

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Скок Ольги Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Kluyveromyces marxianus* як компонента закваски для одержання кефіру

керівник роботи Старовойтова Світлана Олександрівна к.б.н., доцент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року № 188-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Kluyveromyces marxianus*; цільовий продукт: біомаса та кількість колонієутворюючих одиниць; геометричний об'єм ферментера: 1 м³; коефіцієнт заповнення: 0,5

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема одержання біомаси *Kluyveromyces marxianus* - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема одержання біомаси *Kluyveromyces marxianus* - 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.25- 08.03.25	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	08.03.25- 24.03.25	
3	Техніко-економічне обґрунтування	24.03.25- 31.03.25	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва	31.03.25- 14.04.25	
5	Специфікація обладнання	14.04.25- 28.04.25	
6	Опис технологічної схеми	28.04.25- 05.05.25	
7	Контроль виробництва	05.05.25- 12.05.25	
8	Оформлення кваліфікаційної роботи	12.05.25- 28.05.25	
9	Оформлення графічної частини	14.04.25- 28.05.25	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Ольга СКОК _____
(ім'я та прізвище)

Світлана СТАРОВОЙТОВА _____
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

This qualification work considers the development of a technological and hardware scheme for the production of biomass of *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925 as a component of the starter for the production of kefir, which is obtained during cultivation on YPD medium, which includes: yeast extract - 10 g/l, peptone - 20 g/l, glucose - 20 g/l, distilled water - up to 1000 ml, and we get a biomass yield of 4,5 g/l with a colony forming units (CFU) of 10^7 . As mentioned earlier, the biomass is used to ferment milk and produce kefir. The production capacity was calculated from the data on kefir production in 2023 by the Milk Alliance group of companies, which includes such brands as Yagotynske, Pyriatyn, Slavia and Zlatokrai, and amounted to 39 m³ per year of culture liquid.

The technology of *Kluyveromyces marxianus* biomass production includes auxiliary works (preparation of sterile aeration air, preparation and sterilization of 15% NaOH and preparation of 15% HCl to control the pH during cultivation, preparation and sterilization of the foam suppressant, preparation and sterilization of culture media) and the technological process (three stages of cultivation of seed (in flasks on rockers, in inoculators of 10 and 100 liters) and biosynthesis in a 1 m³ fermenter with a filling factor of 0,5. A map of stage-by-stage control of pre-fermentation processes and production biosynthesis was developed and methods for monitoring the target product (biomass and CFU concentrations), amine nitrogen, and glucose were specified.

The qualification work is set out on 81 pages, contains 22 tables, 9 figures, consists of an introduction, nine chapters, a list of references (80 items), appendices, technological (A1 format, 1 sheet) and hardware (A1 format, 2 sheets) diagrams.

Key words: kefir, *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925, starter, biomass, biosynthesis.

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота розглядає розроблення технологічної та апаратурної схеми отримання біомаси *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925 як компонента закваски для одержання кефіру, яка отримується під час культивування на середовищі YPD, до складу якого входять: дріжджовий екстракт – 10 г/л, пептон – 20 г/л, глюкоза – 20 г/л, дистильована вода – до 1000 мл, і отримуємо вихід біомаси 4,5 г/л з показниками колонієутворюючих одиниць (КУО) 10^7 . Як сказано раніше, біомаса використовується для заквашування молока і отримання кефіру. Потужність виробництва була розрахована з даних про виготовлення кефіру у 2023 році групою компаній «Молочний альянс», до складу якої входять такі бренди як «Яготинське», «Пирятин», «Славія» та «Златокрай» і становила 39 м^3 на рік культуральної рідини.

Технологія виробництва біомаси *Kluuveromyces marxianus* включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування і стерилізація 15% NaOH та приготування 15% HCl для контролю рН при культивуванні, приготування і стерилізація піногасника, оскільки ризик піноутворення високий, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л) та біосинтез у ферментері об'ємом 1 м^3 із коефіцієнтом заповнення 0,5. Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методики контролю цільового продукту (концентрації біомаси та КУО), амінного азоту та глюкози.

Кваліфікаційна робота викладена на 82 сторінках, містить 22 таблиць, 8 рисунків, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (79 найменувань), додатків, технологічної (формат A1, 1 аркуш) та апаратурної (формат A1, 2 аркуші) схем.

Ключові слова: кефір, *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925, закваска, біомаса, біосинтез.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> ЯК КОМПОНЕНТА ЗАКВАСКИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ КЕФІРУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	13
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	18
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба в цільовому продукті – заквасці для кефіру.....	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва закваски для кефіру	22
3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для одержання біомаси <i>Kluuveromyces marxianus</i>	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	27
4.1. Шлях катаболізму глюкози у <i>Kluuveromyces marxianus</i>	27
4.2. Біотрансформація глюкози у біомасу <i>Kluuveromyces marxianus</i>	28
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	34
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	34
5.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря для одержання біомаси <i>Kluuveromyces marxianus</i>	35
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	37
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів	37
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва біомаси <i>Kluuveromyces marxianus</i> TISTR 5925 як компонента закваски для отримання кефіру.....	41

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання біомаси <i>Kluyveromyces marxianus</i>	46
5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника	50
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	51
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	53
РОЗДІЛ 8. КОНЦЕНТРУВАННЯ ТА ЛЮФІЛІЗАЦІЯ БІОМАСИ <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> , ЯК КОМПОНЕНТА ЗАКВАСКИ	62
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	65
9.1. Мікробіологічний контроль.....	65
9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища....	65
9.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу.....	66
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	67
9.2.1. Визначення концентрації біомаси	67
9.2.2. Визначення кількості життєздатних клітин.....	67
9.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення	68
9.2.4. Визначення концентрації джерела азотного живлення	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:	73
ДОДАТКИ.....	83

ВСТУП

Біотехнологія — це галузь сучасної науки та техніки, що зосереджена на застосуванні біологічних процесів для виробництва різноманітних продуктів та послуг. Простіше кажучи, вона використовує живу природу для розв'язання практичних завдань у промисловості [1]. Промислова біотехнологія здебільшого спирається на маніпулювання та вирощування різних типів бактерій, дріжджів та нитчастих грибів. Одним із провідних напрямів біотехнології є мікробна ферментація, яка застосовується для виробництва речовин, що можна застосовувати для виробництва, харчових продуктів, напоїв, інгредієнтів і добавок, а також фармацевтичних препаратів, парфумів, розчинників і біопалива. Розробка нових рішень допоможе вирішити ряд проблем сучасної промисловості. Для досягнення цих цілей біотехнологи створюють та вдосконалюють мікробні клітинні фабрики, а також оптимізують процеси бродіння. Це дозволяє ефективно використовувати мікроорганізми для виробництва бажаних продуктів. Також мікробна ферментація використовується для сталого виробництва ряду продуктів. У сучасному світі, де з'явилася тенденція замінювати м'ясні і молочні вироби виробами рослинного походження, мікробна ферментація може розв'язати ряд проблем, які пов'язані з цим. Через що мікробна ферментація відіграватиме все більшу роль у цьому секторі, оскільки вона може забезпечити стале та масштабове виробництво цінних продуктів харчування та харчових інгредієнтів. Говорячи про контрольовану мікробну ферментацію, не можна не згадати, що вона використовується людьми з самого початку цивілізації для виробництва ферментованих харчових продуктів і напоїв. [2]

У сучасному світі велику увагу приділяють корисним продуктам харчування з пробіотичними мікроорганізмами та функціональними органічними речовинами. У цих реаліях зростає інтерес людей до кефіру, а отже й інтерес підприємців до комерційного виготовлення кефіру, оскільки він може продаватися як натуральний

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.З</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум. докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	ВСТУП	<i>Літ..</i>	<i>Арк..</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Скок О. В.</i>					<i>8</i>	<i>82</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр. Н.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В. П.</i>						8
					<i>Кафедра БТМ</i>			

напій, який містить корисні для здоров'я бактерії. [2]

Kluyveromyces marxianus є новим промисловим мікроорганізмом з пробіотичними властивостями, який показує ряд переваг над іншими мікроорганізмами, це такі переваги як: висока швидкість росту на різноманітних джерелах вуглецю, здатність використовувати широкий спектр цукрів, включаючи лактозу та інулін, а також здатність метаболізувати різні недорогі субстрати, включаючи сирну сироватку або інші молочні відходи, легкість культивування в малих або великих біореакторах, легке очищення продукту та відсутність чутливості до інфекційних агентів, таких як бактеріофаги, термотолерантність. Ці дріжджі можна охарактеризувати, як ті, які утворюють велику кількість колонієутворюючих одиниць і біомаси за відносно невеликі проміжки часу (18, 20 год), що також дає їм перевагу над іншими мікроорганізмами.

Новизною цієї роботи є застосування штаму дріжджів *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925, які мають високу швидкість росту на недорогих субстратах, та допомога кефіру у створенні свого унікального смаку за рахунок утворюваних під час бродіння сполук, таких як спирти, фруктові ефіри, кетони, карбонові кислоти, ароматичні вуглеводні та інші. [3]

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* ЯК КОМПОНЕНТА ЗАКВАСКИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ КЕФІРУ

Мікробіологічні показники кефіру. Кількість життєздатних молочнокислих бактерій у кефірі не менше $1 \cdot 10^7$ КУО в 1 см^3 , а кількість дріжджів - $1 \cdot 10^3$ КУО в 1 см^3 . Необхідно також перевіряти кефір на плісняві гриби, кількість яких не повинна перевищувати 50 КУО в 1 см^3 . Заборонено, щоб у кефірі були: патогенні мікроорганізми, до яких також входять бактерії роду *Salmonella* та *Staphylococcus aureus*, а також бактерії групи кишкових паличок або їх коліформи. [4]

Біологічна дія. Одним з багатьох плюсів споживання кефіру є протизапальна та антиоксидантна активність, спокійніша непереносимість лактози та стримування патогенних бактерій, а також – можливість переносити пробіотичні бактерії. [5] Кефір має більший вплив на здоров'я людини, ніж можна було б подумати, він проявляє антигіпертензивну, протиракову, антидіабетичну, антимікробну та гіпохолестеринемічну дію. [6] Особливо важливою у сучасному світі є його пробіотична дія, яка може проявлятися в імуномодуючій дії, яка включає непрямий сприятливий вплив метаболітів мікроорганізмів, присутніх у симбіозі, зокрема пептидів (біогенних). Ще один пробіотичний ефект полягає в тому, що мікробіота кефіру виробляє антимікробні метаболіти (включаючи органічні кислоти, перекис водню та бактеріоцини), які пригнічують патогени, особливо в кишечнику слизової оболонки. [7]

Потенційні пробіотичні властивості *Kluuveromyces marxianus*. Пробиотичні мікроорганізми позитивно впливають на здоров'я, що може частково залежати від їх стійкості в кишечнику та адгезії до поверхонь слизової. Також важливою для цих організмів є здатність модулювати імунну відповідь хазяїна. Пробиотичні властивості дріжджів *K. marxianus* наводяться на прикладі штаму *Kluuveromyces marxianus* B0399. Цей штам можна класифікувати як високоадгезивний штам до ентероцитоподібних клітин Сасо-2 людини. У мононуклеарах периферичної крові *K. marxianus* B0399

НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ				
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Скок О. В.			
Перевір.	Старовойтова С.О.			
Реценз.				
Н. Контр. Н.				
Затверд.	Стадніков В. П.			
РОЗДІЛ 1. Характеристика <i>Kluuveromyces marxianus</i> як компонента закваски для одержання кефіру				
		Літ..	Арк..	Аркушів
			10	82
Кафедра БТМ 10				

індукує продукцію прозапальних цитокінів IL-1 β , TNF- α , IFN- γ та IL-6, які відіграють вирішальну роль у захисних механізмах організму. [8]

Як ми пам'ятаємо, для пробіотичних організмів важливо виживати у шлунково-кишковому тракті. По цьому параметру *K. marxianus* B0399 є доволі хорошим штамом, оскільки вони можуть виживати в імітованих умовах шлунка з помірним зниженням життєздатності дріжджів (від початкової концентрації $8 \cdot 10^6$ КУО/мл до кінцевого значення $9,4 \cdot 10^4$ КУО/мл протягом 3 год), також – виживати з фізіологічною концентрацією жовчних солей, з невеликим зниженням (від $9,2 \cdot 10^6$ КУО/мл до $8 \cdot 10^6$ КУО/мл протягом 3 год). Крім того, *K. marxianus* B0399 були здатні анаеробно рости в системному середовищі моделі товстої кишки.

У експерименті *K. marxianus* B0399 після введення у модель товстої кишки викликали значне збільшення концентрацій ацетату і пропіонату, а концентрація лактату та бутирату значних змін не зазнала. Збільшення концентрації ацетату і пропіонату, а також незначні зміни концентрацій лактату та бутирату є цінною кінцевою точкою пробіотичних добавок, оскільки зниження рівня ацетату та пропіонату корелює з метаболічними профілями кишечника пацієнтів, уражених різними функціональними шлунково-кишковими розладами, а лактат та бутират забезпечують енергію для кишкових колоноцитів і сприяють росту епітеліальних клітин.

Ще однією важливою пробіотичною рисою *K. marxianus* B0399 є підвищення рівня бактерій, що належать до корисного для здоров'я людини роду *Bifidobacterium*. Дріжджі *Kluveromyces marxianus* B0399 можуть покращувати ріст і виживання біфідобактерій у складних харчових матрицях. [8]

Вплив *Kluveromyces marxianus* на органолептичні властивості кефіру. Найбільший вплив *K. marxianus* мають на смак і запах кефіру. Як ми знаємо, кефір своєму унікальному смаку і запаху зобов'язаний вмісту в своєму складі етанолу. *K. marxianus* у процесі своєї життєдіяльності виділяють вищесказані сполуки, а також деяку кількість ароматичних (спирти, фруктові ефіри, кетони, карбонові кислоти та ароматичні вуглеводні) та смакових сполук (2-фенілетанол, 2-фенетилацетат, фенілетилпропанат) під час бродіння, які створюють оригінальний смак кефіру. [3]

Сфери застосування. В Європі кефір споживають у багатьох країнах: Болгарії, Данії, Греції, Фінляндії, Угорщині, Ірландії, Італії, Польщі, Португалії, Іспанії та Швеції, а в Євразії та Азії зустрічається в Туреччині, Китаї, Індії, Ірані, Японії, Малайзії, Тайвані, Таїланді і Тибеті зокрема. Його також споживають на Близькому Сході, у Північній Африці, Канаді, США, Південній Америці (Аргентина і Бразилія), а також у Південній Африці. Широкомасштабне промислове виробництво кефіру відбувається в Австралії, Австрії, Чехії, Франції, Німеччині, Ізраїлі, Люксембурзі, Норвегії, Польщі, Словаччині, Швейцарії. Комерційні виробники кефіру: Lifeway (США, Великобританія та Канада), Bionova (Італія), Latteria Kefir (Австрія), Evolve Kefir (США), Wallaby Organic (Австралія) та CocoKefir (США). [7] Оскільки кефір є доволі популярним напоєм, а також інгредієнтом, який часто використовується в кулінарії, а особливо в кондитерській справі і виробництві сиру, саме тому в Україні нараховується щонайменше 66 заводів, які його виробляють. [9]

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Кефір можна заквашувати, використовуючи різні мікроорганізми в заквашувальній композиції. У даній роботі були порівняні 2 штами дріжджів *Kluveromyces marxianus*.

У табл. 2.1 наводяться назви мікроорганізмів, їх умови культивування і концентрація життєздатних клітин. Концентрація життєздатних клітин у *K. marxianus* TISTR 5925, *K. marxianus* CIDCA 8154, була приблизно однакова і висока, хоча найбільша концентрація життєздатних клітин спостерігається у *K. marxianus* TISTR 5925 і дорівнює 1×10^7 КУО/мл. [10] Хотілося б додати, що дріжджі *K. marxianus* у даному дослідженні у 2 рази перевершують необхідний мінімум, який становить $1 \cdot 10^3$ КУО/мл. *K. marxianus* TISTR 5925 має найменший час культивування, який зменшує кількість витраченої електроенергії, що значно економить процес виробництва.

У табл. 2.2 розраховується вартість 1 л поживного середовища з вартості 1 кг компоненту і кількості грамів, необхідних для приготування поживного середовища. У результаті цих підрахунків найдешевше поживне середовище 72,3 грн за 1 л – у *K. marxianus* TISTR 5925, а найдорожче 546,61 грн за 1 л – у *K. marxianus* CIDCA 8154.

У табл. 2.3 була обрахована орієнтована вартість 1 г біомаси. Для штама *K. marxianus* CIDCA 8154 концентрація біомаси була розрахована за вуглецем. Після підрахунку найдешевшим мікроорганізмом стали дріжджі *K. marxianus* TISTR 5925 з вартістю 289,2 грн за 1 г біомаси.

Беручи до уваги всі фактори, які були описані раніше, а саме КУО, час, вартість 1 л поживного середовища і вартість 1 г біомаси, найкращим мікроорганізмом з наведених можна вважати *K. marxianus* TISTR 5925.

					НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ		
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата	Літ..	Арк..	Архувів
Розроб.		Скок О. В.					
Перевір.		Старовойтова С.О.				13	82
Реценз.					13		
Н. Контр. Н.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стадніков В. П.					

Особливості одержання біомаси *Kluyveromyces marxianus* на суміші ростових субстратів

Продуцент	Склад поживного середовища г/л	Концентрація життєздатних клітин, КУО/мл	Тривалість культивування, год	Особливості культивування	Література
<i>Kluyveromyces marxianus</i> TISTR 5925	Дріжджового екстракту – 10 Пептону – 20 Глюкози – 20	1×10^7	18	30°C, в аеробних умовах, рН 5, швидкість перемішування 200 об/хв та швидкість аерації 1,0 об/хв	Vaithanomsat, P., Boonlum, N., Trakunjae, C., Apiwatanapiwat, W., Janchai, P., Boondaeng, A., ... & Jarerat, A. (2022). Functionality of yeast β -glucan recovered from <i>kluyveromyces marxianus</i> by alkaline and enzymatic processes. <i>Polymers</i> , 14(8), 1582.
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CIDCA 8154	Протеоза-пептон № 3 – 10 Екстракт яловичини – 10 Дріжджовий екстракт – 5 Глюкоза – 20 Полісорбат 80 – 1 Цитрат амонію – 2 Ацетат натрію – 5 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,1 MnSO ₄ ×4H ₂ O – 0,05 K ₂ HPO ₄ – 2	$3,9 \times 10^6$	20*	30°C, в аеробних умовах, рН 6	Kakisu, E., Irigoyen, A., Torre, P., De Antoni, G. L., & Abraham, A. G. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. <i>Journal of Dairy Research</i> , 78(4), 456-463.

Примітка. * - усереднене значення

Ціна поживних середовищ для вирощування

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Kluyveromyces marxianus</i> TISTR 5925	Дріжджового екстракту	10	4 508,30	45,083	1
	Пептону	20	1320	26,4	2
	Глюкози	20	42	0,84	3
	Вартість 1 л середовища – 72,3 грн				
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CIDCA 8154	Протеоза-пептон № 3	10	44 827,09	448,2709	4
	Екстракт яловичини	10	7296	72,96	5
	Дріжджовий екстракт	5	4 508,30	22,5415	1
	Глюкоза	20	42	0,84	2
	Полісорбат 80	1	330	0,33	6
	Цитрат амонію	2	450	0,9	7
	Ацетат натрію	5	90	0,45	8
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	20,40	0,00204	9
	MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,05	47,40	0,00237	10
	K ₂ HPO ₄	2	156	0,312	11
Вартість 1 л середовища – 546,61 грн					

Примітка: * - Ціни вказано станом на березень 2024 року. 1 - <https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html>; 2 - <https://www.systopt.com.ua/item-pepton-fermentatyvnyj>; 3 - <https://www.systopt.com.ua/item-glyukoza>; 4 - <https://shop.hlr.ua/ua/1072291000-proteozo-pepton-dlya-mikrobiologii-1-kg-235533.html>; 5 - <http://lab-mir.com/index.php/%D0%BA%D0%B0%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D0%B3/%D0%BF%D0%B8%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B5-%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%8B/%D0%BF%D0%B8%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B5-%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%8B-%D0%BF%D1%80-%D0%B2%D0%B0-%D0%B8%D0%BD%D0%B4%D0%B8%D1%8F/36667-detail.html>; 6 - <https://shop.hlr.ua/ua/tvin-80-97586.html>; 7 - https://prom.ua/ua/p1307940651-ammonij-limonnokislyj-zameschennyj.html?token=v2%3AXzxYyjFRJLTL5p8KBcH-jMB5xgs27fFIo9eCwTat1kmgN5kekYwb_HFiCXzSvmHuxhbq1-H9B29ssHLHkF1Y2fSPYZnLUDLfnO3zN7mFQDoLck-9zJ6WvU-7MUDsmYz&campaign_id=1514238&product_id=1307940651&source=prom%3Asearch%3Aserp&loc

ale=uk&category_ids=81704&primelead=MS4yNg&from_spa=true;	8	-
https://www.systopt.com.ua/item-natrij-otstovokyslyj-atsetat-natriyu;	9	-
https://www.systopt.com.ua/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu;	10	-
https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu;	11	-
https://www.systopt.com.ua/item-kalij-fosfornokyslyj-kaliju-fosfat-2-zamishhenyj;		

Таблиця 2.3

Теоретична вартість 1 г біомаси, вирощеної на суміші поживних речовин

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість, грн/л
1	2	3	4	5	6
<i>Kluyveromyces marxianus</i> TISTR 5925	4,5	18	0,25	72,3	289,2
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CIDCA 8154	8*	20	0,4	546,61	1366,53

Примітка. * – розраховано за вуглецем.

Розрахунок біомаси за вуглецем

Визначаємо загальну кількість вуглецю в молекулі глюкози.

Глюкоза (C₆H₁₂O₆) є ключовим субстратом, але не весь її вуглець використовується ефективно. Приблизно 50% субстрату йде на біосинтез та нарощування біомаси, тоді як інша половина витрачається на так зване "холосте окиснення". Це означає, що лише половина доступного вуглецю з глюкози фактично перетворюється на біомасу. Обчислення відсотка вуглецю в складі глюкози:

$$x_1 = \frac{72}{180} \times 100\% = 40\%$$

Розраховуємо масу вуглецю у 20 г/л суміші цукрів :

$$G = 20 \cdot 0.4 = 8 \text{ г/л}$$

Кількість вуглецю, що міститься в біомасі.

Вміст вуглецю в біомасі становить 50 % від сухої маси, оскільки концентрацію біомаси не вказано. Спробуємо розрахувати максимальний вихід біомаси з наявної

кількості вуглецю. Враховуючи, що на холосте окиснення витрачається 50% вуглецю, з 8 г вуглецю може утворитися 8 г біомаси.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Перевірка складу поживного середовища, призначеного для культивування *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925.

Тривалість культивування продуцента становить 18 год, концентрація біомаси становить 4,5 г/л, а поживне середовище має такий склад (г/л) [10]:

- Дріжджового екстракту – 10
- Пептону – 20
- Глюкози – 20

Основні елементи, які потрібні для росту біомаси - це вуглець та нітроген. Інші компоненти у надлишку містяться у дріжджовому екстракті.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Витрати на синтез біомаси. Джерело вуглецю – глюкоза. У біомасі міститься 50 % карбону, то у 4,5 г біомаси вміст карбону буде $4,5 \times 0,5 = 2,25$ г. Дана величина карбону знаходиться в $(2,25 \times 180) / 72 = 5,625$ г глюкози. Щоб отримати 4,5 г біомаси, зважаючи на 40% втрати субстрату на «холосте окислення», у середовище потрібно внести $(5,625 \times 0,4) + 5,625 = 7,875$ г/л глюкози. За даним підрахунком кількість глюкози, яка використовується для виробництва біомаси, відповідає заданим значенням біомаси.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Витрати на синтез біомаси. Якщо припустити, що біомаса містить 10% нітрогену, то в 4,5 г/л біомаси вміст азоту (N) становитиме 0,45 г/л. *Kluyveromyces marxianus* асимілює як джерела азотного живлення - амінний азот. Для одержання біомаси у використовуваному середовищі джерелом азоту є пептон та дріжджовий екстракт.

Знаючи, що у органічних сполуках приблизно 10% нітрогену, рахуємо кількість азоту у джерелах - пептону – 20 г/л, тоді нітрогену 2 г/л; дріжджового екстракту 10 г/л в середовищі, тоді нітрогену 1 г/л. Разом в середовищі 3 г/л азоту, при необхідності в 0,45 г/л, вмісту джерела азоту достатньо.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Морфолого-культуральні ознаки

Kluveromyces marxianus є одним із представників дріжджів. Форма їх клітин може бути куляста, овальна, циліндрична, еліпсоїдна, а також вони можуть утворювати псевдогіфи від слабо розвинених до сильно розгалужених з кількома бластокондідами. (рис. 2.1.). [12].

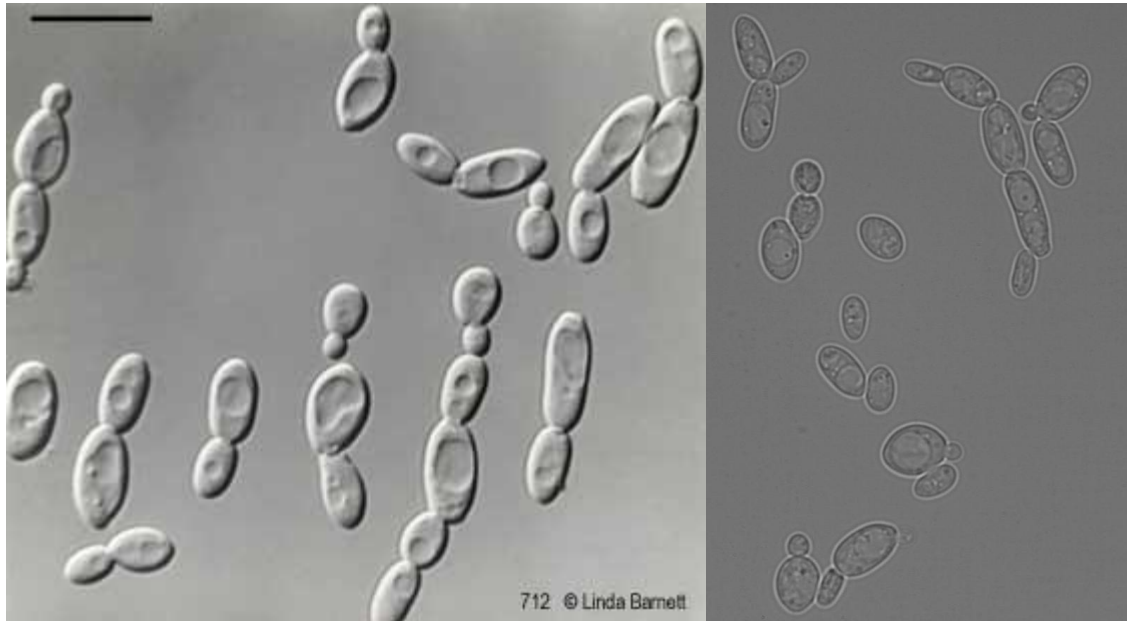


Рис. 2.1. Мікроскопія клітин *Kluveromyces marxianus*

При рості на солодовому агарі через 3 дні при 25°C клітини стають кулястими, від еліпсоїдної до циліндричної форми, зустрічаються поодинці, парами або короткими ланцюжками. Колонії мають маслянисту, глянцевою текстурою, їх колір коливається від кремового до коричневого, рідко – рожевий.

При рості в бульйоні на солодовому екстракті *K. marxianus* утворюють кільце та можуть утворювати тонку плівку [12].



Рис.2.2 Колонії *K. marxianus* на селективному лактозному агарі [13]

Фізіолого-біохімічні ознаки

Дріжджі *Kluyveromyces marxianus* є факультативними анаеробними мікроорганізмами по відношенню до кисню [14]. Їх тип живлення – хемоорганогетеротрофний, оскільки їхнім джерелом вуглецю та енергії є органічні сполуки.

Kluyveromyces marxianus є мезофілом, їхній температурний оптимум складає 19-37°C [12], а також дані дріжджі є термостійкими, оскільки здатні витримувати температури до 45°C [14]. Оптимальне рН – 4, але *K. marxianus* здатні розвиватися в межах рН 3–8 [15].

Kluyveromyces marxianus асимілює лактозу, глюкозу, інулін, L-малат, амігдалін, D-рафінозу, сахарозу, L-арабінози, етанол, целобіозу, гліцерин, сукцинат, кадаверин, етиламін, L-лізин і не асимілює аргінін GP, D-мальтозу, галактит, 5-Кето-D-глюконат, метанол, N-ацетил-D-глюкозамін, гексадекан, селітру, нітрит, креатинін [12,16].

Дріжджі *K. marxianus* можуть розмножуватися статеву, безстатеву та вегетативно. При вегетативному розмноженні розмноження відбувається брунькуванням. При безстатевому розмноженні – за допомогою бластоконідій. Статеве розмноження – за допомогою аскоспор. Спори утворюються від однієї до чотирьох, і вони мають форму від сферичної до еліпсоїдної та ниркоподібної. У *Kluyveromyces marxianus* спороутворення відбувається через 25 днів при 17-25°C на

агарі з 1% солодового екстракту та ацетатному агарі Маккларі. Більшість штамів добре спороношують [12].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Інформація про філогенетичну класифікацію *Kluuveromyces marxianus* взята з GenBank. [17]

Домен – *Eukaryota*

Царство – *Fungi*

Підцарство – *Dikarya*

Тип – *Ascomycota*

Відділ – *saccharomyceta*

Підвідділ – *Saccharomycotina*

Клас – *Saccharomycetes*

Порядок – *Saccharomycetales*

Родина – *Saccharomycetaceae*

Рід – *Kluuveromyces*

Вид – *marxianus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.

3.1. Потреба в цільовому продукті – заквасці для кефіру

Оскільки цільовим продуктом є закваска для кефіру, то розглянемо необхідність у кінцевому продукті (кефірі), адже є пряме співвідношення між виробництвом кефіру і потребою в заквасці для нього. Кефір застосовується як компонент готових страв, так і як самостійний продукт.

Вагому частку в Україні займає молочна продукція, яку використовують у своєму раціоні багато українців, тому не дивно, що в Україні нараховується щонайменше 66 заводів, які виробляють кефір.[9] За довоєнними даними виробництво кефіру в Україні з кожним роком зростало, що свідчить про зацікавленість людей цим продуктом. [18]

Зацікавленість світової спільноти кефіром підкреслюється значною кількістю досліджень, присвячених його впливу на організм людини. Кефір має безліч корисних властивостей: він покращує імунітет, уповільнює старіння організму, знижує холестерин, знижує ризик остеопорозу, також він допомагає при проблемах шлунково-кишкового тракту, оскільки позитивно впливає на мікрофлору кишківника і може пригнічувати ріст кишкової палички, бактерій і сальмонели. З огляду на його доступну ціну та можливість швидко й ситно втамувати голод, а головне - корисно перекусити навіть людям з непереносимістю лактози, не дивно, що цей продукт є популярним. [19,20,21]

На даний момент, у період війни, дуже важко знайти статистику певного заводу чи цілої країни, тому дані про виробництво кефіру вираховуються з даних про виробництво кисломолочної продукції певною компанією. У 2023 році група компаній «Молочний альянс», яка об'єднує відомі бренди, серед яких «Яготинське», «Пирятин», «Славія» та «Златокрай», виробила 104 250 тонн кисломолочної продукції. У компанії є 69 позицій кисломолочних продуктів, з яких 13 займає кефір. У відсотковому складі 18,84% займає кефір, тоді його виробництво за 2023 рік групою

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.З</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум. докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування	<i>Літ..</i>	<i>Арк..</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Скок О. В.</i>					21	82
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>				21		
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр. Н.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В. П.</i>						

компаній «Молочний альянс» складає 19 640,7 тонн. [22]

Таблиця 3.1

Ключові показники для виробничих розрахунків кефіру за рік групою компаній «Молочний альянс»

Вироблено кисломолочної продукції, тонн	Позицій кисломолочної продукції	Позицій кефіру	Відсоток кефіру від кисломолочної продукції	Вироблено кефіру, тонн
104 250	69	13	18,84	19 640,7

3.2. Розрахунок потужності виробництва закваски для кефіру

З даних таблиці 3.1 за рік «Молочний альянс» виробляє 19 640,7 тонн кефіру. В Україні на ринку представлено на основі оцінки онлайн платформи купівлі-продажу Prom представлені 11 виробників заквасок, 2 з яких українські, а 8 іноземних. [23]

Таблиця 3.2

Закваски на вітчизняному ринку

№	Виробник	Країна виробник
1	Vivo	Україна
2	Іпровіт	Україна
3	CHEESE MASTER	Італія
4	Майса	Туреччина
5	Dalton	Італія
6	BIOPROX	Франція
7	Genesis Laboratories	Болгарія
8	IGEА	Італія
9	Chr.Hansen	Данія
10	Danisco	Франція
11	BIOVITEC	Франція

Зважаючи, що в Україні можна знайти лише 2 вітчизняних виробники заквасок, і велика конкуренція з імпортними, то ми плануємо забезпечити закваскою 5 % українських заводів з виробництва кефіру.

$$66 \cdot 5\% = 3 \text{ заводів}$$

Отже, необхідно забезпечити закваскою таку кількість кефіру:

$$G_k = 19\,640,7 \cdot 3 = 58\,922,1 \text{ т/рік.}$$

Кількість закваски, яку використовують для сквашування кефіру, беремо по прикладу закваски для кефіру італійського виробника «Dalton», де потрібно 15 г біомаси закваски на 1000 л молока, але оскільки до закваски входять 6 культур, то розрахунково біомаса *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925 буде 2,5 г. [24] Кількість біомаси для 58 922,1 т кефіру тоді становить:

$$2,5 \text{ г} - 1000 \text{ л} \qquad G_6 = \frac{58\,922\,100 \cdot 2,5}{1000} = 147\,305,25 \text{ г}$$

$$G_6 - 58\,922\,100 \text{ л}$$

Згідно літератури для *Kluuveromyces marxianus* вихід біомаси на середовищі YPD становить 4,5 г/л [10], визначимо загальний об'єм культуральної рідини, необхідний на рік:

$$V_{\text{кр}} = \frac{147\,305,25}{4,5} = 32\,734,5 \text{ л}$$

Щоб отримати бажану кількість цільового продукту, необхідно врахувати 20% втрат під час його виділення. Тому, для досягнення цілі, обсяг культуральної рідини має бути відповідним чином збільшений:

$$V_{\text{кр}} = 32\,734,5 \cdot 1,2 = 39\,281,4 \text{ л} \approx 39 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Беручи до уваги втрати, що виникають при виділенні, 39 м³ культуральної рідини необхідно для покриття річної потреби в заквасці, згідно з п. 3.2.

Для визначення кількості стадій приготування посівного матеріалу, спершу розрахуємо об'єм культуральної рідини за один цикл ферментації. Приймаючи 100 трудоднів, об'єм культуральної рідини за добу становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 37 / 100 = 0,39 \text{ м}^3$$

Обсяг продукту за цикл складатиме:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \cdot 0,39 \cdot 26) / 24 = 0,46 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (18 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1

год), завантаження середовища (1 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Знаючи об'єм культуральної рідини за цикл та коефіцієнт заповнення (K_3), визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 0,46/0,5 = 0,92 \text{ м}^3.$$

За таблицею, ферментер об'ємом $V_{\Phi} = 1 \text{ м}^3$ є найближчим за геометричними характеристиками.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення:

$K_3 = 0,46/1 = 0,46$ – перебуває в допустимих межах.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для одержання біомаси *Kluveromyces marxianus*

Один виробничий цикл дає $0,46 \text{ м}^3$ культуральної рідини (як зазначено в п. 3.3). Під час отримання культуральної рідини слід враховувати її втрати через краплевинос відпрацьованого повітря (E_{Φ}), що становить 10-15%.

Щоб компенсувати 10% втрат, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед початком виробничого біосинтезу слід збільшити відповідним чином:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} \cdot (1 + E_{\Phi}) = 0,46 \cdot 1,1 = 0,506 \text{ м}^3,$$

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

У результаті підрахунку робочий об'єм ферментера становить $0,506 \text{ м}^3$. При коефіцієнті заповнення 0,5, геометричний об'єм ферментера складає:

$V_{\Phi} = 0,506/0,5 = 1,01 \text{ м}^3$. Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер, що становить $V_{\text{ст1}} = 1 \text{ м}^3$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{31} = 0,506/1 = 0,506$. Уточнений коефіцієнт заповнення збігається з діапазоном 0,50 - 0,65, що є оптимальним для аеробних процесів. Це свідчить про те, що геометричний об'єм ферментера правильно вибрано.

Об'єм посівного матеріалу, який вноситься у ферментер, становить 10% від загального об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{\text{роб.1}} = 0,506 \text{ м}^3$ середовища має бути підготовлено

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} \cdot X_{\Phi} = 0,506 \cdot 0,1 = 0,051 \text{ м}^3 = 51 \text{ л посівного матеріалу},$$

де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Таким чином, об'єм поживного середовища у ферментері складе:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 0,506 - 0,051 = 0,455 \text{ м}^3 \approx 0,5 \text{ м}^3,$$

З урахуванням 10% втрат культуральної рідини (51 л інокуляту) через краплевинос в посівному апараті, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу, який потрібно, становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} \cdot (1 + E_{\phi}) = 51 \cdot 1,1 = 56,1 \text{ л}$$

Щоб отримати 56,1 л інокуляту при коефіцієнті заповнення 0,5, об'єм посівного апарату має бути: $V_{\text{па2}} = 56,1/0,5 = 112,2$ л. Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер, що становить $V_{\text{ст2}} = 100$ л.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{з2} = 56,1/100 \approx 0,56$. Уточнений коефіцієнт заповнення збігається з діапазоном 0,50 - 0,65, що є оптимальним для аеробних процесів. Це свідчить про те, що геометричний об'єм ферментера правильно вибрано.

Об'єм посівного матеріалу, який вноситься у посівний апарат, становить 10% від загального об'єму поживного середовища. Тоді, для засіву $V_{\text{роб.2}} = 56,1$ л має бути підготовлено $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} \cdot X_{\phi} = 56,1 \cdot 0,1 = 5,61$ л посівного матеріалу

де $X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Таким чином, об'єм поживного середовища у посівному апараті складе:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 56,1 - 5,61 = 50,49 \text{ л}$$

З урахуванням 10% втрат культуральної рідини (5,61 л інокуляту) через краплевинос в посівному апараті, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу, який потрібно, становить:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} \cdot (1 + E_{\phi}) = 5,61 \cdot 1,1 \approx 6,2 \text{ л}$$

Щоб отримати 6,5 л інокуляту при коефіцієнті заповнення 0,5, об'єм посівного апарату має бути: $V_{\text{па2}} = 6,2/0,5 = 12,4$ л. Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер, що становить $V_{\text{ст3}} = 10$ л.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{з3} = 6,5/10 = 0,62$. Уточнений коефіцієнт заповнення збігається з діапазоном 0,50 - 0,65, що є оптимальним для аеробних процесів. Це свідчить про те, що геометричний об'єм ферментера правильно вибрано.

Об'єм посівного матеріалу, який вноситься у посівний апарат, становить 10% від загального об'єму поживного середовища. Щоб засіяти 6,5 л поживного середовища, потрібно:

$$V_{\text{пмз}} = V_{\text{роб.з}} \cdot X_{\text{ф}} = 6,2 \cdot 0,1 = 0,62 \text{ л} = 620 \text{ мл посівного матеріалу}$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для посівного апарата.

Таким чином, об'єм поживного середовища у посівному апараті складе:

$$V_{\text{псз}} = V_{\text{роб.з}} - V_{\text{пмз}} = 6,2 - 0,62 = 5,58 \text{ л}$$

Для отримання 0,62 л (620 мл) посівного матеріалу ($V_{\text{пмз}}$), який потрібен для інокулятора, використовують культивування дріжджів у качалочних колбах об'ємом 750 мл ($V_{\text{колб}}$) із коефіцієнтом заповнення 0,2 ($K_{\text{зк}}$).

Таким чином, кількість необхідних колб дорівнює:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмз}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 620 / (750 \cdot 0,2) = 4,13 \approx 4 \text{ колб}$$

Результати обчислень дозволяють зробити висновок, що для одержання біомаси *Kluuveromyces marxianus TISTR 5925* потрібно встановити ферментер для біосинтезу об'ємом 1 м³, інокулятори по 100 та 10 л та 4 качалочних колб.

Таблиця 3.3

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{\text{кр}}$, м ³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{\text{роб.з}}$, м ³ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{ст}}$, м ³ (л)
1	2	3	4	5	6	7
IV	0,46	0,506	51	0,455 $\approx 0,5$	0,5	1
III	51 л	56,1 л	5,61	50,49	0,5	100 л
II	5,61 л	6,2 л	620 мл	5,58	0,5	10 л
I	620 мл	620 мл	-	620 мл	0,2	4 колб

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шлях катаболізму глюкози у *Kluyveromyces marxianus*

У поживному середовищі YPD глюкоза слугує головним субстратом для забезпечення росту, яке використовують для культивування *Kluyveromyces marxianus* [10]. У *Kluyveromyces marxianus* відповідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes розщеплення глюкози відбувається за гліколізом[25], що підтверджує ключовий фермент 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11).

У процесі гліколізу у *Kluyveromyces marxianus* є певна специфіка, пов'язана з ферментами. Глюкоза під дією глюкокінази-1 (КФ 2.7.1.1) перетворюється у α -D-глюкозо-6-фосфат.

У результаті дії фруктозо-бісфосфаталядолази (КФ 4.1.2.13) D –фруктозо-1,6-фосфат-2 перетворюється у діоксиацетонфосфат, який через тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) взаємо перетворюється з гліцеральдегід-3-фосфат.

Гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється у гліцерат-1,3-фосфат-2 під впливом гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12).

Гліцерат-3-фосфат за допомогою фосфогліцератмутази-3 (КФ 5.4.2.11) каталізує у гліцерат-2-фосфат.

Останньою реакцією шляху – це перетворення фосфоенолпірувату у піруват за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40). Далі піруват вступає в метаболізм під дією альфа-субодиниці компонента піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1).

Схему катаболізму глюкози за шляхом Ембдена – Мейергофа – Парнаса наведено на рис. 4.1.

					НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ			
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ..	Арк..	Аркушів
Розроб.		Скок О. В.					27	82
Перевір.		Старовойтова С.О.						
Реценз.								27
Н. Контр. Н.								Кафедра БТМ
Затверд.		Стабніков В. П.						

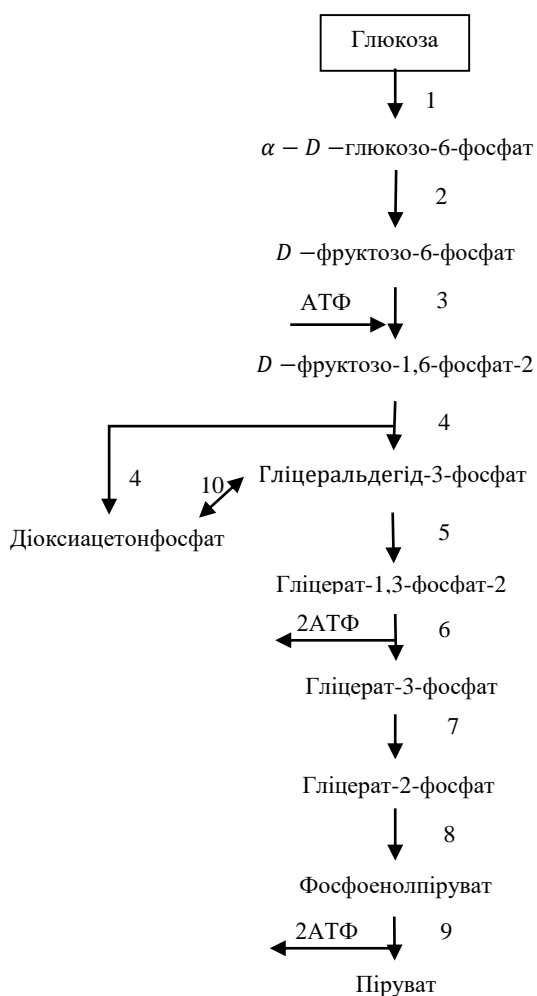


Рис. 4.1. Схема катаболізму глюкози *Kluveromyces marxianus*

Ферменти: 1 – глюкокіназа-1 (КФ 2.7.1.1), 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11), 4 – фруктозо-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13), 5 – гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 6 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 7 – фосфогліцератмутаза-3 (КФ 5.4.2.11), 8 – енолаза (КФ 4.2.1.11), 9 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 10 - тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1)

4.2. Біотрансформація глюкози у біомасу *Kluveromyces marxianus*

Цільовим продуктом у даній роботі є біомаса *Kluveromyces marxianus*. Для формування біомаси мікроорганізму необхідно насинтезувати ключові органічні сполуки: вуглеводи (полісахариди), білки, нуклеїнові кислоти та ліпіди.

Як ростовий субстрат, що забезпечує вуглець та енергію, глюкоза піддається розкладу через процес гліколізу. Піруват, який утворився у кінці шляху, розкладається до ацетил-КоА внаслідок дії двох ферментів (альфа-субодиниці

компонента піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1) та дигідроліпоїлізину (КФ 2.3.1.12)) з проміжними сполуками. Ацетил-КоА під дією цитратсинтази (КФ 2.3.3.1) перетворюється у цитрат, що входить у цикл трикарбонових кислот, який повністю функціонує у *Kluveromyces marxianus*. [26]

У клітинну стінку *Kluveromyces marxianus* входять полісахариди манан і глюкан.[12] Попередником полісахариду манан є глюкоза-6-фосфат, який перетворюється на D-маннозу 6-фосфат за допомогою маннозо-6-фосфат-ізомерази (КФ 5.3.1.8). Фермент фосфоманномутаза (КФ 5.4.2.8) перетворює D-маннозу 6-фосфат у D-маннозу 1-фосфат, який далі під дією манозо-1-фосфат гуанілілтрансферази (КФ 2.7.7.13) перетворюється у ВВП-маннозу, яка далі перетворюється у полісахарид манан. [27]

Полісахарид глюкан утворюється з УДФ - глюкози під дією 1,3-бета-глюкансинтази (КФ 2.4.1.34). Фермент УДФ-глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза (КФ 2.7.7.9) перетворює глюкозу-1-фосфат у УДФ-глюкозу, а глюкоза-1-фосфат утворюється під дією фосфоглюкомутази з глюкозо-6-фосфату. [28]

Щоб повністю забезпечити мікроорганізм у білках, повинні насинтезуватися 20 амінокислот: гістидин, фенілаланін, тирозин, триптофан, серин, гліцин, цистеїн, аланін, валін, лейцин, аспартат, аспаргін, метіонін, треонін, ізолейцин, глутамат, глутамін, аргінін, пролін, лізин. Попередниками гістидину є 5-фосфорибозилпірофосфат; фенілаланіну - еритрозо-4-фосфат, фосфоенолпіруват; тирозину - фенілаланін; триптофану - еритрозо-4-фосфат, фосфоенолпіруват, гліцерат-3-фосфат, 5-фосфорибозилпірофосфат; серину - гліцерат-3-фосфат; гліцину, цистеїну – серин; аспартату – оксалоацетат; метіоніну, аспаргіну, треоніну, ізолейцину, - аспартат; лізину – ацетил – КоА та 2-оксоглутарат. У цій роботі синтез глутаматної родини був детально викладений. Глутамат під дією глутаматсинтази (КФ 1.4.1.14) синтезується з 2-оксоглутарату. З глутамату під дією глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) утворюється глутамін, також з глутамату утворюється глутаміл 5-фосфат за допомогою глутамат-5-кінази (КФ 2.7.2.11), внаслідок впливу глутамат-5-напівальдегіддегідрогенази перетворюється у глутамат 5-напівальдегід. Пролін утворюється за допомогою пірролін-5-карбоксилатредуктази (КФ 1.5.1.2) з 1-пірролін-

5-карбоксилату, який утворюється з глутамат 5-напівальдегіду, з якого також синтезується орнітин за допомогою орнітинамінотрансферази (КФ 2.6.1.13), з якого під дією аргінази (КФ 3.5.3.1) утворюється аргінін. [29,30]

Пуринові та піримідинові нуклеотиди є складовими елементами клітини. У *Kluyveromyces marxianus* нуклеїнові кислоти синтезуються за стандартним шляхом, єдиним виключенням є синтез карбамоїлфосфату під дією карбамоїл-фосфатсинтази (КФ 6.3.5.5) з глутаміну, а не з NH_3 та CO_2 . [31,32]

У *Kluyveromyces marxianus* як представників дріжджів, а отже еукаріот ліпіди представлені у вигляді тригліцеридів. Вони синтезуються з жирних кислот та 3-фосфогліцерину. Бета-субодиниця синтази жирних кислот (КФ 2.3.1.86) — це фермент, який допомагає синтезувати жирні кислоти з ацетил-КоА та малоніл-КоА. З ацетил-КоА за допомогою - ацетил-КоА-карбоксілази (КФ 6.4.1.2) утворюється меланіл-КоА. 3-фосфогліцерин утворюється з діоксиацетонфосфату, який може утворюватися з фруктозо-1,6-дифосфату або з гліцеральдегіду-3-фосфату за допомогою фруктозо-бісфосфатальдолази (КФ 4.1.2.13) і тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) відповідно. [33]

Схему перетворення глюкози на біомасу *Kluyveromyces marxianus* наведено на рис. 4.2.

Ферменти: 1 – глюкокіназа-1 (КФ 2.7.1.1), 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11), 4 – фруктозо-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13), 5 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 6 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 7 – фосфогліцератмутаза-3 (КФ 5.4.2.11), 8 – енолаза (КФ 4.2.1.11), 9 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 10 – альфа-субодиниця компонента піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1), 11 – дигідроліпоїлін (КФ 2.3.1.12), 12 - цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1), 13 - аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3), 14 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42), 15 - Компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.2), 16 - дигідроліпоамідсукцинілтрансфераза (КФ 2.3.1.61), 17 - бета-субодиниця сукциніл-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.4 6.2.1.5), 18 - субодиниця флавопротеїну сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1), 19 – фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2), 20 - малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37) 21 - піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1) 22 - фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49) 23 - фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2), 24 - УДФ-глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза (КФ 2.7.7.9), 25 - 1,3-бета-глюкансинтаза (КФ 2.4.1.34), 26 - маннозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.8), 27 - фосфоманномутаза (КФ 5.4.2.8), 28 - манозо-1-фосфат гуанілілтрансфераза (КФ 2.7.7.13), 29 - ацетил-КоА-карбоксилаза (КФ 6.4.1.2), 30 - бета-субодиниця синтази жирних кислот (КФ 2.3.1.86) 31 - глютаматсинтаза (КФ 1.4.1.14), 32 - глютамінсинтетаза (КФ 6.3.1.2), 33 - глютамат-5-кіназа (КФ 2.7.2.11), 34 - глютамат-5-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.41), 35 - пірролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2), 36 – орнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.13), 37 - аргіназа (КФ 3.5.3.1), 38 - карбамоїл-фосфатсинтаза (КФ 6.3.5.5), 39 - аспартаткарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2), 40 - дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3), 41 - дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.98.1), 42 - оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10), 43 - оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23), 44 - уридилаткіназа (КФ 2.7.4.14), 45 -

нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6), 46 - СТР-синтаза (КФ 6.3.4.2); 47 -
тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1)

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Дріжджі *Kluyveromyces marxianus* є факультативними анаеробними, мезофільними мікроорганізмами, здатними розвиватися в межах рН 3–8.[12,14] Ці дані дають нам зрозуміти, що культивування повинне відбуватися у аеробних умовах за температури 30°C при рН 5 у асептичних умовах, оскільки за цих умов може у середовищі відбутися контамінація мезофільними, нейтрофільними мікроорганізмами. Глибинне культивування у даному випадку має більшу перевагу над твердо-фазовим, оскільки цей метод значно краще забезпечує асептичні умови порівняно з твердофазним. Щоб забезпечити асептичні умови у виробництві, необхідно стерилізувати все обладнання, комунікації, поживне середовище, повітря для аерації та піногасники. Для запобігання контамінації у ферментері слід підтримувати надлишковий тиск за допомогою подачі стерильного аераційного повітря.

Беручи до уваги всі ці фактори, культивування *K. marxianus* здійснюють глибинним способом. *Kluyveromyces marxianus* культивується періодичним способом, оскільки цей метод є найдоцільнішим при культивуванні біомаси *K. marxianus*. Для кращої аерації та розподілу поживного середовища, ми використовуємо мішалку з кількістю обертів за хвилину 200. Також слід врахувати, що під час споживання субстрату може утворюватися етанол, який може спричинити олужнення середовища, для стабілізації рН використовуємо 6 % розчин гідроксиду натрію. Культивування проходить в умовах аерації і помішування, що може спричинити піноутворення. Для усунення піни використовуємо хімічний піногасника – соєву олію. [34]

Для забезпечення необхідної кількості нашої культури *Kluyveromyces marxianus* потрібний ферментер об'ємом 1м³ або, якщо перевести, то на 1000 л. Одним із таких ферментерів є промисловий ферментер BR500Pro-C1 [35], він задовольняє ряд вимог,

					НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ		
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Скок О. В.			Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.				34	82
Реценз.					34		
Н. Контр. Н.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В. П.					

а саме:

1. Ферментер забезпечує сталу температуру культивування завдяки наявності сорочки, системи контролю та датчика температури.
2. Оскільки це глибинне аеробне культивування, то великий ризик утворення піни, а отже у нашого ферментера є механічні піногасники (верхня мішалка) для піногасіння. Також ферментер оснащений датчиком піни.
3. Ферментер має датчик рН, що дозволяє контролювати рівень рН культуральної рідини.
4. Для контролю тиску, який утворюється у ферментері і може негативно впливати на сам пристрій, встановлені манометр і датчик тиску. Також ці пристрої допомагають при створенні надлишкового тиску для покращення аерації.
5. Для очищення в середині ферментера застосовуються кульки-розпилювачі (CIP Spray Ball), які забезпечують швидке і якісне миття.
6. Для візуального спостереження за культивуванням ферментер оснащений оглядовим склом.
7. Для контролю кисню використовується датчик рО₂.
8. Для безпечного відбору проб для перевірки ферментер оснащений портом відбору проб.
9. Для аерації та рівномірного розподілу культуральної рідини передбачені системи перемішування.
10. Для контролю швидкості мішалки є ручне/автоматичне регулювання швидкості в залежності від кількості розчиненого кисню.
11. Для відведення газів з конденсатором, для відведення відходів, для подачі стерильного повітря, пари і іншого є всі відповідні трубопроводи.
12. Перемішування здійснюється з регульованою кількістю обертів перемішуючого пристрою 200 об/хв.

5.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря для одержання біомаси *Kluyveromyces marxianus*

K. marxianus TISTR 5925 є факультативним анаеробом. Для отримання найкращого виходу біомаси потрібно підтримувати аеробні умови, оскільки при

анаеробних умовах дріжджі почнуть утворювати етанол, що сповільнить процес отримання необхідної кількості біомаси. Таким чином для процесу культивування нам необхідне стерильне повітря.

При першій стадії культивування при посіві культури у колби цей процес відбувається у боксах, де стерильність повітря досягається використанням УФ-опроміненням, яке має протимікробну дію.

Підготовка повітря для подання у біореактори відбувається в такому порядку:

- Забір атмосферного повітря здійснюється повітрозбірником, який на 2...3 м вище даху виробничого приміщення, враховуючи, що кратність одного виробничого поверху дорівнює 6 м, то забір повітря здійснюється на висоті 9 м.

- Щоб захистити наступні стадії від забруднення механічними домішками, повітря пропускають через фільтр грубої очистки. Як фільтрувальні матеріали тут можуть використовуватися: сітки, кільця Рашига змочені оливою, грубі мінеральні або синтетичні волокна.

- Щоб подолати далі опір фільтрувальних матеріалів та гідравлічний опір, потрібно підвищити тиск у системі. Це відбувається за допомогою компресора, але при стисненні повітря відбувається його нагрівання до 120...250°C.

- Оскільки у повітрі залишилася зайва волога, вона негативно вплине на фільтрацію повітря через фільтри, тому його охолоджують за допомогою водяного теплообмінника до «точки роси», щоб її виділити.

- Видалення конденсату з попередньої стадії відбувається за допомогою ресивера, а також ресивер вирівнює тиск і забезпечує рівномірну подачу повітря на фільтр.

- Щоб забезпечити необхідну температуру повітря 45...50°C використовують підігрів парою за допомогою теплообмінника.

- Щоб видалити до 98% мікроорганізмів, а також видалити часточки, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки і компресора, використовують головні фільтри, розташовують поруч із ферментаційними відділеннями. Як правило, фільтруючим елементом у таких фільтрах є багат шарова структура, утворена активованим вугіллям, яке оточене шаром скловати.

○ Щоб унеможливити потрапляння у ферментер мікроорганізмів або іншого забруднення, використовують індивідуальні фільтри із затримуючою здатністю 99,99%, які встановлюють безпосередньо перед ферментом. Фільтруючим матеріалом для даних фільтрів є тонка скловата, базальтове тонке або супертонке волокно.[34]

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Біомасу *Kluveromyces marxianus* отримують як компонент для закваски кефіру, а отже стерильність на підприємстві повинна бути як для харчового виробництва і в більшості своїй для молочного виробництва. Основна система, якій підпорядковується підприємство, – це система HACCP, а безпосередньо – стандарту ДСТУ ISO 22000:2019 «Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-якої організації в харчовому ланцюзі (ISO 22000:2018, IDT)». Відповідно до стандарту ДСТУ ISO 22000:2019 є стандарт ДСТУ ISO/TS 22002-1:2019 "Програми-передумови безпечності харчових продуктів. Частина 1. Виробництво харчових продуктів" (ISO/TS 22002-1:2009, IDT), де прописані детальні вимоги до гігієни персоналу, очищення та санітарної обробки, а також до очищення та обслуговування обладнання.[36]

Опрацювавши літературу щодо мийних та дезінфекційних засобів, які використовуються на харчових виробництвах, було обрано використовувати дезінфікуючі засоби, в складі яких є пероксид водню або активний хлор. [37,38] Позитивними сторонами препаратів з пероксидом водню є широкий спектр антимікробної дії, він не викликає корозію поверхонь, які використовуються на виробництві. [38]

Зважаючи на отриману інформацію, пропонується впровадити наведені далі мийні та дезінфікуючі засоби.

Засіб дезінфекційний «ОКСІН® КД 103» («OXIN® KD 103») з діючою речовиною: пероксидом водню – 30,0-35,0%. Даний засіб дозволено використовувати на харчових підприємствах, а саме – на підприємствах молочної промисловості, м'ясопереробних підприємствах, пивоварнях та виноробних заводах, фермерських

господарствах, промислових кухнях та супермаркетах. Використовується для очищення та санітарної обробки обладнання, ємностей, трубопроводів та поверхонь, але потрібно дотримуватися правильного дозування, щоб не викликати корозії обладнання. Одним з плюсів цього засобу, крім дезінфікуючої дії, є запобігання розвитку бактеріальних колоній та біоплівки. Також він сумісний із СІР-мийкою та пінною очисткою. При використанні концентрату потрібно використовувати захисне спорядження у вигляді рукавичок та окулярів і запобігати контакту з алюмінієвими та м'якими металами. [39,40]

Засіб дезінфікуючий "Бланіда-С Гіпохлорит" (Blanidas-C Hypochlorite)", має як діючу речовину гіпохлорит натрію не менше 10,0 % за активним хлором (10-20%). Даний засіб дозволено використовувати на підприємствах харчової та харчопереробної промисловості, агропромислового комплексу, в цей спектр використання також попадає молочне виробництво. Використовують для підтримання санітарних норм і загальної дезінфекції технологічного обладнання, комунікацій, апаратури, інвентарю та приміщень. При правильному використанні не пошкоджують поверхні. Може використовуватися для СІР/ОРС обладнання, але він не пінний засіб. [40,41]

Універсальний мийний засіб «ДНАКЛІН» з антибактеріальною дією призначений для миття та очищення поверхонь з діючою речовиною 2-феноксіетанол – 2,0%. Цей засіб широко застосовується на підприємствах харчової, переробної, агропромислової, мікробіологічної, фармацевтичної та парфумерно-косметичної галузей. Він має потужну антимікробну дію проти грампозитивних та грамнегативних бактерій, є віруліцидним та фунгіцидним, а також володіє вираженими мийними властивостями. Засіб не має сенсibiliзуючих, канцерогенних, мутагенних, ембріотоксичних, тератогенних та інших віддалених негативних властивостей. [42]

Засіб дезінфекційний "ITS WATER DEZ-373-E" з активною речовиною - спирт етиловий - 65,0 - 80,0%. Цей засіб призначений для гігієнічної дезінфекції рук. Його можна використовувати для знезараження та деконтамінації шкіри рук персоналу, а також для обробки невеликих пошкоджень шкіри. Він ефективний проти

грамнегативних та грампозитивних бактерій, при цьому не подразнює і не сушить шкіру. [43]

Узагальнююча таблиця характеристики мийно-дезінфікувальних засобів

Таблиця 5.1

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
ОКСІН® КД 103 (виробник ТОВ «Українські Хімічні Технології ЛТД»)	Пероксид водню – 30,0-35,0%	Бактерії, спори, віруси гриби	Цей дезінфікуючий кислотний мийний засіб швидко очищає та дезінфікує обладнання, трубопроводи й поверхні. Він ефективно перешкоджає формуванню бактеріальних колоній та біоплівки, а також легко змивається водою.	Він безпечний для нержавіючої сталі та кислотостійких матеріалів, а також не шкодить обладнанню за умови правильного дозування.	1. СІР-мийка з концентрацією 0,5–2%, з умов t=20–60°C, τ=10–30 хв 2. Ручне миття та замочування з концентрацією 0,5–2%, τ=10-20 хв	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №305. Дата внесення: 28.04.2020 року. Термін дії до: 28.04.2025 року	22 кг – 1 947 грн	[39,40]
Бланідас-Ц Гіпохлорит (виробник ТОВ «БЛАНІДАС»)	Гіпохлорит натрію – не менше 10,0 % за активним хлором (10-20%)	Бактерії, спори, віруси гриби	Це ефективний засіб для санітарної обробки з вираженим антибактеріальним ефектом і м'якими властивостями.	Препарат не пошкоджує поверхні з бетону, керамічної плитки нержавіючої сталі, якщо його використовувати правильно.	Для загальної дезінфекції концентрація 0,1–3%, t = 20°C, τ = 10 хв.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2023 року за №1. Дата внесення: 14.08.2024 року. Термін дії до: 14.08.2029 року	20 кг – 2 450 грн	[41]
ДАНАКЛІН (виробник ТОВ «ДАНА МЕДІКАЛ»)	2-феноксістанол - 2.0%±0.05; катіоактивні ПАВ, неіоногенні ПАВ - до 5,0% халатний комплекс, антикорозійний комплекс, Рн регулятор, інші функціональні добавки, вода демінералізована (очищена) до 100,0%	Бактерії, спори, віруси гриби	"ДАНАКЛІН" універсальний має відмінні м'які, дезодоруючі та змочувальні властивості. Вони ефективно усувають неприємні запахи, а також видаляють механічні та інші забруднення. Засіб є негорючим, пожежо- та вибухобезпечним.	Не шкодять виробам та поверхням з різних матеріалів.	Для миття та дезінфекції концентрація 1%, τ = 30 хв.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №1042. Дата внесення: 06.10.2020 року. Термін дії до: 06.10.2025 року	5 л – 1 374 грн	[42]
ITS WATER DEZ-373-E (виробник ТДВ «Пологівський хімічний завод «Коагулянт»)	Діюча речовина - етилового спирту (65,0%-80,0%)	Бактерії, спори, віруси гриби	Засіб для гігієнічної дезінфекції рук без потреби змивання.	Засіб не подразнює та не сушить шкіру.	Невелику кількість засобу нанести на руки і поверхню, повністю зволожити і дати висохнути. Норма витрати для рук становить: 1,5-3,0 мл на одну людину.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів 2020 року за №345. Дата внесення: 08.05.2020 року. Термін дії до: 08.05.2025 року	5 л – 800 грн	[43]

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва біомаси *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925 як компонента закваски для отримання кефіру

Виробництво біомаси *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925 як компонента закваски для отримання кефіру здійснюється упродовж 100 днів і включає підготовку наступного обладнання: виробничий ферментер об'ємом 1000 л, інокулятори об'ємом 10 та 100 л, реактори-змішувачі для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища та піногасника, качалки, а також бокси та лабораторне устаткування.

Виробництво здійснюється в наступних приміщеннях: цех виробничого біосинтезу, біля якого розташоване лабораторне приміщення, яке оснащено всім необхідним для різних операцій: автоклавами, боксом, термостатами, холодильниками та апаратурою для здійснення контролю.

Рисунок 5.1 демонструє орієнтовний план приміщення, призначеного для виробництва біомаси *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925. Цей план розроблений з урахуванням діаметрів обладнання та передбачає мінімальні необхідні відстані: щонайменше 1 метр між апаратами та 1,5 метра від стін.

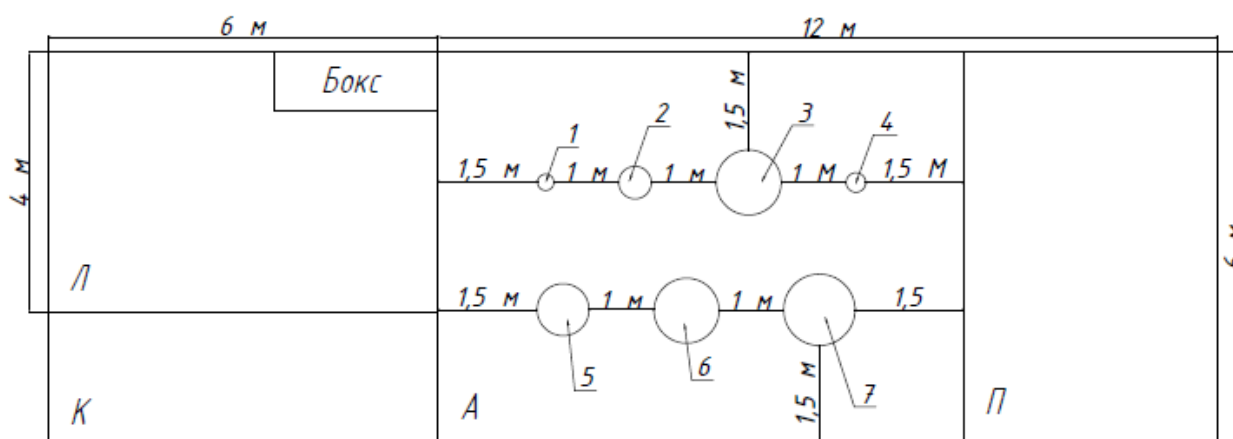


Рис. 5.1. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва біомаси *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925. (А – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту (1 – реактор-змішувач (P-9) для приготування композиції А об'ємом 10 л, 2 – реактор-змішувач (P-13) для приготування композиції А об'ємом

100 л, 3 – реактор-змішувач (Р-17) для приготування композиції А об’ємом 1000 л, 4 – реактор-змішувач (Р-18) для приготування піногасника об’ємом 20 л; 5 – інокулятор (І-11) об’ємом 10 л, 6 - інокулятор (І-15) об’ємом 100 л, 7 – виробничий ферментер (ФР-22) об’ємом 1000 л, Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками, П – підсобне приміщення).

Габаритні розміри основного обладнання наведено у *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва біомаси

Kluyveromyces marxianus TISTR 5925

Обладнання	Геометричний об’єм, л	Діаметр, м	Висота, м	Джерела
реактор-змішувач (Р-9) для приготування композиції А об’ємом 10 л	10	0,25	0,375	1
– реактор-змішувач (Р-13) для приготування композиції А об’ємом 100 л	100	0,5	0,75	1
реактор-змішувач (Р-17) для приготування композиції А об’ємом 1000 л	1000	1	2,1	2
інокулятор (І-11) об’ємом 10 л	10	0,8	1,8	3
інокулятор (І-15) об’ємом 100 л	100	1	2,6	4
виробничий ферментер (ФР-22) об’ємом 1000 л	1000	1,1	3,2	1
реактор-змішувач (Р-18) для приготування піногасника об’ємом 20 л	20	0,3	0,45	1
Всього	2240			

1. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022.

2. <https://lenotank.en.made-in-china.com/product/bZjQJWDdkIhS/China-High-Shear-Industrial-Stainless-Steel-Mixer-1000-Litre-Chemical-Mixing-Tank.html>

3. <https://files.lab1st.com/documents/BR500-M1-10L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>

4. <https://eshop.lab1st.com/products/100l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-fermentation-with-2-gas-inlets-br500-m1?srsId=AfmBOok6NmR2o3hbgs3V9BF7usc0tFTzet17-e38yEvwQk3Xm5qonp8>

Відповідно до даних таблиці 5.2, сукупний об’єм реакторів-змішувачів та апаратів, призначених для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу, складає 2,240 м³.

Для підтримання чистоти у виробничих приміщеннях підлога миється щодня, що дорівнює 100 миттям за розрахунковий період. Генеральне прибирання (яке охоплює стіни, підлогу, вікна тощо) проводиться раз на місяць, інакше кажучи, орієнтовно 4 рази на 100 днів. Для визначення необхідної кількості мийних засобів, потрібно розрахувати загальну площу обробки, яка включає площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на відповідну висоту. Враховуючи, що піногасник до ферментера подається самоплином, то слід врахувати, що деяке обладнання знаходиться над ним. За апаратною схемою ми знаємо що над ферментом на висоті 3 м встановлено: реактор-змішувач (Р-18) для приготування піногасника об'ємом 20 л.

У цеху виробничого біосинтезу площа підлоги дорівнює 72 м^2 (12×6 м), тоді як площа стін – $[(12 \times 2,5) + (6 \times 2,5)] \times 2 = 90 \text{ м}^2$, загальна площа – $72 + 90 = 162 \text{ м}^2$. Загальну площу поверхні, що обробляється мийними засобами, наведено в таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м^2	Площа стін, м^2	Загальна площа, м^2
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	72	90	162
Мікробіологічна лабораторія	24	50	74
Приміщення з качалками	12	40	52
Загальна площа	108	180	288

Виробництво біомаси передбачає 85 циклів. Оскільки обладнання миється перед кожним, загалом миття проводиться 86 разів (включно з прибиранням після останнього циклу). Таким чином, загальний об'єм миття складе:

$$2,240 \times 86 = 192,64 \text{ м}^3$$

Зведені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва представлені в таблиці 5.4.

Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період виробництва біомаси *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	2,240	86	192,64
Підлога	108	100	10 800
Стіни, двері, вікна	180	4	720

Для миття ємнісного обладнання використовується СІР-мийки. Витрати робочого розчину для миття обладнання дорівнюють 20-30% від його об'єму. Візьмемо середнє значення — 25%. Отже, для миття 192,64 м³ обладнання потрібно витратити:

$$192,64 \times 0,25 = 48,16 \text{ м}^3 \text{ засобу в рік}$$

Дані про вибір мийних та дезінфікуючих засобів відображені в узагальнюючій таблиці 5.5. При їх виборі враховуються ефективність, вартість, а також витрати для обробки необхідної площі чи об'єму. Зазвичай, для обробки 1 м² поверхні потрібно 100 мл розчину мийного або дезінфікуючого засобу.

**Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва біомаси
*Kluyveromyces marxianus***

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
ОКСІН® КД 103	Поверхні обладнання, приміщень	1	204 160	20 416	88,5	0,89	18 170,24
Бланідас-Ц Гіпохлорит	Поверхні обладнання, приміщень	0,2	204 160	20 416	122,5	0,25	5 104
ДАНАКЛІН	Обладнання	1	192 640	48 160	274,8	2,75	132 440

Враховуючи дані розрахунку у *табл. 5.5* серед усіх розглянутих засобів найкращим вибором для миття обладнання – «ДАНАКЛІН», а для поверхонь та підлоги – «Бланідас-Ц Гіпохлорит», оскільки їхня вартість є низькою протягом усього виробничого біосинтезу (100 днів), що є одним з головних показників на виробництві, а також вони дуже дієві при застосуванні.

Також слід зауважити, що для запобігання появи стійких до дезінфікуючих засобів форм мікроорганізмів періодично необхідно проводити їх заміну згідно графіка чергування дезінфікуючих та миюче-дезінфікуючих засобів, зазвичай рекомендується чергувати кожні 1-3 місяці. Тому як заміник «Бланідас-Ц Гіпохлорит» для поверхонь обладнання та приміщень можна використати «ОКСІН® КД 103», цей засіб займає друге місце по вартості та нічим не відрізняється від попередників своєю ефективністю при застосуванні.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання біомаси *Kluyveromyces marxianus*

За розрахунками розділу 1 під час одержання біомаси *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925 у виробничому біосинтезі застосовується ферментер на 1 м³, що містить 0,455 ≈ 0,5 поживного середовища. Процес отримання інокуляту складається з трьох стадій: у колбах на качалці, в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л.

Для одержання біомаси *K. marxianus* TISTR 5925 використовується середовище наступного складу (г/л) [10]:

- пептону – 20
- дріжджового екстракту – 10
- глюкози – 20
- рН середовища 5.

Стерилізація поживного середовища здійснюється так: для вирощування в колбах використовують автоклав, а для вирощування в інокуляторах та виробничого біосинтезу – реактори. Дані, що наведені у *табл. 5.6* показують, скільки титрувальних агентів та піногасника потрібно на період виробництва біомаси, та їх особливості приготування.

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних розчинів та піногасника

Об'єм середовища, л	15% NaOH		15% HCl		Піногасник	
	Вміст, мл	Особливість приготування	Вміст, мл	Особливість приготування	Вміст, л	Особливість приготування
0,62	-	-	-	-	-	-
6,2	6,2	У колбі на 10 мл	6,2	У колбі на 10 мл	0,124	У колбі на 150 мл
56,1	56,1	У колбі на 100 мл	56,1	У колбі на 100 мл	1,122	У колбі на 2 л
506	506	у колбі на 1 л	506	у колбі на 1 л	10,12	У реакторі на 15 л

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Враховуючи, що об'єм поживного середовища невеликий (620 мл), стерилізація здійснюється в автоклаві. Вивчаючи склад поживного середовища для вирощування *Kluveromyces marxianus* TISTR 5925, його умовно поділяють на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: пептон, глюкоза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Компоненти композиції А термолабільні і потребують м'яких умов стерилізації.

Необхідну кількість компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках розраховано і наведено в таблиці 5.7.

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,62 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	12,4	А	0,62
Дріжджовий екстракт	10	6,2		
Пептон	20	12,4		
Вода		620 (мл)		
Усього				0,62

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

На цьому етапі потрібно 5,58 л поживного середовища, умови стерилізації та склад композицій аналогічні до минулої стадії. Стерилізація композиції А відбувається в реакторі.

Таблиця 5.8 містить розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища, призначеного для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,58 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	111,6	А	5,022
Дріжджовий екстракт	10	55,8		
Пептон	20	111,6		
Вода		5,022 (л)		
Конденсат		0,558 (л)		
Усього				5,58

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

На цьому етапі потрібно 50,49 л поживного середовища, умови стерилізації та склад композицій аналогічні до минулих стадій. Стерилізація композиції А відбувається в реакторі.

Таблиця 5.9 містить розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища, призначеного для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 50,49 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	1009,8	А	45,441
Дріжджовий екстракт	10	504,9		
Пептон	20	1009,8		
Вода		45,441 (л)		
Конденсат		5,049 (л)		
Усього				50,49

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³

На цьому етапі потрібно 0,5 м³ поживного середовища, умови стерилізації та склад композицій аналогічні до минулих стадій. Стерилізація композиції А відбувається в реакторі.

Таблиця 5.10 містить розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища, призначеного для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³.

Таблиця 5.10

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,5 м ³ середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	20 000	А	450
Дріжджовий екстракт	10	5 000		
Пептон	20	10 000		
Вода		450 (л)		
Конденсат		50 (л)		
Усього				500

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Під час культивування рН підтримують на рівні 6,0, але оскільки у результаті біосинтезу *Kluveromyces marxianus* TISTR 5925 може перетворювати глюкозу у етанол, у якого рН 7,33, це буде олузнювати середовище і для його стабілізації потрібно буде використовувати титранти, HCl для нейтралізації етанолу і NaOH для повернення рН до норми в разі використання більшої дози HCl. [44,45]

Поживне середовище складається з глюкози, пептону та дріжджового екстракту, які сприяють піноутворенню, а також постійна аерація створює умови, за яких необхідні піногасники. Механічний піногасник хоч і економічно вигідніший за хімічний, але зважаючи на всі фактори, його буде замало для повноцінного піногасіння, в такому разі ми будемо використовувати як піногасник – соєву олію. Для цього піногасника не потрібна додаткова підготовка, але потрібна стерилізація при 112°C 30 хв. [34]

Окрім стадій підготовки поживного середовища, технологічна схема охоплює такі чотири додаткові стадії:

- підготовка аераційного повітря;
- приготування та стерилізація 15% розчину NaOH для стабілізації рН середовища в посівному апараті об'ємом 10, 100 л та ферментері 1 м³;
- приготування та стерилізація 15% розчину HCl для стабілізації рН середовища в посівному апараті об'ємом 10, 100 л та ферментері 1 м³;
- стерилізація піногасника у реакторі об'ємом 15 л.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник великий одинарний 857x373x100 («Stienen»). Продуктивність: 1500 м ³ /год; габаритні розміри, мм: 650x275x100 [46].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр Maico G4 507x166x50 мм (Jablotron) Фільтруючий елемент – поліестер або пінополіуретан, E = 80%; габаритні розміри, мм: 507x166x50 [47].
К-3	Компресор	1	Компресор Tight 60 Продуктивність: 60 м ³ /год; Споживання: 11 кВт; габаритні розміри, мм: 1100x750x870 [48].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Водяний каналний охолоджувач Вентс ОКВ 400x200-3 («Vents»). Максимальний робочий тиск: 1,5 МПа; габаритні розміри, мм: 470x425x295 [49].
РС-5	Ресивер	1	Повітрозбірник, ресивер для стисненого повітря 2000 л, 2,0 м ³ Об'єм, л: 2000; максимальний тиск: 10 бар; [50].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач НКВ 100x2 («Vents»). Максимальний робочий тиск: 1,6 МПа; габаритні розміри, мм: 350x230x300 [51].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Вугільний фільтр Maico M5 (WSF-AKF 320/470) (Maico) E = 90%; [52].
Ф-8 Ф-13 Ф-18	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр Maico F7 (WSF 320/470) (Maico) E = 99,99%; габаритні розміри, мм: 330x275x45 [53].
ОВ-9 ОВ-14	Об'ємно ваговий дозатор	2	Ваги фасувальні ICS-6AW (ІКС-МАРКЕТ) Мінімальна межа дозування – 0,02 кг, максимальна – 6 кг; дискретність 1 г — 2 г; габаритні розміри, мм: 250 x 300 x 110 [54].
Р-10	Реактор	1	Реактор Bsf -10 l. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з швидкістю перемішування: 0-600 об/хв; [55]

					НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ			
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Скок О. В.			РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ..	Арк..	Архувів
Перевір.		Старовойтова С.О.					51	82
Реценз.						51		
Н. Контр. Н.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В. П.						

Н-11 Н-16	Насос мембранний	2	Пневматичний мембранний насос SEKO DUOTEK AF000007PNTTPT1 (SEKO S.P.A.). Максимальний робочий тиск: 6 бар; продуктивність: 8 л/хв [56].
I-12	Інокулятор	1	Біореактор BR500-M1 об'ємом 10л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою, мішалкою з регульованою швидкістю перемішування (від 50 до 1000 об/хв), а також датчиками для вимірювання рН, рО ₂ , піни, температури та манометром; габаритні розміри, мм: 800×1800×800 [57].
P-15	Реактор	1	Реактор Bsf -100 l. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з швидкістю перемішування: 0-600 об/хв; [55]
I-17	Інокулятор	1	Біореактор BR500-M1 об'ємом 100л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою, мішалкою з регульованою швидкістю перемішування (від 50 до 1000 об/хв), а також датчиками для вимірювання рН, рО ₂ , піни, температури та манометром; габаритні розміри, мм: 1000×2600×1000 [58].
ОВ-19	Об'ємно ваговий дозатор	1	Ваги Прок ВТ-60 (Прок) Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; дискретність 5 г; габаритні розміри, мм: 340×300 [59].
P-20	Реактор	1	Промисловий змішувач з ємністю для змішування на 1000 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; обладнаний сорочкою та мішалкою з регульованою швидкістю перемішування 63 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт [60]
Н-21	Насос мембранний	1	Мембранний насос VP05-PP Матеріал корпусу: поліпропілен; максимальний робочий тиск: 7 бар; продуктивність: 55 л/хв; габаритні розміри, мм: 340×210×262 [61].
P-22	Реактор	1	Реактор Bsf -20 l. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з швидкістю перемішування: 0-600 об/хв; [55]
ФР-23	Ферментер	1	Біореактор BR500-M1 об'ємом 1000 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою, мішалкою з регульованою швидкістю перемішування (від 50 до 1000 об/хв), а також датчиками для вимірювання рН, рО ₂ , піни, температури та манометром [35].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема для отримання біомаси *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925 складається як із допоміжних робіт – приготування та стерилізація титрувального агента та піногасника, підготовка та стерилізація аераційного повітря, приготування і стерилізація поживних середовищ, так із основних стадій – підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

ДР 1. Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Повітрозабірник (ПЗ-1) виконує функцію забору атмосферного повітря, на висоті 9 м, що на 3 м вище даху виробничого приміщення.

ДР 1.2. Очищення повітря через фільтр грубої очистки

Повітря зібране повітрозбірником (ДР 1.1) пропускають через фільтр грубої очистки (Ф-2) із затримуючою здатністю 80%, який видаляє механічні домішки.

ДР 1.3. Компресування повітря

Повітря, яке попередньо очистили (ДР 1.2), у компресорі (К-3) стискають до тиску 0,35 МПа, у той же час відбувається нагрівання повітря до 120...250°C.

ДР 1.4. Вирівнювання тиску, забезпечення рівномірної подачі повітря та відокремлення надлишкової вологи

Шляхом застосування теплообмінника (Т-4) зменшують температуру повітря до 25-30°C, яке після компресування (ДР 1.3) осушується, щоб не було зайвої вологи, яке далі надходить на ресивер (РС-5), де вирівнюють тиск і забезпечують рівномірну подачу повітря на фільтр (ДР 1.5), яке завдяки теплообміннику (Т-6) підтримує сталу температуру.

ДР 1.5. Очищення повітря через головний фільтр

Повітря після видалення вологи (ДР 1.4) пропускають через головний фільтр (Ф-7) із затримуючою здатністю 90%, який видаляє часточки, що потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки і компресора.

					НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ			
<i>Змн.З</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум. докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Скоп О. В.</i>			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	<i>Літ..</i>	<i>Арк..</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>					53	82
<i>Реценз.</i>						53		
<i>Н. Контр. Н.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В. П.</i>						

ДР 1.6 Очищення повітря через індивідуальні фільтри

Повітря після головного фільтра (ДР 1.5) пропускають через індивідуальні фільтри (Ф-8, Ф-13, Ф-18) із затримуючою здатністю 99,99%, які видаляють забруднення, що були пропущені іншими фільтрами, а також всі інші забруднення, які потрапили в систему з випадкових причин.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувального агента та піногасника

ДР 2.1. Приготування і стерилізація титрувального агента та піногасника для інокулятора об'ємом 10 л

ДР 2.1.1. Приготування і стерилізація 15% NaOH

Для корекції рН до оптимального (рН 6) у ферментері 10 л потрібно 6,2 мл 15% NaOH. Для приготування 6,2 мл 15% NaOH необхідно 0,93 г NaOH і 5,27 мл дистильованої води.

0,93 г NaOH зважують на технічних терезах, після чого поміщають у пробірку об'ємом 10 мл, відміряють мікробіологічною піпеткою на 10 мл – 5,27 мл води дистильованої і наливають у колбу, перемішують, герметично закривають ватно-марлевым корком та піддають стерилізації в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 2.1.2. Приготування 15% HCl

Для корекції рН до оптимального (рН 6) у ферментері 10 л потрібно 6,2 мл 15% HCl. Для приготування 6,2 мл 15% HCl необхідно 2,58 мл 36% HCl і 3,62 мл простерилізованої води.

У асептичних умовах відміряють стерильною мікробіологічною піпеткою на 5 мл – 3,62 мл води простерилізованої і наливають у пробірку об'ємом 10 мл, відміряють мікробіологічною піпеткою на 5 мл - 2,58 мл 36% HCl і наливають у колбу, перемішують, закупорюють ватно-марлевым корком.

ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація піногасника

Для повноцінного гасіння піни у ферментері 10 л потрібно 0,124 л піногасника.

124 мл піногасника відміряють мірним циліндром на 200 мл і наливають у колбу об'ємом 200 мл, герметично закривають ватно-марлевым корком та піддають стерилізації в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 2.2. Приготування і стерилізація титрувального агента та піногасника для інокулятора об'ємом 100 л

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 15% NaOH

Для корекції рН до оптимального (рН 6) у ферментері 100 л потрібно 56,1 мл 15% NaOH. Для приготування 56,1 мл 15% NaOH необхідно 8,415 г NaOH і 47,685 мл дистильованої води.

8,415 г NaOH зважують на технічних терезах, після чого поміщають у пробірку об'ємом 100 мл, відміряють мірним циліндром на 50 мл – 47,685 мл води дистильованої і наливають у колбу, перемішують, герметично закривають ватно-марлевим корком та піддають стерилізації в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 2.2.2. Приготування 15% HCl

Для корекції рН до оптимального (рН 6) у ферментері 100 л потрібно 56,1 мл 15% HCl. Для приготування 56,1 мл 15% HCl необхідно 23,375 мл 36% HCl і 32,725 мл простерилізованої води.

У асептичних умовах відміряють мірним циліндром на 50 мл – 32,725 мл води простерилізованої і наливають у колбу об'ємом 100 мл, визначають об'єм мірним циліндром на 50 мл – 23,375 мл 36% HCl і наливають у колбу, перемішують, закупорюють ватно-марлевим корком.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація піногасника

Для повноцінного гасіння піни у ферментері 100 л потрібно 1,122 л піногасника.

1,122 л піногасника відміряють мірним циліндром на 2 л і наливають у колбу об'ємом 2 л, герметично закривають ватно-марлевим корком та піддають стерилізації в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 2.3. Приготування і стерилізація титрувального агента та піногасника для ферментера об'ємом 1000 л

ДР 2.3.1. Приготування і стерилізація 15% NaOH

Для корекції рН до оптимального (рН 6) у ферментері 1000 л потрібно 506 мл 15% NaOH. Для приготування 506 мл 15% NaOH необхідно 75,9 г NaOH і 430,1 мл дистильованої води.

75,9 г NaOH зважують на технічних терезах, після чого поміщають у пробірку об'ємом 1 л, відміряють мірним циліндром на 500 мл - 430,1 мл води дистильованої і наливають у колбу, перемішують, герметично закривають ватно-марлевым корком та піддають стерилізації в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 2.3.2. Приготування 15% HCl

Для корекції рН до оптимального (рН 6) у ферментері 1000 л потрібно 506 мл 15% HCl. Для приготування 506 мл 15% HCl необхідно 210,83 мл 36% HCl і 295,17 мл простерилізованої води.

У асептичних умовах відміряють мірним циліндром на 500 мл – 295,17 мл води простерилізованої і наливають у колбу об'ємом 1 л, відміряють мірним циліндром на 500 мл - 210,83 мл 36% HCl і наливають у колбу, перемішують, закупорюють ватно-марлевым корком.

ДР 2.3.3. Приготування і стерилізація піногасника

Для повноцінного гасіння піни у ферментері 1000 л потрібно 10,12 л піногасника.

Відміряють 10,12 л піногасника за лічильником у реактор-змішувач (Р-22), закривають реактор, вмикають перемішуючий пристрій і стерилізують при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для колб

Таблиця 7.1 містить розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища, призначеного для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,62 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	12,4	А	0,62
Дріжджовий екстракт	10	6,2		
Пептон	20	12,4		
Вода		620 (мл)		
Усього				0,62

6,2 г дріжджового екстракту, 12,4 г глюкози і 12,4 г пептону зважують на технічних терезах та вносять у колбу об'ємом 1 л, відміряють мірним циліндром на 1 л - 620 мл води питної і наливають у колбу, перемішують, герметично закривають ватно-марлевим корком та піддають стерилізації в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 10 л

У таблиці 7.2 представлено розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища, призначеного для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 10 л.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,58 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	111,6	А	5,022
Дріжджовий екстракт	10	55,8		
Пептон	20	111,6		
Вода		5,022 (л)		
Конденсат		0,558 (л)		
Усього				5,58

55,8 г дріжджового екстракту, 111,6 г глюкози і 111,6 г пептону зважують на технічних терезах (ОВ-9) та вносять у реактор-змішувач (Р-10), відміряють 5,022 л

води водопровідної за лічильником у реактор-змішувач, закривають реактор, вмикають перемішувач і стерилізують композицію А при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

Після стерилізації композицію А через насос (Н-11) передають у інокулятор (І-12)

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 100 л

Таблиця 7.3 містить розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища, призначеного для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 100 л.

Таблиця 7.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 50,49 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	1009,8	А	45,441
Дріжджовий екстракт	10	504,9		
Пептон	20	1009,8		
Вода		45,441 (л)		
Конденсат		5,049 (л)		
Усього				50,49

504,9 г дріжджового екстракту, 1009,8 г глюкози і 1009,8 г пептону зважують на технічних терезах (ОВ-14) та вносять у реактор-змішувач (Р-15), відміряють 45,441 л води водопровідної за лічильником у реактор-змішувач, закривають реактор, вмикають перемішувач і стерилізують композицію А при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

Після стерилізації композицію А через насос (Н-16) передають у інокулятор (І-17),

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л

У таблиці 7.4 представлено розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища, призначеного для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л.

Таблиця 7.4

Композиції стерилізації компонентів для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 0,5 м ³ середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	20	10 000	А	450
Дріжджовий екстракт	10	5 000		
Пептон	20	10 000		
Вода		450 (л)		
Конденсат		50 (л)		
Усього				500

5 000 г дріжджового екстракту, 10 000 г глюкози і 10 000 г пептону зважують на технічних терезах (ОВ-19) та вносять у реактор-змішувач (Р-20), відміряють 450 л води водопровідної за лічильником у реактор-змішувач, закривають реактор, включають пристрій для перемішування і стерилізують композицію А при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

Після перемішування композицію А через насос (Н-21) передають у ферментер (ФР-23),

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Зберігають колекційну культуру *Kluuverotusces marxianus TISTR 5925* у пробірці з агаризованим середовищем YPD (YPD – дріжджовий екстракт, пептон, глюкоза) що містить 25% гліцерину, при температурі $+4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Пересіви на свіже поживне середовище проводять раз на 3...4 місяці. Роботи з колекційною культурою проводять виключно в асептичних умовах. Виконують мікробіологічний контроль шляхом висіву проби культури на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру пересівають на чашку Петрі з агаризованим YPD-середовищем, застосовуючи метод виснажувального штриха, щоб отримати ізолювані колонії. Культивування проводять у термостаті за температури $28\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 48 годин. Виконують мікробіологічний контроль шляхом висіву проби культури на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

ТП 4.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Ізолювані колонії, отримані з чашки Петрі (від ТП 4.2), пересівають петлею в пробірки з YPD-середовищем, при цьому одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки. Важливо відбирати для пересіву лише ті ізолювані колонії, що розташовані на відстані не менше 1 см. Культивування здійснюється в термостаті при температурі $28\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 24 годин. Виконують мікробіологічний контроль шляхом висіву проби культури на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах з колби об'ємом 1 л зі стерильною композицією А (від ДР 3.1) розливають поживне середовище по 155 мл у 4 колби для качалки об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Kluuveromyces marxianus* TISTR 5925 (від ТП 4.3) вводять 5 мл фізіологічного розчину. Після цього клітини суспендують (змивають культуру), а потім піпеткою відбирають отриману бактеріальну суспензію та переносять її в качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву кожної колби використовують бактеріальну суспензію з однієї пробірки. Культивування здійснюється на качалках (200 об/хв) при температурі $28\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 24 годин. Виконують мікробіологічний контроль шляхом висіву проби культури на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

ТП 4.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

У ферменер (І-12) з простерилізованою композицією А (від ДР 3.2), через засівну колбу вносять 0,62 л посівного матеріалу від ТП 4.4 і піногасник від ДР 2.1.3. Культивують при $t = 30\pm 1^\circ\text{C}$ з швидкістю перемішування 200 об/хв і за умови постійної аерації впродовж 12 год. При зміні середовища рН повертають до рН 5

додаючи 15%–й розчин HCl (від ДР 2.1.2) або 15%–й розчин NaOH (від ДР 2.1.1) доки рН середовища за показником датчика рН не буде 5,0. Проводять мікробіологічний контроль шляхом висіву проби культури, зібраної під час культивування, через порт відбору проб на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

ТП 4.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

У ферментер (I-17) з простерилізованою композицією А (від ДР 3.3), через трубу перетискування перекачують з інокулятора (I-12) інокулят від ТП 4.5 і через колбу піногасник від ДР 2.2.3. Культивують при $t = 30 \pm 1$ °С з швидкістю перемішування 200 об/хв і за умови постійної аерації впродовж 12 год. При зміні середовища рН повертають до рН 5 додаючи 15%–й розчин HCl (від ДР 2.2.2) або 15%–й розчин NaOH (від ДР 2.2.1), доки рН середовища за показником датчика рН не буде 5,0. Проводять мікробіологічний контроль шляхом висіву проби культури, зібраної під час культивування, через порт відбору проб на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез

У ферментері об'ємом 1 м³ (ФР-23) з простерилізованою композицією А (від ДР 3.4), через трубу перетискування перекачують з інокулятора (I-17) інокулят від ТП 4.5. Піногасник від ДР 2.3.3 вносять самоплином через трубу перетискування. Культивують до КУО та біомаси 10⁷ і 4,5 г/л відповідно, при $t = 30 \pm 1$ °С з швидкістю перемішування 200 об/хв і за умови постійної аерації впродовж 18 год. При зміні середовища рН повертають до рН 6 додаючи 15%–й розчин HCl (від ДР 2.1.2) або 15%–й розчин NaOH (від ДР 2.1.1), доки рН середовища за показником датчика рН не буде 5,0. Проводять мікробіологічний контроль шляхом висіву проби культури, зібраної під час культивування, через порт відбору проб на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням, а також проводять визначення концентрації джерела вуглецевого та азотного живлення та концентрації цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. КОНЦЕНТРУВАННЯ ТА ЛІОФІЛІЗАЦІЯ БІОМАСИ *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*, ЯК КОМПОНЕНТА ЗАКВАСКИ

У даній роботі розглядається варіант ліофілізованої біомаси як закваски для кефіру. Відповідно до даного варіанту буде побудована схема виділення біомаси *рис. 8.1.*

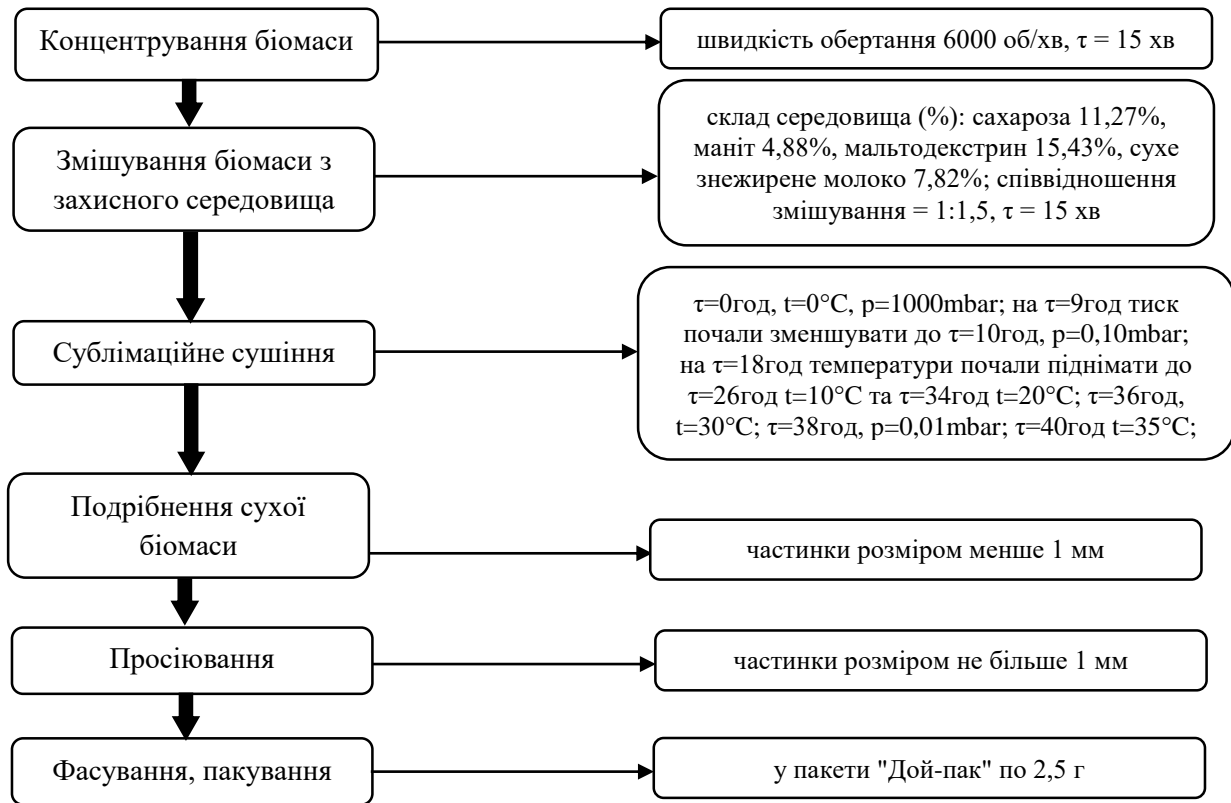


Рис. 8.1. Загальна схема виділення

На першому етапі біомасу відокремлюють від культуральної рідини. Розділення в сепараторах застосовують для досягнення цієї мети.[34] Буде застосовуватися сепаратор Flottweg, щоб концентрувати дріжджову суспензію. Перевагами цього сепаратору є автоматизована система управління, висока продуктивність, яку забезпечує підбір оптимальних параметрів відповідно до вимог виробництва. [62] Оптимальними параметрами для отримання дріжджової суспензії є швидкість обертання 6000 об/хв, час центрифугування 15 хв.

					НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ			
Змн.З	Арк.	№ докум. докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Скок О. В.			РОЗДІЛ 8. Концентрування та ліофілізація біомаси <i>Kluyveromyces marxianus</i> , як компонента закваски	Літ..	Арк..	Аркушів
Перевір.		Старовойтова С.О.					62	82
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр. Н.						62		
Затверд.		Стабніков В. П.						

Другий етап - приготування та додавання до біомаси захисного середовища. Даний процес відбувається у реакторі-змішувачі. Згідно літературних даних використовуємо захисне середовище такого складу (%): сахароза 11,27%, маніт 4,88%, мальтодекстрин 15,43%, сухе знежирене молоко 7,82%, оскільки відсоток виживання клітин *Kluyveromyces marxianus* за використання наведеного складу захисного середовища висушування при подальших стадіях досягнув $90,21\% \pm 1,04\%$. Співвідношення, за яким робили змішування, становило 1:1,5 відповідно дріжджової суспензії та захисного агента з рівноважним часом змішування 30 хв. [63]

Третій етап - сушіння біомаси з захисним середовищем. Сушіння відбувається за допомогою сублімації вакуумною сушкою. Даний метод запропонований для довгого зберігання, а також подальшого зручного транспортування. При низькому атмосферному тиску вода існує лише як лід або пара. Завдяки цьому лід можна сублімувати, тобто одразу перетворити на пару, минаючи стадію рідини.

Біомасу з захисним середовищем розливають у спеціальні глибокі, рівні лотки з 4 бортиками. Сублімаційне сушіння буде відбуватися у сушці від ТЕН 24, яку під замовлення виготовлять відповідно до наших умов і об'ємів. Висушування буде відбуватися відповідно до програми, представленій на *рис. 3.2*. [64,65,66]

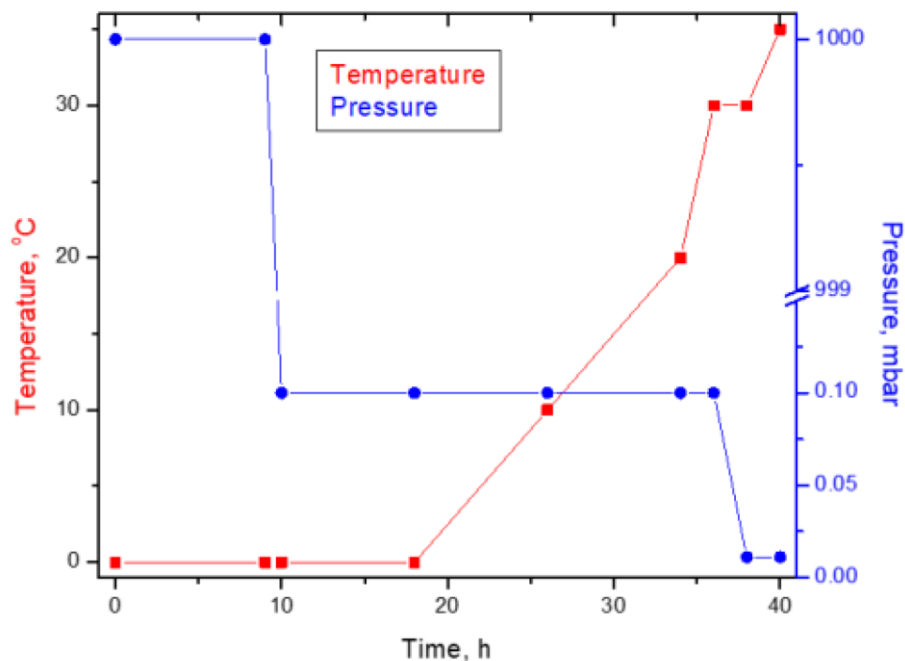


Рис. 8.2. Діаграма сублімаційного сушіння

Четвертий етап – подрібнення сухої біомаси. Для даного процесу пропонується використовувати дробарку млин Vektor HR-2500. Цей пристрій забезпечує продуктивність 50-80 кг/год (для пшениці) завдяки потужності 2,5 кВт та 1500 об/хв. Він має корпус з харчової нержавіючої сталі 304, живиться від звичайної розетки 220В і вирізняється компактними габаритами (60x26x34 см). Товщина помелу регулюється від 0,076 до 3 мм. Електродвигун витримує велике навантаження, оснащений системою охолодження та магнітним захистом від металевих домішок. [67]

П'ятий етап – просіювання. Для даного процесу пропонується використовувати вихровий просіювач AZO модель E360 з такими технічними характеристиками:

- Конструкція: В1 (близько 45 кг) та В1 фарма (близько 55 кг) - виконання
- Привід: 0,75 кВт
- Частота обертання ротора: 1500 об/хв.
- Продуктивність: 0,5 т/год, при розмірі осередків сита, 0,2 мм. [68]

Шостий етап - фасування, пакування. Для фасування у пакети "Дой-пак" використовується автоматична установка 083.32.07. Вона самостійно виконує всі етапи: бере пакет з касети, розкриває його, відміряє 2,5 грами продукту, засипає його, а потім заварює пакет і проставляє дату. [69]

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

9.1.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Відбувається контроль стерильності поживного середовища через аналіз проб на чашках Петрі. На середовищі Сабуро шукають гриби та дріжджі, а на МПА — бактерії. Далі проби інкубують для росту можливих мікроорганізмів. Якщо на поверхні поживного середовища після термостатування візуально відсутні ознаки росту мікроорганізмів, можна сказати, що дослідне середовище стерильне.

Умови проведення досліду. Відбираємо 50 мл проби простерилізованого поживного середовища. Продовжуємо посів, відбираючи 0,1 мл проби стерильною піпеткою. Її наносять на поверхню чашок Петрі: на Сабуро – для виявлення грибів і дріжджів, а для виявлення бактерій – на МПА. Рівномірний розподіл суспензії по середовищу здійснюють за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або шпателя Дригальського. Чашки з Сабуро інкубують у термостаті при 24°C, а чашки з МПА – при 30°C. Аналіз всіх посівів здійснюємо як мінімум через 6-8 годин. Після проходження відповідної кількості часу візуально оглядаємо поверхню поживного середовища на відсутність ознак росту мікроорганізмів і робимо висновки. [70]

Також експрес-методом для перевірки поживного середовища є мікроскопіювання. Мікроскопіювання здійснюємо застосовуючи світловий мікроскоп з імерсією. Відбираємо 0,1 мл проби поживного середовища стерильною піпеткою. Після цього на чисте предметне скло наносимо краплю проби і закриваємо покривним склом. Кінцем мікробіологічної петлі обережно притискаємо покривне скло до предметного. Потім, видаляємо надлишок вологи фільтрувальним папером, підносячи його до країв покривного скла. Мікроскопіюємо із збільшенням об'єктива 40×. Якщо при мікроскопіюванні не спостерігаються мікроорганізми, то можна сказати, що дослідне середовище стерильне [71].

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.23 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.З</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум. докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Скок О. В.</i>			РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	<i>Літ..</i>	<i>Арк..</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Старовойтова С.О.</i>					65	82
<i>Реценз.</i>						65		
<i>Н. Контр. Н.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В. П.</i>						

9.1.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу.

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу можна проводити двома способами: безпосереднім висівом на агаризовані поживні середовища або мікроскопією.

Умови проведення досліду. Готовий посівний матеріал, при застосуванні прямого висіву, розсівають на чашки Петрі з YPD (оскільки культура *Kluyveromyces marxianus* – вирощується на цьому середовищі), використовуючи метод виснажувального штриха. Посіви, що містяться в чашках, переносимо до термостата з температурою 30°C і вирощуємо культуру 24 год. Далі мікроскопіюємо мікроорганізми з окремих колоній, які виростили на середовищі після інкубування. [70]

Мікроскопіювання проводимо за допомогою світлового мікроскопа з імерсійною системою. Щоб це зробити, готуємо препарат дріжджів *K. marxianus* методом "роздавленої краплі". На чисте предметне скло наносимо краплю дистильованої води. Потім у цю краплю вносимо культуру дріжджів, ретельно змішуємо з водою та накриваємо покривним склом. Потім, використовуючи протилежний кінець мікробіологічної петлі, обережно притискаємо покривне скло до предметного, а надлишок вологи видаляємо фільтрувальним папером, підносячи його до країв покривного скла. Мікроскопіюємо із збільшенням об'єктива 40×. [71]

У досліджуваному препараті ми повинні спостерігати дріжджі *Kluyveromyces marxianus* з кулястою формою клітин, яка може коливатися від еліпсоїдної до циліндричної форми, а також іноді, на деяких середовищах, ми можемо спостерігати псевдогіфи від слабо розвинених до сильно розгалужених з кількома бластокондидами (рис. 9.1). [12]

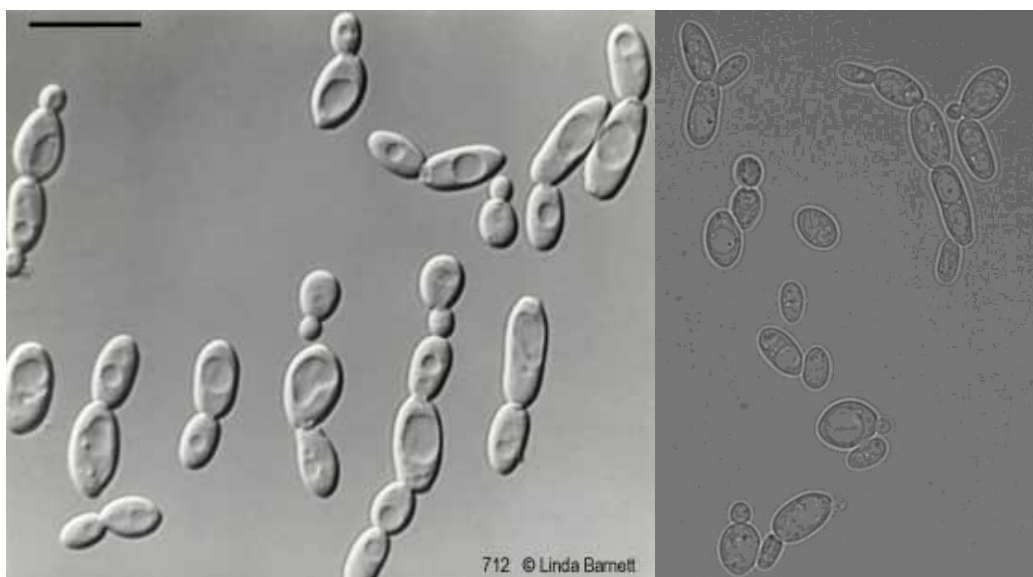


Рис. 9.1 Мікроскопія клітин *Kluyveromyces marxianus*

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрація біомаси визначається за допомогою нефелометрії, оскільки на середовищі YPD не утворюється псевдоміцелій.

Принцип методу. Цей метод оснований на вимірюванні інтенсивності розсіяного в середовищі видимого або УФ- світла з метою визначення концентрації, розміру і форми диспергованих (завислих) частинок у дисперсних системах. [70]

Умови проведення дослідю. З культуральної рідини відбирають 10 мл. У кювету об'ємом 2 мл наливають культуральну рідину. Далі на ФЕКу за довжини хвилі 600 нм і довжини світлового шляху 5 мм вимірюють оптичну густину. Перерахунок на біомасу роблять за допомогою калібрувального графіка. [72]

9.2.2. Визначення кількості життєздатних клітин

Підрахунок кількості життєздатних дріжджів проводять методом серійних розведень.

Принцип методу. Основою цього методу є підрахунок колонієутворюючих одиниць, які утворилися у результаті серійного посіву розведень суспензії від 10^{-1} до 10^{-9} у спеціальному розчині на селективному середовищі. [73]

Умови проведення дослідю: культуральну рідину серійно розводили, використовуючи стерильну триптонну воду 0,1% від 10^{-1} до 10^{-9} , далі для визначення КУО з кожного з розведень відбирали 0,1 мл зразка і засівали на чашки Петрі з Сабуро

агаром, які інкубували при 30 ± 1 °C протягом 48 годин. Після проходження часу колонії рахували за допомогою лічильника і виражали в загальних колонієутворюючих одиницях на мілілітр (КУО/мл). [74] Розрахунки проводять за формулою:

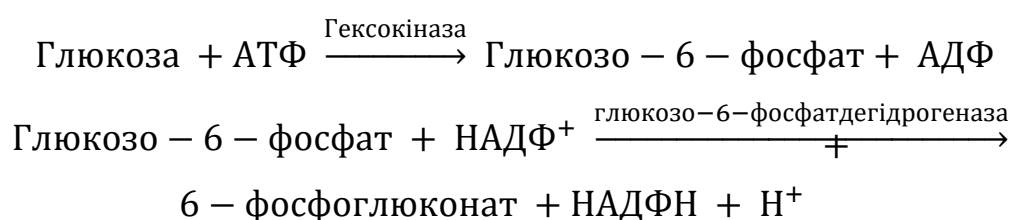
$$N = \frac{(a \pm 2\sigma)K}{V},$$

де N – кількість мікроорганізмів в 1 мл суспензії; K – розведення, з якого здійснено висів; a – середня кількість колоній на чашці Петрі за розведення K ; V – об'єм суспензії, взятий для посіву, мл; 2 – критерій при 9 % рівні значущості; σ – середнє квадратичне відхилення, рівне $\pm\sqrt{\sum a / n}$, n – кількість повторностей. [72]

9.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення

Джерело вуглецю – глюкоза. Концентрацію глюкози визначають з використанням біоаналізатора Cedex Bio Analyzer з набором для визначення глюкози Glucose Bio, методика якого ґрунтується на ферментативному фотометричному аналізі з використанням гексокінази. [75,76]

Принцип методу. Глюкоза фосфорилується АТФ у присутності гексокінази до глюкозо-6-фосфату, який окислюється НАДН у присутності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Швидкість утворення НАДФН вимірюється УФ-фотометрично і прямо пропорційна концентрації глюкози.[76, 77]



Умови проведення досліду. Біомасу та культуральну рідину розділяємо центрифугуванням. Випробовуваним розчином було безклітинне культуральне середовище, яке після центрифугування було профільтроване через фільтр з діаметром пор $0,22$ мкм. У пробірку на 250 мл вносимо 150 мл реагенту 1 (зі складом TRIS, 100 ммоль/л; Mg^{2+} , 4 ммоль/л; АТФ, 1,7 ммоль/л; НАДФ, 1 ммоль/л; консервант; рН 7,8), 2 мл супернатанту, попередньо розведеного у 20 мл води і 30 мл стандартного реагенту (зі складом NEPES, 30 ммоль/л; Mg^{2+} , 4 ммоль/л; гексокіназа

(дріжджі), 130 мккат/л; глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (*E. coli*), 250 мккат/л; консервант; рН 7,0). Далі відбирають 10 мл від зразка і вимірюють кількість глюкози за допомогою біоаналізатора. [70,75,77]

9.2.4. Визначення концентрації джерела азотного живлення

Джерело азоту – дріжджовий екстракт, пептон, отже азот у культуральній рідині перебуває в амінній формі. Загальну концентрацію амінного азоту визначаємо за допомогою методу формольного титрування. [78]

Принцип методу. Цей метод базується на властивості формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи, внаслідок чого утворюються метиленові похідні амінокислот. Ці похідні мають більш виражені кислотні властивості порівняно з амінокислотами та вільними карбоксильними групами, що дозволяє легко відтитрувати їх розчином лугу.

Умови проведення досліду. Біомасу та культуральну рідину розділяємо центрифугуванням. Дослідним розчином було безклітинне культуральне середовище, яке після центрифугування було профільтроване через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Визначення амінного нітрогену проводять з використанням рН–метра. Готують дві колби. В першу наливають 10 мл дослідного розчину, в другу – 10 мл дистильованої води (контроль). В обидві колби доливають 2,5 мл формольної суміші (обережно) і додають по 1 мл 0,001н розчину лугу. На рН-метрі вимірюють рН контрольної проби, а потім дослідну пробу титрують 0,01н розчином лугу до значення рН контрольної проби.

Вміст вільних аміногруп (мг% амінного нітрогену) розраховують за формулою:

$$X = \frac{0,14 \times A \times K}{V} \times 100\%,$$

де 0,14 – еквівалент нітрогену; А – об'єм 0,01н розчину лугу, що пішов на титрування дослідної проби, мл; К – коефіцієнт поправки на титр 0,01н розчину лугу; V – об'єм дослідної проби, мл. [79]

Карта контрольних точок виробництва біомаси *Kluveromyces marxianus*

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кт 1.2. Очищення повітря через фільтр грубої очистки	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E= 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3. Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P=0,35 МПа t=120-250 °С;
Кт 1.4. Вирівнювання тиску, забезпечення рівномірної подачі повітря та відокремлення надлишкової вологи	Охолоджене повітря, температура, повітря після видалення зайвої вологи; нагріте повітря, повітря після нагрівання, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, після видалення зайвої вологи; після нагрівання повітря	t= 25-30 °С; W= 60-70 %;
Кт 1.5. Очищення повітря через головний фільтр	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головному фільтрі	E= 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.6 Очищення повітря через індивідуальні фільтри	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E= 99,99 %
Кт, Км, Кх 2.1.1, 2.2.1, 2.3.1 Приготування і стерилізація 15% NaOH	15% NaOH Температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль, хімічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний та хімічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, 15%-ість розчину
Кт, Км, Кх 2.1.2, 2.2.2, 2.3.2 Приготування 15% HCl	15% HCl Концентрація, відсутність мікробіоти	Мікробіологічний та хімічний контроль	Мікробіологічний та хімічний контроль після стерилізації	відсутність мікробіоти, 15%-ість розчину

Км 2.1.3, 2.2.3, 2.3.3 <i>Приготування і стерилізація піногасника</i>	Піногасник Температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Kluveromyces marxianus TISTR 5925</i> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 3 місяці	t = 4±2°С, τ = 3-4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Kluveromyces marxianus TISTR 5925</i> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 год	t = 28±1°С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 <i>Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах</i>	Робоча культура <i>Kluveromyces marxianus TISTR 5925</i> Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	t = 28±1 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км 4.4. <i>Вирощування інокуляту в колбах на качалках</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин</p>	<p>$t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\tau = 12$ год, $\text{pH} = 5$ $n = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.5 <i>Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рН, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, мікроскоп</p>	<p>Температура, рівень рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин</p>	<p>$t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\tau = 12$ год, $\text{pH} = 5$ $n = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.6 <i>Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л</i></p>	<p>Посівний матеріал, Температура, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, рН, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, мікроскоп</p>	<p>Температура, рівень рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин</p>	<p>$t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\tau = 12$ год, $\text{pH} = 5$ $n = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км 5.1 <i>Виробний біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³</i></p>	<p>Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, рівень піни, мікробіологічна чистота культури, КУО, концентрація біомаси</p>	<p>Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп, метод серійних розведень, нефелометрія</p>	<p>Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування; мікроскопіювання – кожні 8 годин</p>	<p>$t = 28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\tau = 18$ год, $\text{pH} = 5$ $n = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, КУО = 10^7, $C_6 = 4,5$ г/л</p>

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Фармацевтична енциклопедія, Біотехнологія .-[Електронний ресурс].-
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1933/biotexnologiya>
2. Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology*, 6, 1177. doi: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01177/full>
3. Karim, A., Gerliani, N., & Aider, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
4. ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови» Doi: https://dnaop.com/html/34061/doc-%D0%94%D0%A1%D0%A2%D0%A3_4417_2005
5. Yousefvand, A., Huang, X., Zarei, M., & Saris, P. E. J. (2022). *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG survival and quality parameters in kefir produced from kefir grains and natural kefir starter culture. *Foods*, 11(4), 523. Doi: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/4/523>
6. Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., ... & Alitheen, N. B. (2021). Kefir and its biological activities. *Foods*, 10(6), 1210. doi: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1210>
7. Van Wyk, J. (2019). Kefir: The champagne of fermented beverages. *Fermented beverages*, 473-527. Doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128152713000129>
8. Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and environmental microbiology*, 78(4), 956-964. Doi: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.06385-11>

9. Список компаній - Кефір, ряжанка – Україна.-[Електронний ресурс].-
<https://ua.kompass.com/a/%D0%BA%D0%B5%D1%84%D1%96%D1%80-%D1%80%D1%8F%D0%B6%D0%B0%D0%BD%D0%BA%D0%B0/0449044/>
10. Vaithanomsat, P., Boonlum, N., Trakunjae, C., Apiwatanapiwat, W., Janchai, P., Boondaeng, A., ... & Jarerat, A. (2022). Functionality of yeast β -glucan recovered from *kluuveromyces marxianus* by alkaline and enzymatic processes. *Polymers*, 14(8), 1582. <https://doi.org/10.3390/polym14081582>
11. Kakisu, E., Irigoyen, A., Torre, P., De Antoni, G. L., & Abraham, A. G. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 456-463. <https://doi.org/10.1017/S0022029911000653>
12. MycoBank. *Kluuveromyces marxianus* 316062 (EC Hansen) Ван дер Вальт 1971 пік
13. *Kluuveromyces marxianus* -[Електронний ресурс].-
https://en.wikipedia.org/wiki/Kluuveromyces_marxianus
14. Rocha, S. N., Abrahão-Neto, J., & Gombert, A. K. (2011). Physiological diversity within the *Kluuveromyces marxianus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 619-630. doi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-011-9617-7>
15. Vivier, D., Ratomahenina, R., Moulin, G., & Galzy, P. (1993). Study of physicochemical factors limiting the growth of *Kluuveromyces marxianus*. *Journal of industrial microbiology*, 11, 157-161. doi: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01583717>
16. Lim, H. W., Kim, D. H., Jeong, D., Kang, I. B., Kim, H., & Seo, K. H. (2019). Biochemical characteristics, virulence traits and antifungal resistance of two major yeast species isolated from kefir: *Kluuveromyces marxianus* and *Saccharomyces unisporus*. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 275-281. doi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1471-0307.12582>
17. National Center for Biotechnological Information Taxonomy Browser *Kluuveromyces marxianus* -[Електронний ресурс].-
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=4911>

18. *Виробництво молокопродуктів у 2021 році.* Спілка молочних підприємств України. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://uadairy.com/vyrobnyctvo-molokoproduktiv-u-2021-roczii/>
19. Молочний альянс. (04.01.2017). *Кефір та його унікальна користь для здоров'я.* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://milkalliance.com.ua/blog/ua/stattya/kefir-ta-ioho-unikalna-koryst-dlia-zdorovia>
20. Ганна Носова. (28.08.2024). *Кефір чи ряжанка: що корисніше, чим відрізняються ці напої.* ТСН. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tsn.ua/zdorovya/korysni-statti/kefir-chi-ryazhanka-scho-korysnishe-chim-vidriznyayutsya-ci-napoyi-2649030.html>
21. Країна здоров'я. (23.04.2024). Топ-5 корисних властивостей кефіру. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://zdorovia.com.ua/harchuvannja/65821top-5-korysni-vlastivostei-kefiru.html#google_vignette
22. Про «Молочний альянс». Молочний альянс. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://milkalliance.com.ua/company/about-us/>
23. Prom. Закваска для кефіру в Україні. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://prom.ua/ua/Zakvaska-dlya-kefira.html?srsltid=AfmBOopq4SdoEIjWmLn9vFREv4VObQG1scRdOEF_RonLrEggVPDDWdq
24. Молочні закваски і ферменти. Закваска для Кефіра (1000 л) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://milkservis.com.ua/p4210963-zakvaska-dlya-kefira.html>
25. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Kluyveromyces marxianus* - [Електронний ресурс].- <https://www.genome.jp/pathway/kmx00010>
26. Citrate cycle (TCA cycle) - *Kluyveromyces marxianus* <https://www.kegg.jp/pathway/kmx00020>
27. Fructose and mannose metabolism - *Kluyveromyces marxianus* <https://www.kegg.jp/pathway/kmx00051>
28. Starch and sucrose metabolism - *Kluyveromyces marxianus* <https://www.kegg.jp/pathway/kmx00500>

29. Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Kluyveromyces marxianus*
<https://www.kegg.jp/pathway/kmx00250>

30. Arginine and proline metabolism - *Kluyveromyces marxianus*
<https://www.kegg.jp/pathway/kmx00330>

31. Pyrimidine metabolism - *Kluyveromyces marxianus*
<https://www.kegg.jp/pathway/kmx00240>

32. Purine metabolism - *Kluyveromyces marxianus*
<https://www.kegg.jp/pathway/kmx00230>

33. Fatty acid biosynthesis - *Kluyveromyces marxianus*
<https://www.kegg.jp/pathway/kmx00061>

34. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. (2022) Основи проєктування біотехнологічних виробництв. Навч. посібник. К.: НУХТ.

35. LAB1S. 1000L Stainless Steel Bioreactor for Cell Culture with 4 Gas Inlets BR500-C1 [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://eshop.lab1st.com/products/1000l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-and-cell-culture-br500-c1?srsltid=AfmBOorNb6QannKypZo9M8FpaulCCjzeY13P73tNv1PFaYbDDUeVWGV>

36. ДСТУ ISO/TS 22002-1:2019 (ISO/TS 22002-1:2009, IDT) «ПРОГРАМИ-ПЕРЕДУМОВИ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ Частина 1. Виробництво харчових продуктів». [Електронний ресурс] Режим доступу:
https://zakon.isu.net.ua/sites/default/files/normdocs/dstu_iso_ts_22002-1_2019_0.pdf

37. Денисова Н.М., Буяльська Н.П. Санітарія і гігієна підприємств харчової промисловості. Методичні вказівки до самостійної роботи студентів напряму підготовки 6.051701 – „Харчові технології та інженерія” фахівців освітньо - кваліфікаційного рівня „бакалавр”. – Чернігів: ЧНТУ, 2015. С. 77-78. [Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://ir.stu.cn.ua/bitstream/handle/123456789/12128/%D0%A1%D0%B0%BD%1%96%D1%82%D0%B0%D1%80%D1%96%D1%8F%20%D1%96%20%D0%B3%D1%96%D0%B3%D1%96%D1%94%D0%BD%D0%B0%20%D0%BF%D1%96%D0%B4%D0%BF%D1%80%D0%B8%D1%94%D0%BC%D1%81%D1%82%D0%B2%20%D1>

[%85%D0%B0%D1%80%D1%87.%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%96.%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4.%D0%B2%D0%BA%D0%B0%D0%B7.%D0%B4%D0%BE%20%D1%81%D0%B0%D0%BC.%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%B8.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

38. Ковальова, О. С., & Кошулько, В. С. (2023, February). Інноваційна технологія дезінфекції технологічного обладнання харчових виробництв. In *The 5th International scientific and practical conference "Prospects of modern science and education" (February 07–10, 2023) Stockholm, Sweden. International Science Group* (pp. 609-612). [Електронний ресурс] Режим доступу: <file:///C:/Users/ASER/Downloads/PROSPECTS-OF-MODERN-SCIENCE-AND-EDUCATION.pdf>

39. АБСОЛЮТ ЦЕНТР. *OXIN KD 103, засіб кислотний з дезінфікуючою дією для очищення, кан 22 кг.* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://absolut.lviv.ua/OXINKD103zasibkuslotnujzdezinfikuyuchoyudiyeyudlyaochushhennyakan22kg%D0%9E%D0%94-0041-ua>

40. Дія. (9 вересня 2020 р). *Державний реєстр дезінфекційних засобів.* [Електронний ресурс] Режим доступу: https://data.gov.ua/dataset/reestr_dezzasobiv_moz

41. Clean-ua.com. *Засіб дезінфекційний "Бланідас-Ц Гіпохлорит" (Blanidas-C Hypochlorite), 20л.* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://clean-ua.com/blanidas-c-hypochlorite-20l/>

42. HLORKA. *Данаклін універсальний, 5000 мл.* [Електронний ресурс] Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p2517052954-danaklin-universalnyj-5000.html?srsltid=AfmBOorqmtLt1J7d7rtAqNIYrFFR57IIJd9P8MrdST_9iUhTL7s1Tr1

43. СтеріДез. *ITS WATER DEZ-373-E (ITC ВОТЕР ДЕЗ-373-E).* [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://steridez.com/its-water-dez-373-e/>

44. Goshima, T., Tsuji, M., Inoue, H., Yano, S., Hoshino, T., & Matsushika, A. (2013). Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces*

marxianus strain. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(7), 1505-1510.
<https://doi.org/10.1271/bbb.130173>

45. Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., & Morrissey, J. P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 507-519.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-011-9606-x>

46. DEYARDA. Повітрязабірник великий одинарний 857x373x100 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://deyarda.com.ua/povitrozabirnyk-velykyi-odynarnyi-857kh373kh100/>

47. Alterair. Змінний фільтр Maico G4 507x166x50 мм (Німецьке виробництво для Alter Air). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/smennyu-filbtr-maico-g4-507x166x50/>

48. Testrite. Компресор для ЗВГ Tight 60. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.testrite.com.ua/ua/compresory/compresory_lpg_60.php

49. Vents-shop. Водяний канальний охолоджувач Вентс ОКВ 400x200-3. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://vents-shop.com.ua/vodyaniy-kanalniy-oholodzhuvach-vents-okv-400h200-3/>

50. ТОВ «ЕНТЕХ УКРАЇНА». Повітрязабірник, ресивер для стисненого повітря 2000 л, 2,0 м3 (PB2000, PB2000.1200). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p1192183045-vozduhosbornik-resiver-dlya.html>

51. Vents-Shop. Водяний нагрівач НКВ 100-2. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://vents-shop.com.ua/vodyanoy-nagrevatel-nkv-100-2/>

52. Alterair. Вугільний фільтр Maico M5 (WSF-AKF 320/470). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/maico-wsf-wsg/>

53. Alterair. Фільтр Maico F7 (WSF 320/470). [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/f7-wsf-320-470/>

54. УКРВАГИ. Ваги фасувальні ICS-6AW. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ukrvesi.com.ua/ua/p230937015-vesy-fasovochnye-ics.html>

55. Achieve chem. *Реактор з нержавіючої сталі*. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ua.achievechem.com/chemical-equipment/stainless-steel-reactor.html>

56. ENGINEERING SYSTEMS. Насос дозуючий SEKO MS1A094A54A4000, 20 л/год, 10 бар, PP, EPDM. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/nasos-dozuyuchij-seko-ms1a094a54a4000-20-l-god-10-bar-rr-epdm/>

57. LAB1ST. 10L Stainless Steel Bioreactor for Cell Culture with 3 Gas Inlets BR500-M1 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://files.lab1st.com/documents/BR500-M1-10L%20Lab1st%20Bioreactor%20V1.231025.pdf>

58. LAB1ST. 100L Stainless Steel Bioreactor for Microbial Fermentation with 2 Gas Inlets BR500-M1. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://eshop.lab1st.com/products/100l-stainless-steel-bioreactor-for-microbial-fermentation-with-2-gas-inlets-br500-m1?srsId=AfmBOook6NmR2o3hbgs3V9BF7usc0tFTzet17-e38yEvwQk3Xm5qonp8>

59. УКРВАГИ. *Торгові ваги Прок ВТ-60*. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ukrvesi.com.ua/ua/p1126806601-torgovye-vesy-prok.html>

60. Made-in-China. High Shear Industrial Stainless Steel Mixer 1000 Litre Chemical Mixing Tank. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://lenotank.en.made-in-china.com/product/bZjQJWDdkIhS/China-High-Shear-Industrial-Stainless-Steel-Mixer-1000-Litre-Chemical-Mixing-Tank.html>

61. Стрім-Енерджі. Мембранний насос VP05-PP для кунжутного соусу, солоної води, розчинів, суспензії. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://stream-energy.com.ua/ua/p1633417465-membrannyj-nasos-vp05.html>

62. *Сепаратор Flottweg*. Flottweg. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.flottweg.com/product-lines/separator/>

63. Wang, L., He, M., Wu, T., Yang, K., Wang, Y., Zhang, Y., ... & Deng, K. (2021). Screening of the freeze-drying protective agent for high-quality milk beer yeast (*Kluyveromyces marxianus*) and optimization of freeze-drying process conditions. *Journal*

of *Food Processing and Preservation*, 45(12), e16016.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.16016>

64. Bărbulescu, I. D., Ghica, M. V., Begea, M., Albu Kaya, M. G., Teodorescu, R. I., Popa, L., ... & Dinu-Pîrvu, C. E. (2021). Optimization of the fermentation conditions for brewing yeast biomass production using the response surface methodology and Taguchi Technique. *Agriculture*, 11(12), 1237. <https://www.mdpi.com/2077-0472/11/12/1237>

65. ТЕН 24. *Сублімаційна сушка продуктів*. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ten24.com.ua/ua/blog/sublimatsionnaya-sushka-produktov/>

66. HONGBEI. *Форма з нержавеючої сталі*. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.wxhongbei.com/uk/460x660mm-stainless-steel-commercial-freeze-dryer-tray-for-food-fruit-chemical-factory>

67. INDUSTRIAL KITCHEN. *Дробарка млин для кави, спецій, цукру, мак та ін. Vektor HR-2500*. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://industrial-kitchen.com.ua/drobilka-melnica-dlya-kofe-specij-sahara-mak-i-dr-vektor-hr-2500?gad_source=1&gad_campaignid=22346192779&gbraid=0AAAAAapfcKQpU8CrtSGqtYtQbWGAKKMMYJ&gclid=CjwKCAjwq7fABhB2EiwAwk-YbFdqXi3UpdJPaTL6Lo0R45x8xtwwvHCyJXO4F7yVqkA-OrQzv9A9yxoC-3wQAvD_BwE

68. GVP. *Обладнання для просіювання інгредієнтів*. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://gvp.com.ua/ua/prosiiuvachi-obladnannia-promyslove#popup2_body

69. OMELA. *Автомат для фасування сипучих продуктів у пакети "Дой-пак" ваговим способом 083.32.07*. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://omela.ua/ua/fasovalne-obladnannia/avtomaticheskaya-ustanovka-dlya-fasovki-i-upakovki-sipuchix-produktov-v-gotovie-paketi-tipa-doy-pack-083_32_03?gad_source=1&gad_campaignid=19278781093&gbraid=0AAAAApIZGGedXEej5f9Q4LffPqjbNSHx9&gclid=CjwKCAjwq7fABhB2EiwAwk-YbF5iLIDAlwmg_EK5kqhUVjoMhFfSl14MPYTM5GVd2BRcNg1lvYiaEhoCdi0QAvD_BwE

70. Красінько, В. О. (2019). Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ.«бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. К.: НУХТ.

71. Скроцька О.І., Красінько В.О., Волошина І.М. (2021). Мікроорганізми як біологічні агенти: лаб. практикум для здобувачів освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навчання. К.: НУХТ.

72. Пирог Т.П., Ключка Л.В. (2021). Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. К.: НУХТ.

73. Wang, L., Zhong, H., Liu, K., Guo, A., Qi, X., & Cai, M. (2016). The evaluation of kefir pure culture starter: Liquid-core capsule entrapping microorganisms isolated from kefir grains. *Food science and technology international*, 22(7), 598-608. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1082013216628311>

74. Tzavaras, D., Papadelli, M., & Ntaikou, I. (2022). From milk kefir to water kefir: Assessment of fermentation processes, microbial changes and evaluation of the produced beverages. *Fermentation*, 8(3), 135. <https://doi.org/10.3390/fermentation8030135>

75. Roche. Cedex® Bio Analyzer. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://custombiotech.roche.com/global/en/products/instruments/cedex-bio-ins-2895.html#productInfo>

76. Pyeshkova, V. M., Saiapina, O. Y., Soldatkin, O. O., & Dzyadevych, S. V. (2010). Traditional and biosensor methods of mono-and disaccharides determination. *Biotekhnologiya*, 3(3), 9-22. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://www.researchgate.net/publication/273760250_TRADITIONAL_AND_BIOSENSORS_OR_METHODS_OF_MONO-AND_DISACCHARIDES_DETERMINATION In Ukrainian






77. Roche. Glucose Bio. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/ff52a1b0-d2a1-e411-0898-00215a9b0ba8?countryIsoCode=XG>

78. Дехтяренко, Н. В., & Дуган, О. М. (2011). Особливості приготування і ферментація соєвого молока представниками роду *Lactobacillus*. *Наукові вісті Національного технічного університету України Київський політехнічний інститут*, (3), 34-39. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&2_S21P03=FILA=&2_S21STR=NVKPI_2011_3_7

79. Майборода О.І., Салюк А.І., Ковальова С.О. (2020). Біохімія: лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «Бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної та заочної форм навчання. К.: НУХТ.

Article

Functionality of Yeast β -Glucan Recovered from *Kluyveromyces marxianus* by Alkaline and Enzymatic Processes

Pilanee Vaithanomsat ¹, Nutthamon Boonlum ¹, Chanaporn Trakunjae ¹, Waraporn Apiwatanapiwat ¹, Phomphimon Janchai ¹, Antika Boondaeng ¹, Kanokwan Phalinphattharakit ², Hataitip Nimitkeatkai ³ and Amnat Jarerat ^{2,*}

¹ Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute (KAPI), Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand; aappln@ku.ac.th (P.V.); mmooly.2539@gmail.com (N.B.); aapcpt@ku.ac.th (C.T.); aapwpa@ku.ac.th (W.A.); aapptmj@ku.ac.th (P.J.); aapakb@ku.ac.th (A.B.)

² Food Technology Program, Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Saiyok, Kanchanaburi 71150, Thailand; kanokwan.nia@student.mahidol.ac.th

³ School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Muang, Phayao 56000, Thailand; hataitip.ni@up.ac.th

* Correspondence: amnat.jar@mahidol.ac.th; Tel: +66-85-522-6419

Abstract: β -Glucan (BG), one of the most abundant polysaccharides containing glucose monomers linked by β -glycosidic linkages, is prevalent in yeast biomass that needs to be recovered to obtain this valuable polymer. This study aimed to apply alkaline and enzymatic processes for the recovery of BG from the yeast strain *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5925. For this purpose, the yeast was cultivated to produce the maximum yield of raw material (yeast cells). The effective recovery of BG was then established using either an alkaline or an enzymatic process. BG recovery of 35.45% was obtained by using 1 M NaOH at 90 °C for 1 h, and of 81.15% from 1% (*w/v*) hydrolytic protease enzyme at 55 °C for 5 h. However, BG recovered by the alkaline process was purer than that obtained by the enzymatic process. Fourier transform infrared (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy confirmed the purity, the functional groups, and the linkages of BG obtained from different recovery systems and different raw materials. The results of this study suggest that an alkaline process could be an effective approach for the solubilization and recovery of considerable purity of BG from the yeast cells. In addition, the obtained BG had comparable functional properties with commercially available BG. This study reveals the effectiveness of both chemical and biological recovery of BG obtained from yeast as a potential polymeric material.

Keywords: alkaline recovery; enzymatic recovery; functionality; β -glucan; yeast



check for updates

Citation: Vaithanomsat, P.; Boonlum, N.; Trakunjae, C.; Apiwatanapiwat, W.; Janchai, P.; Boondaeng, A.; Phalinphattharakit, K.; Nimitkeatkai, H.; Jarerat, A. Functionality of Yeast β -Glucan Recovered from *Kluyveromyces marxianus* by Alkaline and Enzymatic Processes. *Polymers* **2022**, *14*, 1582. <https://doi.org/10.3390/polym14081582>

Academic Editors: Shengbo Ge, Wanxi Peng and Yequan Sheng

Received: 28 February 2022

Accepted: 7 April 2022

Published: 13 April 2022

1. Introduction

3. Results and Discussion

3.1. Biomass Cultivation

Figure 1 shows the production profile of the yeasts *K. marxianus* TISTR 5925 and *S. cerevisiae* Kyokai NO. 9 in the 10 L bioreactor. Both yeasts similarly took around 6 h to adapt to the environment (during the lag phase), then reached the highest growth at 12–18 h before going through a stationary phase at 24 h. In our study, yeast cells (about 3 g/L) were harvested after 48 h of cultivation, in which they contained initial BG at 12–15 g from 100 g of *S. cerevisiae* Kyokai NO. 9 biomass and 8–10 g from 100 g of *K. marxianus* TISTR 5925 biomass. The industrial thermotolerant yeast strain of *K. marxianus* TISTR 5925 grew and provided a relative higher cell mass than *S. cerevisiae* Kyokai NO. 9, indicating its applicability as a source of BG. It is a competitive strain that has demonstrated excellent ethanol production and cell growth efficiency [8].

The obtained results of this study showed comparable cell mass to other previous reports [8,17]. It has been reported that cell mass and the BG production (8–12% *w/w*) were maximized after 48 h [17]. Avramia and Amariei [7] reported that the total carbohydrate content of brewer's yeast cells (*S. cerevisiae*) usually varied by more than 50% (of which 12–21% are BG), depending on growth condition, medium, and cell age. This study yielded similar content of initial BG.

6 of 13

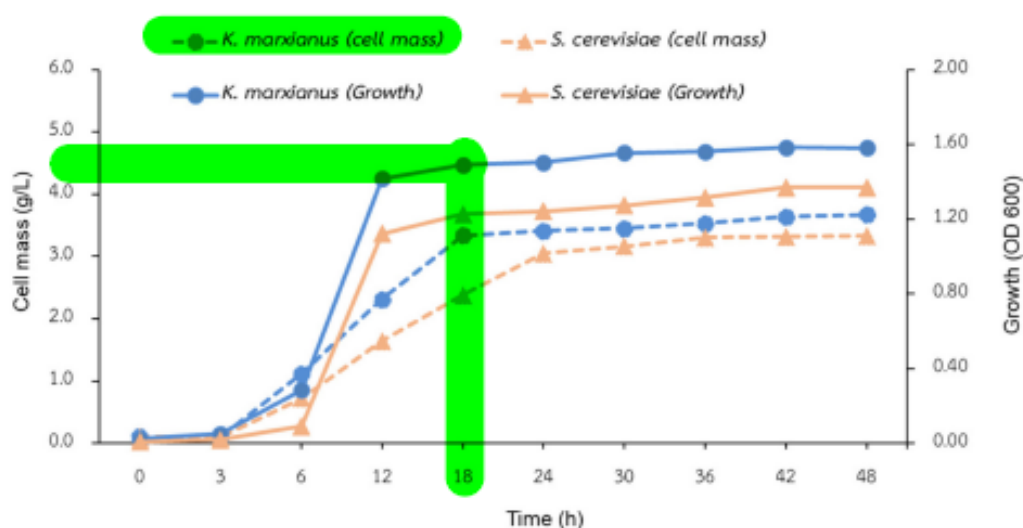


Figure 1. Pilot-scale production profiles of *K. marxianus* TISTR 5925 and *S. cerevisiae* Kyokai NO. 9 in a 10 L bioreactor.

2.2. Biomass Cultivation

The yeast strain of *K. marxianus* TISTR 5925 was streaked on yeast extract peptone dextrose agar (YPD agar; 10 g of yeast extract, 20 g of peptone, 20 g of glucose, 15 g of agar, and 1000 mL of distilled water) and incubated at room temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) for 48 h. A single yeast colony was then inoculated into YPD broth (10 g of yeast extract, 20 g of peptone, 20 g of glucose, and 1000 mL of distilled water) and incubated at room temperature for 24 h to obtain a yeast stock solution. A 10% yeast inoculum was further inoculated into YPD broth (10 g of yeast extract, 20 g of peptone, 100 g of glucose, and 1000 mL of distilled water) and incubated at room temperature for 72 h to obtain yeast cells which were then subjected to further BG extraction. The yeast strain of *S. cerevisiae* Kyokai NO. 9 was treated in the same way as *K. marxianus* TISTR 5925.

Pilot-scale production of the culture was performed in a 10 L bioreactor (MDFT1000, B.E. Marubishi Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a 7 L working volume. Yeasts were individually cultured in YPD medium at 30°C and pH 5.0 for 48 h. The YPD medium was inoculated with an initial cell concentration of approximately 10^7 CFU/mL (350 mL). An agitation rate of 200 rpm and an aeration rate of 1.0 vvm were used.

The growth of yeasts was measured spectroscopically at 600 nm. The dry weight was measured using 2 mL of culture broth, which was previously diluted to 50 mL, filtered through a pre-dried filter ($0.45 \mu\text{m}$), and washed twice with 50 mL of normal saline solution. The filtered cells were dried at 100°C in a hot air oven until a constant weight was obtained and were subsequently cooled at room temperature for 2 h before weighing. The dried cell weight was recorded and expressed as cell mass (g/L).

Glycolysis / Gluconeogenesis - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Show description | Download | Help |

Pathway type

100%

Go

Search

Go

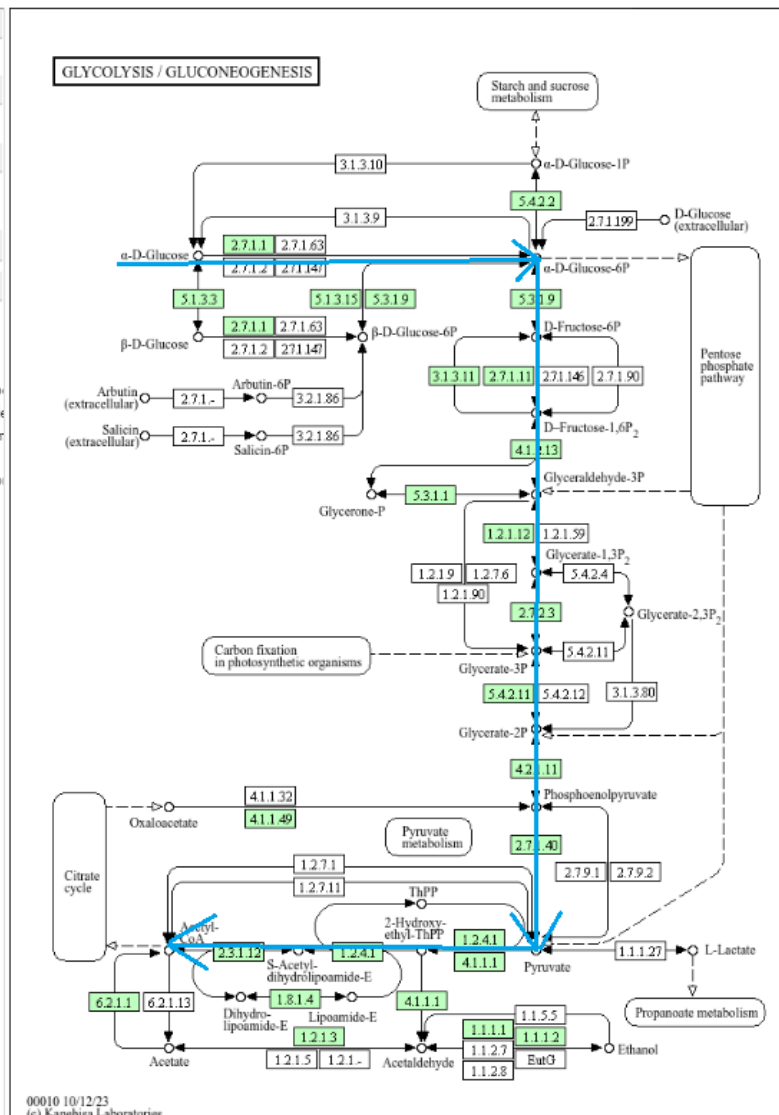
Filter

Go

Only

Ray modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metabolism
- M00001 Glycolysis (Embden-Meyerhof pathway)
- M00002 Glycolysis, core metabolism
- M00003 Gluconeogenesis
- M00307 Pyruvate oxidation



Citrate cycle (TCA cycle) - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Show description | Download | Help]

Pathway type

100%

Go

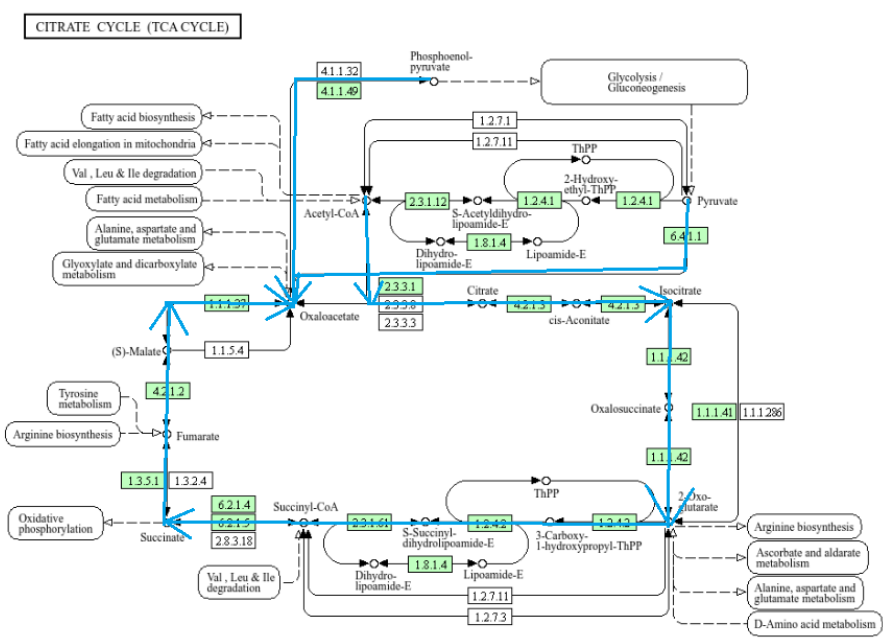
Search

Go

only

Key modules

- Carbohydrate metabolism
- Central carbohydrate metabolism
- 00003 Gluconeogenesis
- 00307 Pyruvate oxidation
- 00009 Citrate cycle (TCA)
- 00010 Citrate cycle, first
- 00011 Citrate cycle, second



Starch and sucrose metabolism - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help]

Pathway type

100%

Go

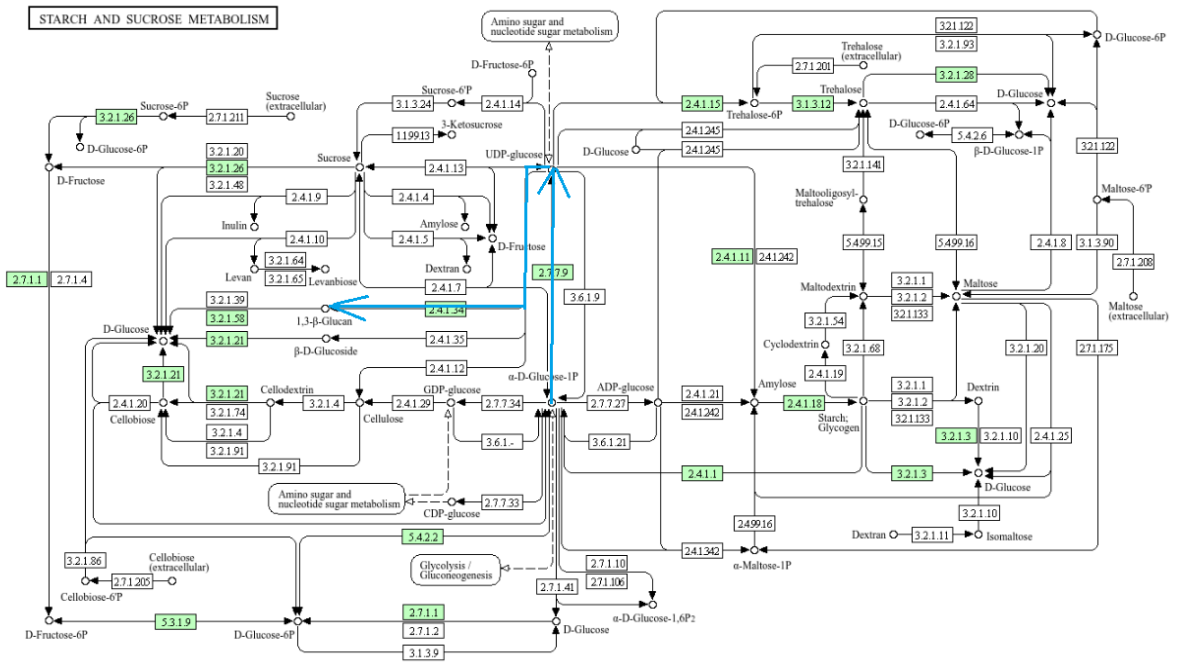
Search

Go

only

Key modules

- Carbohydrate metabolism
- Other carbohydrate metabolism
- 000854 Glycogen biosynthesis
- 000855 Glycogen degradation

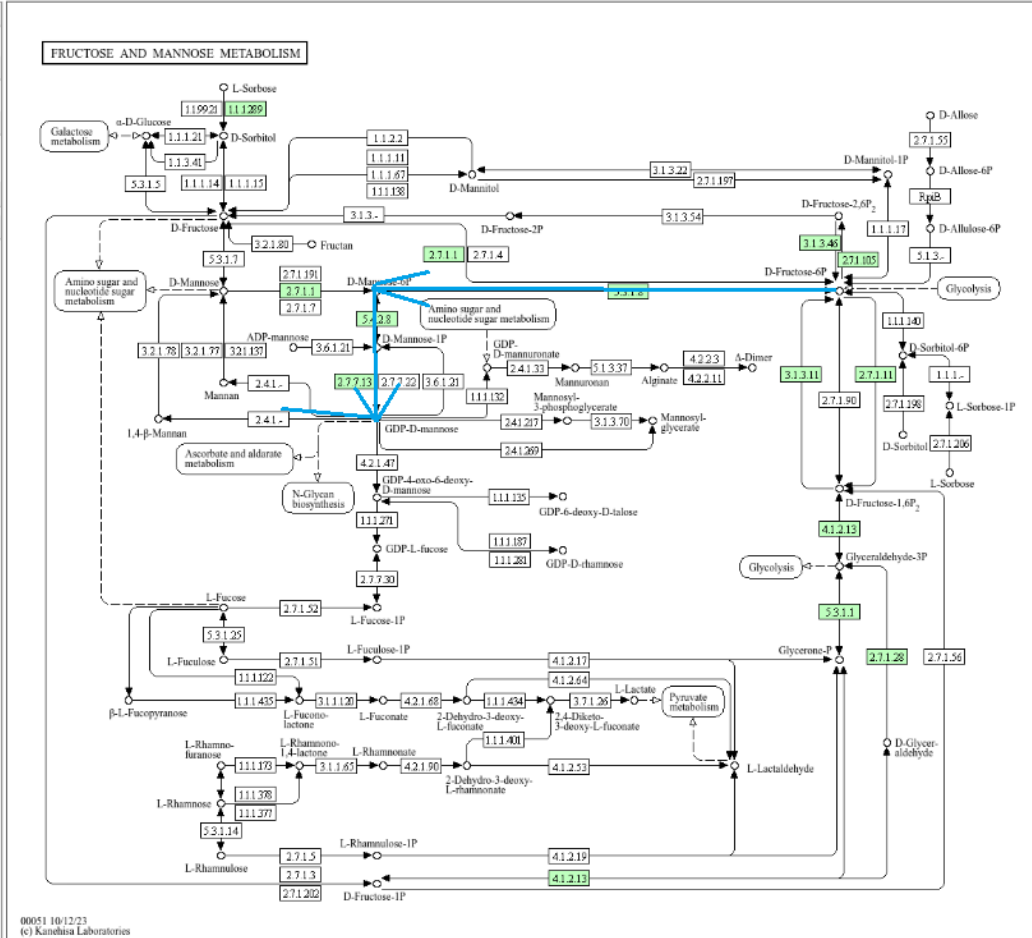


Fructose and mannose metabolism - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help |

athway type

100%
 arch
 e only



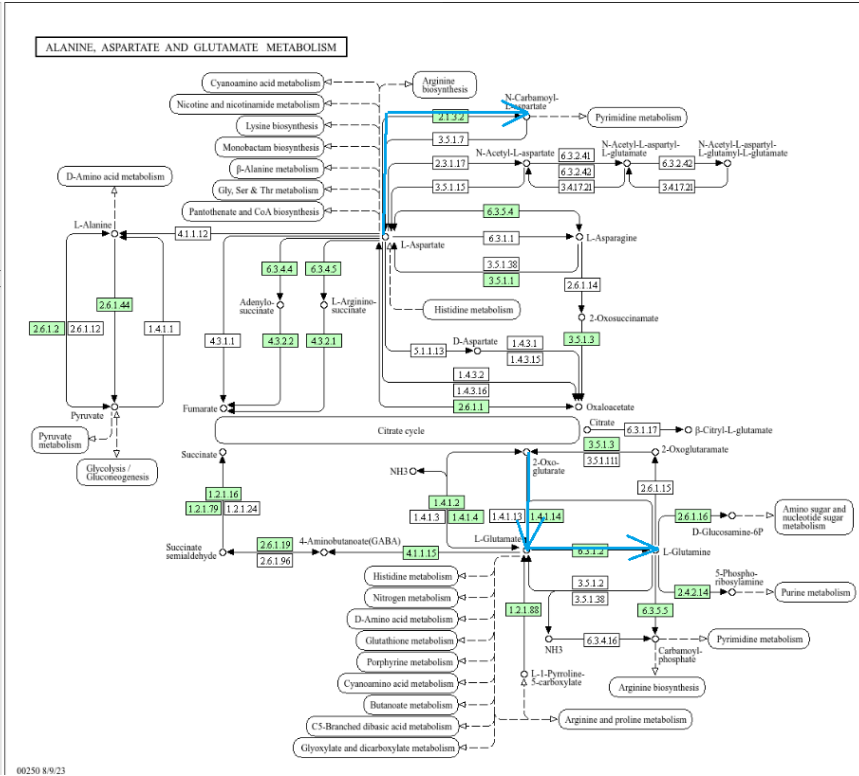
Alanine, aspartate and glutamate metabolism - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help |

athway type

100%
 arch
 le
 e only

key modules
 no acid metabolism
 other amino acid metabolism
 M00027 GABA (gamma-Ar



Arginine and proline metabolism - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help |

athway type

n

h

arch

le

only

way modules

no acid metabolism

ginine and proline metabo

M00015 Proline biosynthe

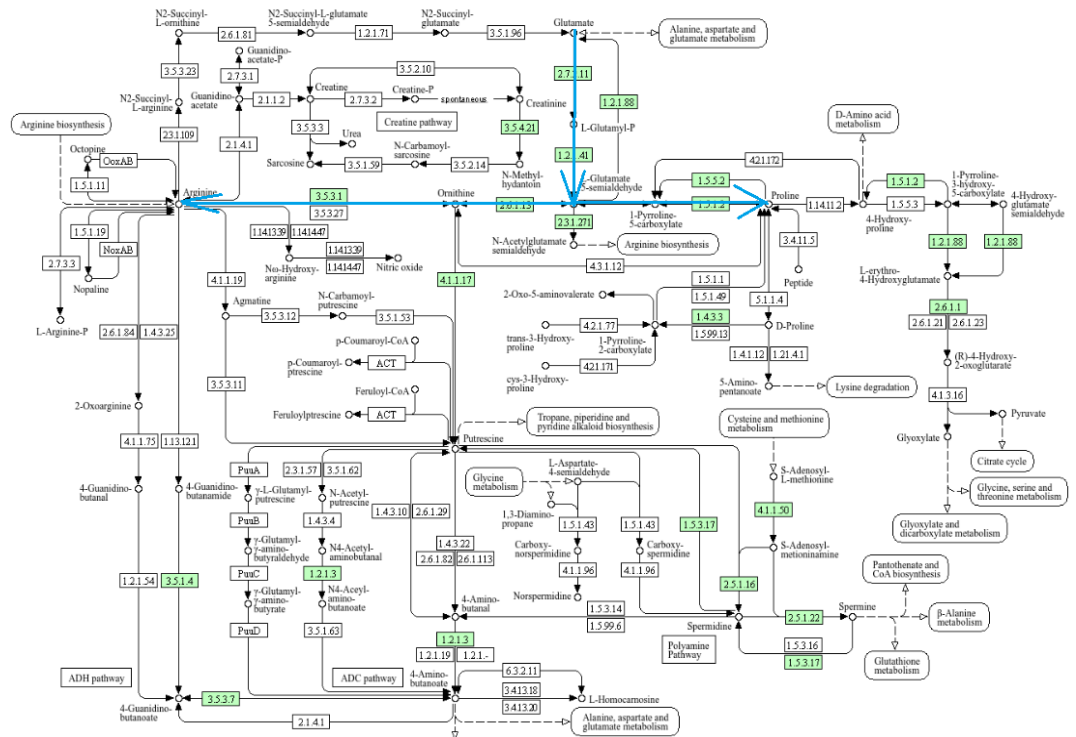
M00970 Proline degradati

M00972 Proline metaboli

lyamine biosynthesis

M00134 Polyamine biosyn

ARGININE AND PROLINE METABOLISM



Purine metabolism - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help |

pathway type

n

h

arch

le

only

way modules

bohydrate metabolism

entral carbohydrate metab

M00005 PRPP biosynthesis

deotide metabolism

urine metabolism

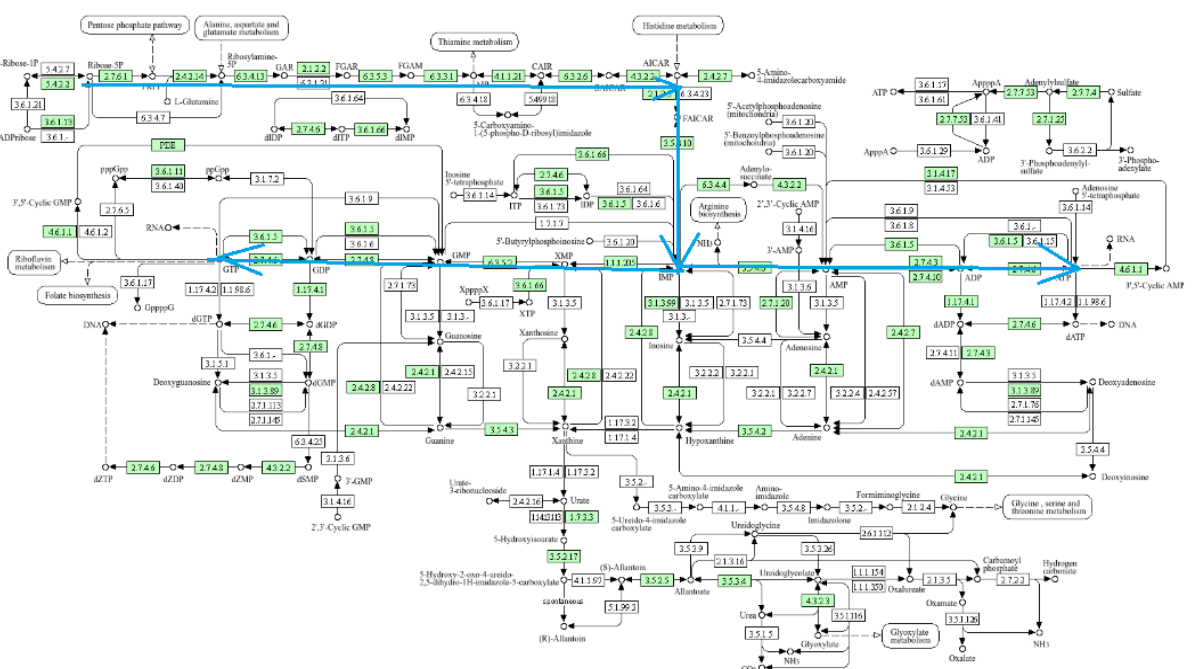
M00048 De novo purine bi

M00049 Adenine ribonuck

M00050 Guanine ribonuck

M00053 Deoxynribonuck

PURINE METABOLISM



00230 7/19/23

Pyrimidine metabolism - *Kluyveromyces marxianus*

menu | Organism menu | Pathway entry | Download | Help]

Pathway type

100%

Go

Search

Go

Filter

Go

Only

Ray modules

- ectide metabolism
- ine metabolism
- M00053 Deoxyribonucleo
- rimidine metabolism
- M00051 De novo pyrimid
- M00052 Pyrimidine ribonu
- M00938 Pyrimidine deoxy

