. Решетняк, В.М. Поводзинський, Н.М. Грегірчак. – Вінниця: Нова книга, 2007. – 463 с.

18. *Определитель бактерий* Берги.- 9-е изд. / Пер.под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – Т.1, 2 – 800 с.

19. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія: Підручник –2-е вид., доп і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.

20. *Morel F.* Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis / *F. Morel, J. Frot-Coutaz* // *Microbiology.* – 1999. – Vol. 145. – P. 437–446.

21. Oommen B. S., Proteolytic Specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Influences Functional Properties of Mozzarella Cheese / B. S. Oommen, D. J. McMahon // J. of Dairy Sci. – 2002. – Vol. 85, N 11. – P. 2750–2758.

22. Kimmel S. A. Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR Grown in a Semidefined Medium / S.A. Kimmel, R.F. Roberts, G.R. Ziegler // Appl Environ Microbiol. – 1998. – Vol. 64, N 2. – P. 659–664.

23. Elli M. Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut / M. Elli, M. Callegari // Appl Environ Microbiol. – 2006. – Vol. 72, N 7. – P. 5113–5117.

24. Easo J.G. Immunostimulatory Actions of Lactobacilli: Mitogenic Induction of Antibody Production and Spleen Cell Proliferation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* / J.G. Easo, J.D. Measham // Food and Agricultural Immunology. – 2002. – Vol. 14, N 1. – P. 73-83.

25. Akpinar A. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish homemade yoghurts / A. Akpinar, O. Yerlikaya, S. Kiliç // African Journal of Microbiological Research. – 2011. – Vol. 5, N 6. – P. 675–682.

26. Добрава В.Е. Валидация методики определения глюкозы в пробах биологической жидкости глюкозооксидазным методом с помощью анализатора-фотометра биохимического «BPC BioSED» / В.Е. Добрава, Л.Н. Малоштан, О.В. Должикова // Системи обробки інформації. – 2008. – Т.4, №71. – С. 92–95.

27. Практикум по аналитической химии. / Под общ. ред. В.Д. Пономарева, Л.И. Ивановой. – М.: Высшая школа, 1983. – 435 с.

28. Sarah Sohrabvandi, Amir-Mohammad Mortazavian Suitability of MRS-bile agar for the selective enumeration of mixed probiotic bacteria in presence of mesophilic lactic acid cultures // Iranian journal of biotechnology, Vol. 10, No. 1, January 2012, pp. 16-21.

29. Пат. 2178646 RU, A23C9/12, C12N1/20, C12N1/20, C12R1:23. Способ производства пробиотика в жидком или сухом виде на основе кисломолочных бактерий/ Т.И. Анисимова, А.И. Кустов. – Оpubл. 27.01.2002.

30. *Квасников Е.И., Нестеренко О.А.М.*, «Наука», 1975, стр. 1-384. Молочнокислые бактерии и пути их использования.

31. *BIOSTAT® D DCU* [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors/stainless-steel-bioreactors/biostat-cplus>

32. *ЛАБОРАТОРНІ ФЕРМЕНТЕРИ ЄМНІСНОГО ТИПУ* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [file:///C:/Users/admin/Downloads/biot\\_2012\\_5\\_1\\_5.pdf](file:///C:/Users/admin/Downloads/biot_2012_5_1_5.pdf)

33. *Мошковська О.А.* Аналіз сучасного стану молока продуктового під комплексу України, проблем його розвитку та шляхів їх вирішення / О.А. Мошковська // *Агросвіт*. – 2019. – №18. – С. 16-23.

34. *Державна служба статистики України* [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/>

35. *Чмут А.В.* Стан та тенденції розвитку ринку молока та молочної продукції в Україні / А.В. Чмут, Н.В. Антош // *Науковий вісник Мукачівського державного університету*. – 2018. – № 17. – С. 174-181.

36. *Чернуха Т. Е., Ємцев В. І.* Тенденції та проблеми розвитку ринку молочної продукції в Україні / Т. Е. Чернуха, В. І. Ємцев // *Young Scientist*. – 2018. - № 6 (58). – С. 219-223.

37. *Степанчук С.О.* Стан та перспективи розвитку молочного ринку України / С.О. Степанчук, Ю.Ю. Єфісько // *Економіка та держава*. – 2017. – № 5. – С. 99–102.

38. *Тивончук С.В.* Розвиток ринку виробництва молока в Україні в контексті євроінтеграційних процесів / С.В. Тивончук, Я.О. Тивончук, Т.П. Павлоцька // *Економіка агропромислового комплексу*. – 2017. – № 4. – С. 25–31.

39. Патент України № 114511 Стійкий до ампіциліну текстуруючий штам молочнокислих бактерій / Е. Йохансен, К.І. Серенсен, А. Кібеніч. – Опубл. 2017.