

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

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

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» __ червня 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» __ червня 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Одержання мікробного білка на відходах молочних
виробництв культивуванням *Kluyveromyces marxianus*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3

РУДА Карина Андріївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

Рецензент Оксана САЛАВОР
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

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 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

РУДОЇ Карини Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання мікробного білка на відходах молочних виробництв культивуванням *Kluyveromyces marxianus*»

керівник роботи доц., к.т.н. РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи Продукт: мікробний білок.

Біологічний агент: *Kluyveromyces fragilis*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Опис готової форми мікробного білка. Обґрунтування вибору *Kluyveromyces fragilis*. Техніко-економічне обґрунтування мікробного білка. Біосинтез мікробного білка. Обґрунтування вибору технологічної схеми мікробного білка. Специфікація обладнання для виробництва мікробного білка. Опис технологічної схеми одержання мікробного білка. Контроль виробництва мікробного білка. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва кормового білка

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема - 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема - 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Опис готової форми мікробного білка	01.03.24 – 06.03.2024	виконано
2	Обґрунтування вибору <i>Kluyveromyces fragilis</i>	07.03.24 – 12.03.2024	виконано
3	Техніко-економічне обґрунтування мікробного білка	13.03.24 – 22.03.2024	виконано
4	Біосинтез мікробного білка	23.03.24 – 28.03.2024	виконано
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми мікробного білка	29.03.24 – 12.04.2024	виконано
6	Специфікація обладнання для виробництва мікробного білка	13.04.24 – 19.04.2024	виконано
7	Опис технологічної схеми одержання мікробного білка	20.04.24 – 28.04.2024	виконано
8	Контроль виробництва мікробного білка	29.04.24 – 12.05.2024	виконано
9	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва кормового білка	13.04.24 – 17.05.2024	виконано
10	Графічна частина – підготовка креслень	18.05.24 – 24.05.2024	виконано
11	Оформлення кваліфікаційної роботи	25.05.24 – 28.05.24	виконано

Здобувач

(підпис)

Карина РУДА

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню технологічної та апаратурної схем отримання мікробного білка з використанням відходів молочного виробництва, а саме молочної сироватки за допомогою штаму *Kluveromyces marxianus* GQ 506972, який порівняно з іншими характеризується вищою здатністю до синтезу мікробного білку з виходом 4,5 г/л.

Визначено річну потребу у кормовому білку. Так, з метою забезпечення річної потреби для поголів'я поросят у Херсонській області необхідно 3 893,4 кг білка *Kluveromyces marxianus* GQ 506972. Технологічна схема біосинтезу мікробного білку включає допоміжні роботи (підготовка та стерилізація молочної сироватки) та технологічний процес (стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Наведено методику ідентифікації білка. Серед показників якості готового продукту – зовнішній вигляд, вологість, частка жиру, вміст золи. Оцінка біологічної дії ґрунтується на визначенні перетравності поживних речовин корму.

Представлено вибір стадій санітарної підготовки виробництва, вибору мийних та дезинфікуючих засобів, а також аналізу перспектив впровадження системи екологізації виробництва, що включає грамотне поводження зі стічними водами, газоподібними та рідкими відходами.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів та списку літератури із 67 найменувань. Загальний обсяг роботи – 95 сторінок. У даній роботі міститься 8 рисунків та 12 таблиць. Графічна частина включає технологічну (1 аркуш формату А1) та апаратурну схеми (1 аркуш формату А1).

Ключові слова: мікробний білок, *Kluveromyces fragilis*, молочна сироватка, свинарство, середовище культивування, ідентифікація, утилізація, відходи.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and hardware schemes for obtaining microbial protein using dairy waste, namely milk whey using strain *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972, which is characterized by a higher ability to synthesize microbial protein with a yield of 4.5 g/l compared to others.

The annual need for fodder protein was determined. So, in order to ensure the annual need for piglets in the Kherson region, 3,893.4 kg of *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972 protein is needed. The technological scheme of microbial protein biosynthesis includes auxiliary works (preparation and sterilization of milk serum) and technological process (stages of growing seed material and biosynthesis in a fermenter with a volume of 10 m³ with a filling factor of 0.6).

The method of protein identification is presented. Quality indicators of the finished product include appearance, moisture content, fat content, and ash content. The evaluation of the biological effect is based on the determination of the digestibility of feed nutrients.

The selection of stages of sanitary preparation of production, the selection of detergents and disinfectants, as well as the analysis of prospects for the implementation of the system of environmentalization of production, which includes competent handling of wastewater, gaseous and liquid waste, are presented.

The qualifying work consists of an introduction, nine chapters and a bibliography of 67 titles. The total volume of work is 95 pages. This work contains 8 figures and 12 tables. The graphic part includes technological (1 sheet of A1 format) and hardware diagrams (1 sheet of A1 format).

Key words: microbial protein, *Kluyveromyces fragilis*, milk whey, pig farming, culture medium, identification, utilization, waste.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОПИС ГОТОВОЇ ФОРМИ МІКРОБНОГО БІЛКА	11
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ <i>KLUYVEROMYCES FRAGILIS</i>	14
2.1. Обґрунтування вибору продуцента мікробного білка	14
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Kluyveromyces fragilis</i>	17
2.3. Таксономічний статус <i>Kluyveromyces fragilis</i>	19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА	20
3.1. Потреба в мікробному білку	20
3.2. Розрахунок річної потреби мікробного білка	22
3.3. Розрахунок потужності виробництва білка <i>Kluyveromyces marxianus</i> GQ 506972	23
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 10 м ³	24
3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 1 м ³	25
3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 100 л	26
3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л	26
3.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	27
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ МІКРОБНОГО БІЛКА	28
4.1. Катаболізм ростового субстрату у <i>Kluyveromyces fragilis</i>	28
4.2. Біотрансформація ростового субстрату в мікробний білок	30
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ МІКРОБНОГО БІЛКА	31
5.1. Вибір умов і способу культивування продуцента мікробного білка	31
5.2. Вибір типу ферментера	32
5.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	34

5.4. Обґрунтування вибору та опис стадій санітарної підготовки виробництва білка	37
5.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для отримання білка	45
5.5.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках	46
5.5.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	46
5.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу	47
5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН	48
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА МІКРОБНОГО БІЛКА	50
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА	53
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА МІКРОБНОГО БІЛКА	59
8.1. Мікробіологічний контроль	64
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	65
8.2.1. Концентрація біомаси.....	65
8.2.2. Концентрація білка	67
8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену.....	70
8.3. Методи ідентифікації білка.....	72
8.4. Визначення показників якості мікробного білка.....	73
8.5. Оцінка біологічної дії білка	77
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА КОРМОВОГО БІЛКА	79
9.1. Системи знешкодження рідких відходів	79
9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів.....	83
9.3. Системи знешкодження твердих відходів.....	84
ЛІТЕРАТУРА	87

ВСТУП

Промислове культивування мікроорганізмів як пряме джерело білка для харчування людини і тварин розглядалося як спосіб вирішення проблеми нестачі їжі в Німеччині вже під час Першої світової війни. Були розроблені технологічні процеси культивування пивних дріжджів, які після обробки і висушування додавали в супи і ковбаси. Під час Другої світової війни ці процеси вже були добре відпрацьовані [1].

Вираз «білки одноклітинних організмів» виникло в 60-і минулого століття яке вживалося стосовно бактеріальної біомаси (переважно дріжджів), яка використовується в якості харчового компонента тварин і людини. Особливо привабливим є той факт, що живильним середовищем при культивуванні мікроорганізмів найчастіше є відходи сільського господарства: макуха цукрових буряків у виробництві цукру, соняшникова макуха при отриманні рослинного масла, молочна сироватка в виробництві сиру, деревна стружка і тирса і т.п [2].

Перша великомасштабна фабрика білкового концентрату була розроблена спільної фірмою «British Petroleum» (Великобританія) і «Італпротеїн» (Італія) в 1975 р, її продуктивність складала 100000 т рік; сировиною були парафіни. Цією проблемою зайнялася і Японія, були побудовані 8 заводів продуктивністю 1500 т білка / рік. Однак інтерес до виробництва білка одноклітинних організмів в 70-і рр. дещо знизився; через сприятливу сільськогосподарської ситуації тих років, але головним чином через недосконалість технологій, що не видаляють деякі токсичні речовини з кінцевого продукту [3].

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Руда К.А.						
Перевір.		Резніченко Ю.М.					8	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

У країнах ЄС виробляється близько 25 млн т білкових концентратів на рік. Ці цифри говорять про рентабельність підприємств. Корм для худоби стає дорогим через обмеження земельних угідь і по ряду інших причин. Білки одноклітинних організмів мають величезні переваги: високу швидкість відтворення, доступність сировинних джерел, рішення проблем утилізації відходів багатьох підприємств і т. д.

Крім того, білки мають постійний і відтворений склад, їх легко вітамінізувати, додавати необхідні мікроелементи; їх також легко виготовляти у вигляді гранул або таблеток, їх зберігання здійснюється набагато легше, ніж зберігання рослин або інших кормів [2, 3].

Проте, виробники білка не розглядають свою продукцію як заміник білка в раціоні тварин: білкові концентрати служать добавками до кормів, здешевлюючи їх і підвищуючи їх якість. Слід зазначити, однак, що виробництво білкових добавок розвивається не так швидко, як прогнозувалося в 60-70 рр. Справа в тому, що в значній мірі посилилися вимоги до безпеки технологій, які повинні враховувати результати всіх необхідних токсикологічних та харчових випробувань.

Особливо обережними слід бути в питаннях застосування білкових концентратів в харчуванні людини. Однак їх використання для вирішення проблеми харчування людства не має альтернативи, оскільки прогнози свідчать про те, що кількість продукції не відповідає в повній мірі приросту населення. Можна з упевненістю сказати, що освоєння мікроорганізмів в харчуванні людини тільки починається.

Мікроорганізми почали використовувати у виробництві білкових продуктів задовго до виникнення мікробіології. Досить згадати всілякі різновиди сиру, а також продукти, що отримуються шляхом ферментації соєвих бобів. І в першому, і в другому випадку поживною основою є білок. При виробленні цих продуктів, за участю мікробів, відбувається глибока зміна властивостей білоквмісної сировини [3].

В результаті отримують харчові продукти, які можна довше зберігати (сир) або зручніше споживати (соєвий сир). Мікроби грають роль у виробництві деяких м'ясних продуктів, призначених для зберігання. Так, при виготовленні деяких сортів ковбаси використовується кислотне бродіння, зазвичай за участю комплексу молочнокислих бактерій. Новоутворена кислота сприяє подовженню терміну зберігання продукту і робить внесок у формування його особливого смаку.

Цим, мабуть, і обмежується використання мікроорганізмів у переробці білків. Можливості сучасної біотехнології в цих виробництвах невеликі, за винятком сироваріння. Інша справа – вирощування і збір мікробної маси, що переробляється в харчові продукти: тут біотехнологія може проявити себе у всій повноті [1-4].

Виходячи з цього актуальним залишається використання відходів виробництва харчової, сільськогосподарської та нафтохімічної промисловостей для отримання білків, цим самим є можливість скоротити цих кількість відходів, знайшовши їм економічно вигідне вторинне використання та отримання поживних білкових концентратів для використання у харчуванні людей та тварин.

РОЗДІЛ 1. ОПИС ГОТОВОЇ ФОРМИ МІКРОБНОГО БІЛКА

Найбільш дефіцитним компонентом їжі у вищих організмів є білок, особливо з високою біологічною цінністю, тобто тваринного походження. Світова потреба у білку нині задовольняється лише на 40%. Із зростанням населення потреба в протеїні збільшиться, при цьому дефіцит кормового білка зросте в 1,5 рази [4].

Технологія отримання мікробного білка є в даний час найбільш великотоннажною галуззю біотехнології, що виробляє найважливіші кормові препарати і білкові добавки для тваринництва, звірівництва, птахівництва, рибництва, а також білок харчового призначення з використанням різноманітної сировини і субстратів [4].

Серед таких кормових білків є продукт отриманий на відходах молочного виробництва з використанням дріжджів *Kluyveromyces fragilis*. Одним із торгових марок даного кормового білка є - гідролізат дріжджів *Kluyveromyces fragilis* під назвою TechnoYeast® від фірми BioChem Німеччина [4-7].

Готовий продукт TechnoYeast® являє собою висушений гідролізат дріжджів що проявляє пребіотичні властивості. TechnoYeast® - порошок світло-жовтого до бурого кольору, що має специфічний запах і смак (рис 1.1.) [4].

Даний мікробний білок має імуномодулювальну дію, що сприяє зміцненню імунітету у тварин, що в свою чергу допоможе запобігти низці захворювань худоби.

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Опис готової форми мікробного білка	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Руда К.А.						
Перевір.		Резніченко Ю.М.					11	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



Рис. 1.1. Кормовий білок на основі дріжджів *Kluyveromyces fragilis* TechnoYeast®

Серед переваг використання TechnoYeast® слід виділити наступне: стимулює засвоєння корму, в порівнянні з іншими кормовими білками, корм являється легкозасвоюваним джерелом білка, має високий вміст білка та проявляє виражені пребіотичні ефекти [5-6].

Гідролізовані дріжджі TechnoYeast є високоякісним джерелом протеїну, який збільшує споживання корму та позитивно впливає на здоров'я шлунково-кишкового тракту. Штам дріжджів *Kluyveromyces fragilis* був спеціально відібраний для відгодівлі тварин і характеризується високою якістю (продукт відповідає стандарту ЄС G/SPS/N/EU/246) і доступною ціною в порівнянні з конкурентами.

Останні дослідження показують [6], що ефект стимуляції апетиту TechnoEeast може мати особливо позитивний вплив на споживання корму молодого худобою. На критичних етапах, таких як відлучення поросят, TechnoEeast може сприяти нормальній адаптації та подальшого збільшення продуктивності тварин.

Сфера застосування: Даний препарат рекомендований до використання при відгодівлі великої рогатої худоби, свиней, курей та для рибних господарств [4].

Форма випуску: випускають у поліетиленових пакетах які поміщенні у паперовий крафт пакет, маса одного мішка – 5 кг.

Умови зберігання: зберігати в сухому приміщенні, при температурі не вище +25 °С та відносній вологості не вище 60 %. Термін придатності – 6 місяців.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ *KLUYVEROMYCES FRAGILIS*

2.1. Обґрунтування вибору продуцента мікробного білка

Найважливішим питанням при розробці нових технологій отримання мікробного білка одноклітинних є доступність сировинної бази. Доступність сировини – це наявність різних резервних варіантів, що дозволяють оперативно замінювати і використовувати різні джерела сировини без суттєвої зміни якості отриманого продукту. У сучасних промислових процесах використовують як чисту сировину постійного хімічного складу, так і комплексні сполуки, включаючи відходи різних виробництв. Останнє економічно найвигідніше і має величезне значення для охорони навколишнього середовища. Одним із таких відходів є молочна сироватка – побічний продукт молочного виробництва [5].

Відомо, молочна сироватка є майже ідеальним субстратом для багатьох продуцентів при отриманні ферментних препаратів та мікробних білків. Особливу увагу слід приділити дріжджам *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, який використовують для отримання, етанолу ферменту галактозидази та мікробного білку на основі біомаси [5-8].

Для вибору біологічного агента візьмемо для порівняння чотири штами *Kluyveromyces fragilis* з різними поживними середовищами та параметрами, характеристика яких наведена у табл. 2.1.

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Руда К.А.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					14	6
Реценз.						Кафедра БТМ –		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 2.1

Особливості одержання мікробного білку на суміші середовищ на основі молочної сироватки

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	Концентрація білку, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л					
<i>K. marxianus</i> GQ 506072	Молочна сироватка	1000 г	36	15,9 г/л	4,5 г/л	Використання 15 л ферментера з 10 л середовища, яке складається із 100 відсотків сирної сироватки. Ферментацію проводили при низькому рН (3,5) і високій температурі (40 °C), щоб мінімізувати ймовірність забруднення сторонньою мікрофлорою	Yadav, J. S., Bezawada, J., Elharche, S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by <i>K. marxianus</i> . <i>Bioprocess and biosystems engineering</i> , 37(6), 1017–1029. https://doi.org/10.1007/s00449-013-1072-6 .
<i>Kluyveromyces fragilis</i> 71-78	Молочна сироватка (NH ₄) ₂ SO ₄ KH ₂ PO ₄	980 5 5	17	6,21 г/л	2,5 г/л	Температура культивування - 34°C при швидкості обертання мішалки 300 хв-1, ступінь аерації 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища в хвилину, Ферментація проводиться упродовж 17 годин. рН – 5.3	Silva, Caio & Castro-Goméz, Raul. (1995). Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura <i>Kluyveromyces Fragilis</i> . <i>Semina: Ciências Agrárias</i> . 16. 10.5433/1679-0359.1995v16n1p17.
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 64884	Молочна сироватка (після електроактивації силою струму 900 мА протягом 60 хв) Лактоза Лактулоза Галактоза	70 30 15 2,55	96	4,23 г/л	1,48 г/л	Ферментація проводиться упродовж 96 годин. рН – 5.3 при температурі 30 °C швидкість перемішування 150 rpm.	Karim, Ahasanul & Aider, Mohammed. (2021). Bioconversion of Electro-Activated Lactose, Whey and Whey Permeate to Produce Single Cell Protein, Ethanol, Aroma Volatiles, Organic Acids and Fat by <i>Kluyveromyces Marxianus</i> . <i>SSRN Electronic Journal</i> . 10.2139/ssrn.3952371.

Розглянуті продуценти мають дуже схожий склад поживного середовища, тому для подальшого вибору біологічного агента потрібно опиратись на кількість утвореного протеїну, тривалість та складність технологічного процесу та на літературні дані щодо ефективності використання даних продуцентів.

У порівнянні з рештою штамів штам малий вихід протеїну (2,5 г/л) у штаму *Kluyveromyces fragilis* 71-78 та *K. marxianus* ATCC 64884 [6-7].

Більш високою продуктивністю володіють штам *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972 з виходом по протеїну 4,5 г/л.

Основним фактором при виборі продуцентів з схожими поживними середовищами є економічні показники, оскільки біотехнологія передбачає здешевлення технологічних процесів при максимальній продуктивності продуцентів, тому необхідно порівняти ціни поживних середовищ для отримання мікробного білку.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування для продуцентів кормового білку, на відходах молочного виробництва

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)*
<i>K. marxianus</i> GQ 506972	Молочна сироватка	1000 г	6,8	6,8	1
	Вартість 1 л середовища – 6,8 грн				
<i>Kluyveromyces fragilis</i> 71-78	Молочна сироватка	980	6,8	6,66	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	50	0,25	2
	KH ₂ PO ₄	5	200	1,00	4
	Вартість 1 л середовища – 7,91 грн				
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 64884	Молочна сироватка	70	6,8	0,476	1
	Лактоза	30	120	3,6	2
	Лактулоза	15	1174	17,61	3
	Галактоза	2,55	350	0,89	4
	Вартість 1 л середовища – 22,57 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на січень 2023 р. 1 - www.kiev.flagma.ua, 2 - <http://prom.ua>, 3 - https://www.vito-house.com.ua/catalog/laktuloza_poroshok_italiya_25_kg/ 4 - <https://snabhim.com.ua/>

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *Kluyveromyces marxianus* ATCC 64884 є найдорожчим та майже у 3 рази дорожчим, ніж *Kluyveromyces fragilis* 71-78, найдешевшим середовищем є поживне середовище для вирощування *K. marxianus* GQ 506972. Враховуючи

те, що розглянуті продуценти синтезують різну кількість білку за різну тривалість культивування, необхідно для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 г синтезованого кормового білку, на відходах
молочного виробництва**

Біологічний агент	Концентрація білку, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного білку за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>K. marxianus</i> GQ 506972	4,5 г/л	36	0,125	6,8	1,5
<i>Kluyveromyces fragilis</i> 71-78	2,5 г/л	17	0,147	7,91	3,16
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 64884	1,48 г/л	96	0,015	22,57	15,25

Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість утвореного білку, синтезованих штамами *Kluyveromyces fragilis* 71-78 та *K. marxianus* GQ 506972, є найнижчою (3,16 та 1,5 грн/г відповідно), тому враховуючи викладене вище для отримання мікробного білку будемо використовувати штам *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972, він є штамом з найбільшою продуктивністю.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

Kluyveromyces fragilis

Колонії *Kluyveromyces fragilis* мають кремовий або коричневий колір із випадковою рожевою пігментацією внаслідок вироблення хелатного пігменту заліза, пульчеріміну. Клітини виглядають овальними, еліпсоїдними або циліндричними, розміром 2-6 x 3-11 мкм. Для дріжджів *K. fragilis* характерне розмноження багатостороннім брунькуванням на вузькій основі, здатність утворювати псевдоміцелій, істинний міцелій відсутній. Аски формуються із зигот або диплоїдних клітин. Утворюють ниркоподібні аскоспори розміром (1,1–1,8) мкм, які розміщені по 1-4 в асці (Рис. 2.1) [9].

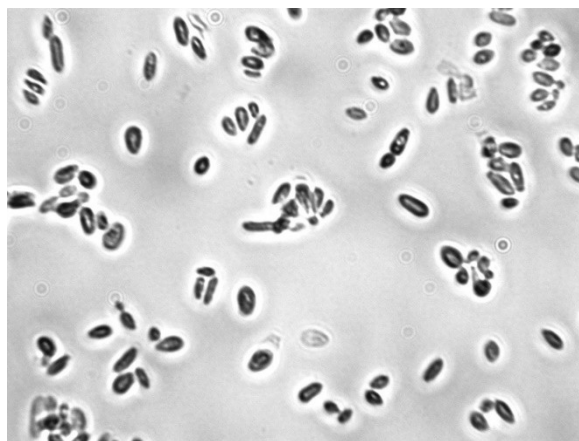


Рис. 2.1. Мікрофотографія *Kluyveromyces fragilis*

У бульйоні глюкозно-дріжджового екстракту росте, утворюючи кільце, що складається з осаду (Рис. 2.2). Може утворюватися тонка плівка. *K. fragilis* утворює рудиментарний або розгалужений псевдоміцелій з невеликою кількістю бластоспор [5, 9].



Рис. 2.2. Колонії *Kluyveromyces fragilis* на поживному середовищі

Kluyveromyces fragilis – це аеробні дріжджі, здатні до дихально-ферментативного метаболізму, який складається з одночасного генерування енергії як від дихання через цикл ЦТК, так і від етанолового бродіння. *K. fragilis* зброджує інулін, глюкозу, галактозу, сахарозу та лактозу в етанол, не зброджують рафінозу, мальтозу, трегалозу, целlobіозу, мелецитозу. Асимілюють D-глюкозу, інулін, сахарозу, рафінозу, лактозу, не асимілюють мальтозу, трегалозу, розчинний крохмаль, також здатний використовувати кілька вуглецевих субстратів у водночас робить його дуже придатним для промислового використання, широко використовується в промисловості

через його здатність споживати лактозу. Оптимальна температура росту (35 – 40)°C, оптимум рН 4,0 – 6,0 [9-10].

2.3. Таксономічний статус *Kluyveromyces fragilis*

Дріжджі – група одноклітинних грибів, які втратили міцеліальну будову внаслідок переходу до проживання у рідких і напіврідких субстратах, багатих на органічні речовини. Об'єднує більше 2000 видів, що належать до аскоміцетів і базидіоміцетів та домінують серед грибів у водних середовищах [10, 11]. Щоб класифікувати *Kluyveromyces fragilis*, необхідно проаналізувати дані наведені в MycoBank – проєкту, що виконує функцію реєстрації та зберігання відомостей про мікологічну номенклатуру грибів, а також пов'язаних з нею даних, на кшталт описів та ілюстрацій нових таксонів.

Згідно авторством Van der Walt в його роботі про класифікацію *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces* і *Wingea*, яку MycoBank використовує як основну працю для систематики *Kluyveromyces fragilis* та класифікує їх наступним чином [11, 12]:

Царство:	<i>Fungi</i> ;
Підцарство:	<i>Dikarya</i> ;
Тип:	<i>Ascomycota</i> ;
Підтип:	<i>Saccharomycotina</i> ;
Клас:	<i>Saccharomycetes</i> ;
Підклас:	<i>Saccharomycetidae</i>
Порядок:	<i>Saccharomycetales</i>
Родина:	<i>Saccharomycetaceae</i> ;
Рід:	<i>Kluyveromyces</i> ;
Вид:	<i>K. fragilis</i> .

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА

3.1. Потреба в мікробному білку

Даний розділ присвячено визначенню потреби в кормовому білку, що одержується культивуванням *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972 у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6, для забезпечення кормовим білком поголів'я поросят у Херсонській області.

Особливості використання кормового білка

Сучасний етап розвитку виробництва кормів в Україні характеризується нераціональним, розбалансованим раціоном і наднормативними витратами кормів при утриманні сільськогосподарських тварин, відсутністю раціональних, економічно обгрунтованих систем їх відгодівлі. Низька продуктивність, що спостерігається внаслідок вищевказаних факторів, зумовлює збитковість тваринництва, відсутність бізнесового інтересу та перспектив для розвитку цієї стратегічної галузі сільського господарства [13].

Відомо, що економічно вигідним м'ясне скотарство й свинарство може бути за умови, якщо конверсія корму при відгодівлі ВРХ та свиней знаходиться в межах 8-8,5 і 4-4,5 корм.од. відповідно. Досягти оптимальної продуктивності використання кормів (відношення одиниці виробленої продукції до витрат кормів) можна тільки інтенсивним способом, що передбачає збалансовану високобілкову годівлю сільськогосподарських тварин [13].

В результаті зростання населення в усьому світі, економічного розвитку та урбанізації, а також збільшення кількості білкових дієт, споживання м'яса зросло в геометричній прогресії за останні 50 років, досягнувши понад 328 мільйонів метричних тонн у 2021 році.

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування мікробного білка	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Руда К.А.							
Перевір.		Резніченко Ю.М.					20	8	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

Крім того, ООН прогнозує, що до 2050 року попит на білок зросте більш ніж на 50% порівняно з рівнем 2020 року. Однак інфляція через конфлікти в усьому світі підвищує ціни на м'ясо та зернові, які використовуються як корм для тварин. Через зростання імпорتنих цін на ці товари спостерігається ризик продовольчої безпеки в ЄС [14].

Дефіцит протеїну у раціоні тварин призводить до зниження перетравності поживних речовин, розладів фізіологічних процесів, зниження апетиту, падіння продуктивності, зменшення кількості вироблених організмом антитіл та зниження опірності до інфекції, погіршення відтворних функцій організму, підвищення витрат кормів на одиницю продукції [15].

Забезпечення жуйних тварин протеїном вирішують за рахунок використання високобілкових кормів таких як сіно бобових, сінажу, зерна бобових культур, в тому числі макух і шротів. Для свиней та птиці, використовують білкові концентрати (шрот олійних рослин і макухи), рибне борошно, м'ясне борошно, сушена кров, а також молочні продукти.

Протеїнові добавки це кормові засоби, які містять понад 20% протеїну чи його еквівалента. Одержують їх з тваринних, рослинних, мікробних джерел або шляхом промислового мікробного синтезу. Особливу увагу необхідно уділяти по кількості та якості протеїну в годівлі високопродуктивних корів та моногастричних тварин. При цьому необхідно враховувати, що протеїнові добавки вище за ціною, ніж зерно злакових і бобових. У зв'язку з цим важливо застосовувати різні методи оптимізації протеїнового (амінокислотного) живлення тварин з метою ефективного використання кормів.

У клітинах дріжджів наявні всі поживні речовини – повноцінний білок, вуглеводи, жири, мінеральні речовини, комплекс вітамінів, ферментів та інших біологічно активних речовин. Протеїн дріжджів за біологічною цінністю переважає рослинні білки і наближається до білків тваринного походження. Енергетична цінність їх подібна до зернових кормів, а за

вмістом протеїну вони їх значно переважають: 1 кг сухих гідролізних дріжджів містить 11–14 МДж обмінної енергії та близько 45% протеїну.

Сухі кормові дріжджі використовують переважно в комбікормовій промисловості при виробництві комбікормів для птиці, свиней, телят, ягнят у кількості до 7% від маси комбікорму [15].

Отже, збільшена потреба у ряді поживних речовин для тваринництва обумовлює актуальність виробництва шляхом мікробного синтезу кормового білка, отриманого на відходах молочного виробництва з використанням дріжджів *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972.

3.2. Розрахунок річної потреби мікробного білка

Згідно даних Державної служби статистики в Україні, кількість свиней у господарствах населення станом на 2022 рік становила 2 031 900 [16].

Одним із торгових марок аналогічного кормового білка є гідролізат дріжджів *Kluyveromyces fragilis* під назвою TechnoYeast® від фірми BioChem Німеччина [4, 5-7]. Готовий продукт TechnoYeast® являє собою висушений гідролізат дріжджів що проявляє пребіотичні властивості. TechnoYeast® - порошок світло-жовтого до бурого кольору, що має специфічний запах і смак [4].

У зв'язку з тим, що певну нішу в ринку кормових білкових препаратів займає вказаний продукт, приймаємо, що кормовим білком власного виробництва будемо покривати потребу Херсонської області – 18 000 голів [16].

Інтенсивна технологія ведення свинарства вимагає певної структури стада, в якому частка відлучених поросят складає 32,7% [17]. То у поголів'ї із 18 000 свиней частка відлучених поросят буде:

$$\frac{18\,000 \times 32,7}{100} = 5\,886 \text{ голів.}$$

Добова потреба у комбікормі для поросят вагою від 10 до 35 кг становить від 0,6 кг/голову [18].

То 5 886 поросят споживають таку кількість комбікорму:

$$0,6 \times 5\,886 = 3\,531,6 \text{ кг.}$$

Якщо комбікорми містять до 7% сухих кормових дріжджів [15], розрахуємо їх частку в 3 531,6 кг корму:

$$\frac{3\,531,6 \times 7}{100} = 247,2 \text{ кг.}$$

Стартовий період вирощування молодняка поросят триває з 42 по 77 день життя – тобто, 35 днів [19]. Тому приймаємо, що будемо вводити дріжджі *K. marxianus* GQ 506972 до раціону поросят протягом 35 днів.

Тоді за 35 днів 5 886 поросят на відгодівлі споживають:

$$35 \times 247,2 = 8\,652 \text{ кг дріжджів.}$$

Вміст сирого протеїну у складі кормових дріжджів не менше 45 % [20].

То у складі 8 652 кг дріжджів міститься:

$$\frac{8\,652 \times 45}{100} = 3\,893,4 \text{ кг білка.}$$

Відповідно до проведеного розрахунку, з метою забезпечення річної потреби у кормовому білку для 5 886 голів поросят на відгодівлі у Херсонській області необхідно 3 893,4 кг білка *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972.

3.3. Розрахунок потужності виробництва білка *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972

Протягом 36 годин культивування *K. marxianus* GQ 506972 отримували 4,5 г/л білку [7]. Тоді слід розрахувати об'єм культуральної рідини, необхідний для одержання 3 090 кг білка:

$$x = \frac{3\,893,4}{0,0045} = 865\,200 \text{ л}$$

Враховуючи загальні втрати цільового продукту при виробництві 10 %, необхідно культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 865\,200 \text{ л} / (1 - 0,1) = 961\,333,3 \text{ л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 305. Тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 961\,333,3 / 305 = 3\,152 \text{ л}$$

Далі визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{\text{ц}} = V_{\text{кр}} / ((V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}})/24) = 961\,333,3 / ((3\,152 \times 42)/24) = 174 \text{ цикли,}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 36 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{\text{крц}}$):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \times 3\,152 \times 42 / 24 \approx 6000 \text{ л,}$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Геометричний об'єм ферментера для отримання 6000 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{\text{Г}} = V_{\text{крц}} / K_{\text{зап}} = 6000 / 0,6 = 10\,000 \text{ л} = 10 \text{ м}^3,$$

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

3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 10 м³

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 6 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

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

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{6}{1 - 0,1} \approx 6,6 \text{ м}^3$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 6,6 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 6,6 / 0,6 = 11 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{6,6}{10} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{6,6}{1 + 0,1} = 6 \text{ м}^3$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ м}^3$$

3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 1 м³

Для одержання 600 л культуральної рідини кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{600}{1 - 0,1} = 666,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 666,6 / 0,6 = 1111 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 1 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{666,6}{1000} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{666,6}{1 + 0,1} = 606 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 666,6 - 606 = 60,6 \text{ л}$$

3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 100 л

Для одержання 60,6 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{60,6}{1 - 0,1} = 67,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 67,3/0,6 = 112 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 100 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{67,3}{100} = 0,67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{67,3}{1 + 0,1} = 61,3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 67,3 - 61,3 = 6 \text{ л}$$

3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л

Для одержання 6 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{6}{1 - 0,1} = 6,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 6,6/0,6 = 11 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 10 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{6,6}{10} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{6,6}{1 + 0,1} = 6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ л}$$

3.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Таку кількість інокуляту як 0,6 л можна одержати культивуванням у колбах на качалці (4 колби об'ємом 750 мл по 150 мл посівного матеріалу). Для даного культивування поживне середовище стерилізуватимемо в автоклаві.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу мікробного білку у ферментері об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ МІКРОБНОГО БІЛКА

4.1. Катаболізм ростового субстрату у *Kluyveromyces fragilis*

Kluyveromyces fragilis здатний зброджувати інουλін, глюкозу, сахарозу та лактозу [5].

При описі метаболізму був використаний веб-ресурс KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), і як приклад було взято замість *Kluyveromyces fragilis* (який станом на 12. 2022, був відсутній) *Kluyveromyces marxianus*, так як даний також використовується для отримання білкової біомаси з відходів сироватки [21].

Якщо в середовищі наявна глюкози, то її метаболізм відбувається шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса. Ключовим ферментом у гліколізі що бере участь у перетворенні глюкози до фруктозо-1,6-дифосфату є 6-фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11), дані реакції пов'язані з витратами АТФ. Подальше перетворення у гліколізі 1,3-дифосфогліцерату на 3-дифосфогліцерат відбувається під дією ферменту фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3), це перетворення спряжене з фосфорилуванням АДФ і утворенням АТФ. Кінцевою стадією гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату до пірувату під дією піруваткінази (КФ.2.7.1.40), ця реакція є другим пунктом утворення АТФ на рівні субстрату у гліколізі [21, 22].

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4.Біосинтез мікробного білка	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Руда К.А.					28	3
Перевір.		Резніченко Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

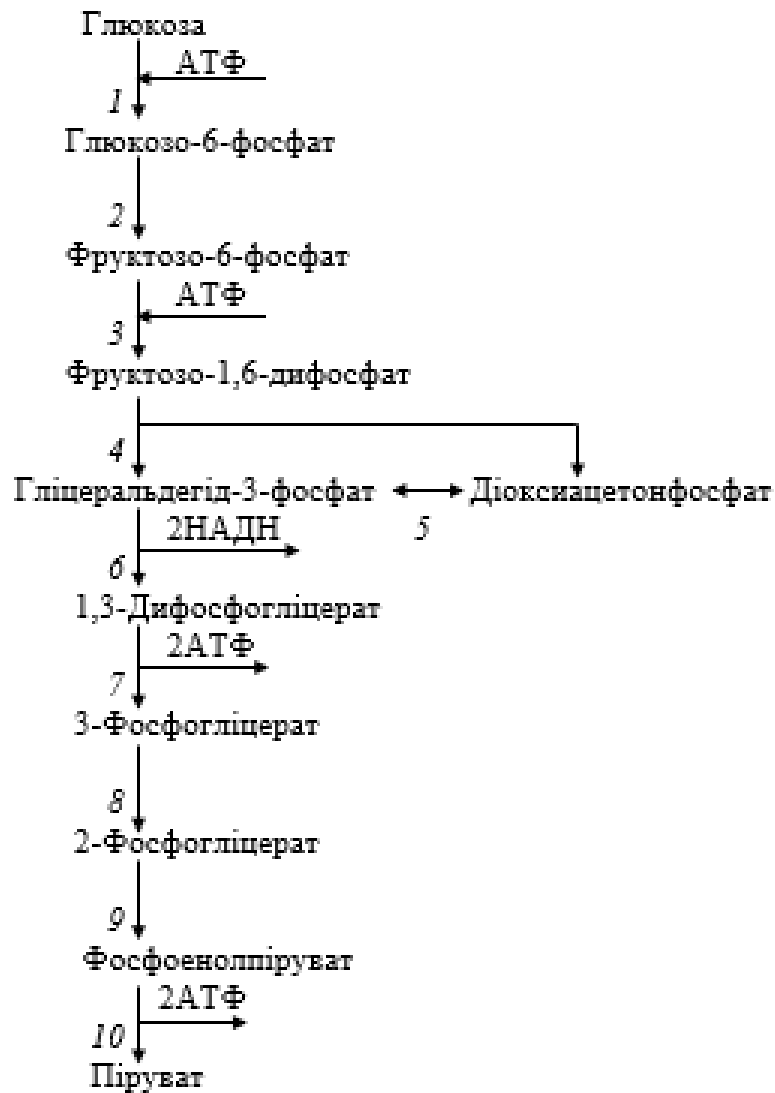


Рис.4.1. Шлях окиснення глюкози (гліколіз) [22].

Ферменти: 1 – гексокіназа; 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза; 3 – фосфофруктокіназа; 4 – фруктозодифосфатальдолаза; 5 – триозофосфатізомераза; 6 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; 7 – фосфогліцераткіназа; 8 – гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза; 9 – енолаза; 10 – піруваткіназа.

4.2. Біотрансформація ростового субстрату в мікробний білок

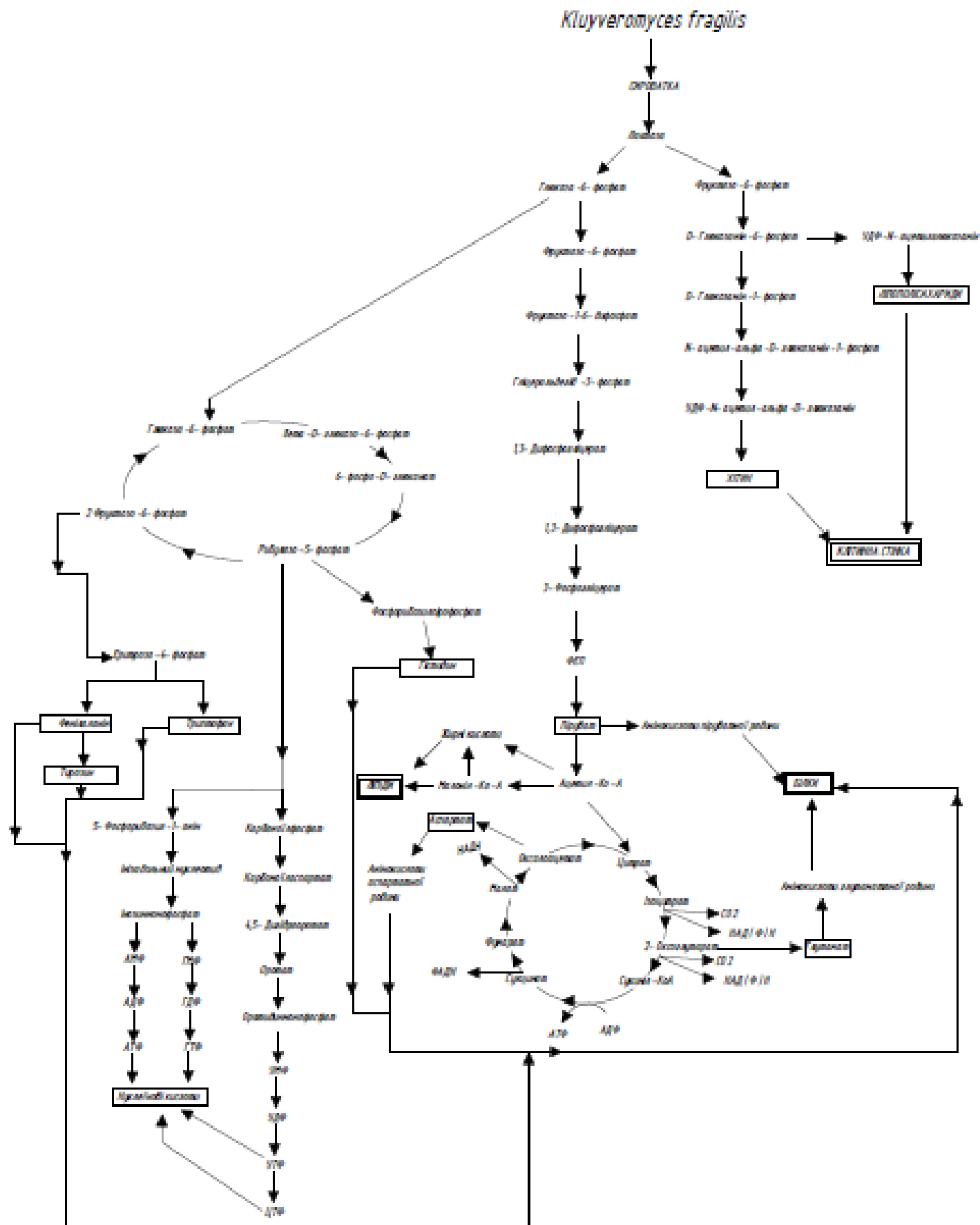


Рис. 4.2. Схема біотрансформації молочної сироватки [21].

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ МІКРОБНОГО БІЛКА

5.1. Вибір умов і способу культивування продуцента мікробного білка

Спосіб проведення культивування відіграє важливу роль в процесі вирощування мікроорганізмів. Розрізняють такі види аеробного культивування: періодичне, безперервне; глибинне та поверхнєве (на рідких і щільних середовищах); стерильне та умовно стерильне та ін [7, 8].

При періодичному культивуванні клітини поміщають в закриту посудину певного обсягу, що містить живильне середовище, і задають початкові умови. Поступово збільшується щільність популяції, знижується концентрація поживних речовин і накопичуються продукти обміну, тобто умови існування мікроорганізмів змінюються. Періодичну культуру зазвичай розглядають як замкнуту систему, яка переживає різні фази розвитку [9].

Безперервне культивування дозволяє зафіксувати культуру в якійсь певній фазі (зазвичай експоненційній). При цьому склад середовища та умови росту залишаються постійними. Цього домагаються постійним збільшенням нового живильного середовища в посудину для вирощування й одночасним видаленням такої ж кількості середовища з клітинами. Подача свіжого середовища та видалення частини суспензії відбувається з тією ж швидкістю, з якою зростає культура. У цьому випадку встановлюється динамічна рівновага [23].

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми мікробного білка				Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Руда К.А.										
Перевір.		Резніченко Ю.М.									31	29
Реценз.									Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Затверд.		Стабніков В.П.										

Глибинне культивування мікроорганізмів має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування раціональніше використовуються поживні речовини середовищ, що дають можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю [23].

Отже, для культивування *K. marxianus* GQ 506972 ефективніше проводити глибинне культивування, так як мікроорганізм росте на рідкому середовищі та потребує частоті аерації. Також, даний спосіб культивування є економічним.

5.2. Вибір типу ферментера

Всі форми та види ферментаційних систем створюються, маючи за основну мету забезпечення однакових умов для всіх компонентів, що містяться в реакторі. Біореактор повинен бути сконструйований так, щоб виключити можливість потрапляння забруднюючих мікроорганізмів, а також забезпечити збереження потрібної мікрофлори. Об'єм культивуємої суміші повинен залишатися постійним. Рівень розчинного кисню повинен підтримуватися вище критичних рівней керування культури аеробних організмів; параметри зовнішнього середовища, такі як температура, рН та інші повинні постійно контролюватися. Культура при вирощування має добре перемішуватись [9, 23].

Ферментери зазвичай представляють собою герметичні циліндричні ємності, висота яких в 2-2,5 рази перевищує діаметр. Найчастіше їх виготовляють із нержавіючої сталі. Для підтримки температури в апараті є подвійний кожух або теплообмінник типу змійовика.

Головна вимога до апаратів - збереження стерильності, тому вони повинні бути герметичними, всі лінії трубопроводів повинні бути доступні для обробки гарячою парою [24].

Тип ферментерів (біореакторів) для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань. Тому для культивування *K. marxianus* GQ 506972 вибираємо ферментер фірми Solaris серії М якому відбувається аерація, оскільки продуцент є аеробом і потребує кисень [25].



Рис. 5.1. Ферментер фірми Solaris серії М на 10 м³

Культивування *K. marxianus* GQ 506972 передбачається здійснювати глибинним способом в ферментерах періодичної дії. Ферментацію проводили при низькому рН (3,5) і високій температурі (40 °С), щоб мінімізувати ймовірність забруднення сторонньою мікрофлорою. В процесі ферментації

передбачено використання перемішування, так як для проведення культивування *K. marxianus* GQ 506972 потрібно інтенсифікувати масообмінні процеси, тому обраний ферментер необхідно обладнати мішалкою.

Підтримання температури, оптимальної для гарного росту біомаси і прояву їм підвищеної фізіолого-біохімічної активності, забезпечується сорочкою ферментера або системою змійовиків. Змійовики використовуються також для подачі пари в процесі стерилізації або води для охолодження [23-25].

Спостереження за основними процесами життєдіяльності організму здійснюється контрольно-вимірювальною апаратурою, що дозволяє підтримувати на заданому рівні температуру всередині ферментера, рН середовища, тиск в середині ферментера та інші параметри.

Ферментер забезпечений пристосуваннями для перенесення інокуляту, внесення додаткових поживних речовин, необхідних для покращення розвитку продуцента та пристроєм для взяття проб [25-27].

Для забезпечення стерильності процесу ферментації в обраному ферментері передбачено використання торцевих ущільнень валу перемішуючого пристрою з паровим захистом. За допомогою застосування такої конструкції вдається практично повністю запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, що є дуже важливим для збереження асептичних умов культивування [27].

5.3. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Для культивування *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972 слід обирати ферментер, в якому можна реалізувати процес аерації шляхом встановлення барботера, оскільки продуцент є аеробом і потребує кисень [7]. У зв'язку з цим, необхідним є підготовка аераційного повітря для проведення біосинтезу в оптимальних умовах.

Умови реального виробництва впливають на процес стерилізації та зумовлюють підвищені вимоги до фільтруючих матеріалів для забезпечення ефективного очищення повітря [28].

Існує достатня кількість методів забезпечення стерильності повітря – обробка повітря хімічними, фізичними або іншими чинниками. Для біотехнологічних виробництв традиційними методами підготовки повітря є метод фільтрування через перегородки з різних матеріалів. Вибір методу стерилізації повітря в загальному вигляді є вибором фільтруючого матеріалу і способу його фіксації в корпусі фільтра.

Виходячи з теорії стерилізації повітря, для видалення контамінантів використовують волокнисті фільтруючі матеріали з різних мінеральних або органічних речовин, пористі перегородки з кераміки або полімерних матеріалів. Атмосферне повітря завжди містить дрібні тверді або рідкі частинки, які несуть на собі різноманітні мікроорганізми. У містах середня концентрація мікрофлори досягає $10^3 - 10^4$ клітин/м³ (кл/м³). В озелених районах ця концентрація становить $10^3 - 3 \cdot 10^4$ кл/м³. Саме там намагаються розташовувати підприємства тонкого мікробіологічного синтезу.

Основною вимогою, що ставиться до аеруючого повітря, є його стерильність. Звичайні методи очищення, що ґрунтуються на дії відцентрових сил (циклони), інерції (віддільники), промивці (скрубери, пінні апарати), а також електрофільтри, не знайшли розповсюдження, оскільки дозволяють одержувати повітря з коефіцієнтом проскоку $K_p = 3...5\%$. Ці методи застосовують лише для попереднього перед стерилізацією очищення атмосферного повітря.

Для отримання стерильного повітря з належними характеристиками використовують два методи:

- знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання, наприклад, за допомогою УФ-опромінювання,
- вилучення мікрофлори методом фільтрування.

Перший метод є більш надійним та ефективним, але для промислових масштабів є неприйнятним, оскільки у виробничих умовах витрачають занадто великі об'єми повітря, щоб можна було б говорити про економічну доцільність таких рішень.

В промислових умовах використовують в основному метод фільтрування крізь шари насипного, пористого або волокнистого матеріалу. Для попередньої стерилізації використовують глибинні (набивні) фільтри на основі волокнистих матеріалів. Для остаточної стерилізації перед входом у ферментер встановлюють індивідуальні фільтри з розгорнутою поверхнею або абсолютні, які діють як сита, патронного типу. Абсолютні сита, створюють велику втрату тиску повітря й швидко забиваються, тому застосовують їх рідко.

Попри того, що волокна набивного фільтру розташовані між собою на відстанях на порядок більше діаметрів мікрочастинок, вони діють досить ефективно. При великих швидкостях частинки, проходячи шар волоконного фільтру, скоріше або пізніше зустрічають на своєму шляху волокно і затримуються ним (інерційний механізм осадження) [28].

Отже, першим етапом є забір повітря з атмосфери на відстані 2-3 м від найвищої точки будівлі підприємства, щоб знизити ступінь потрапляння дрібних твердих або рідких частинок, які несуть на собі різноманітні мікроорганізми. Подальша підготовка повітря складається з наступних послідовних операцій: очищення повітря від грубих механічних суспензій; попереднє стиснення та кондиціювання повітря до певної температури; тонке очищення повітря від мікроорганізмів і остаточне очищення в індивідуальному фільтрі [29].

Після індивідуального фільтру стерильне повітря одразу надходить до інокуляторів та ферментера.

5.4. Обґрунтування вибору та опис стадій санітарної підготовки виробництва білка

При виборі миючих та дезінфікуючих засобів на будь-якому підприємстві потрібно враховувати, що не можна застосовувати тривалий час один вид дезінфікуючого засобу, бо може виникнути резистентна мікрофлора. Тому слід комбінувати/чергувати різні види миючих засобів. Так, рекомендовано дезінфікуючий засіб змінювати кожні 2 тижні або застосовувати декілька типів.

При виборі підходящого дезрозчину варто орієнтуватися на ціну (економічність), ефективність проти різних форм мікроорганізмів (бактерицидна та фунгіцидна дії), доступність та можливу токсичність. Використовуваний засіб не повинен згубно впливати на організм людини, або потрібно використовувати його в такій концентрації, яка не шкодить здоров'ю працюючого персоналу [30, 31].

Обробка технологічних поверхонь

Перекис водню (H_2O_2)

Робоча концентрація: Розчини перекису водню для дезінфекції можуть мати концентрацію від 3% до 30%. Для поверхневої дезінфекції зазвичай використовують розчини з концентрацією 3% [32].

Норми витрат: Норми витрат залежать від потреби, але зазвичай для ефективної дезінфекції достатньо використовувати достатню кількість розчину для покриття всіх поверхонь та обладнання.

Хлорамін-Б

Хлорамін Б – натрієва сіль хлораміду монобензолсульфо кислоти, антимікробний препарат, дезінфектант з бактерицидним, віруліцидним та фунгіцидним ефектами. Виглядає як порошкоподібна маса, що складається з кристалів. Колір – білий/світло-жовтий, запах – слабкий хлорний. Вміст активного хлору – приблизно чверть основної маси (24-27 %) [33].

Цей засіб бактерицидно активний стосовно грампозитивних та грамнегативних бактерій (зокрема, до мікробудників туберкульозу).

Віруліцидний вплив має на збудників поліомієліту, гепатиту В і ВІЛ, а фунгіцидний – на збудників молочниці та шкірних мікозів. Також застосовується при особливо небезпечних інфекціях, таких як: чума, холера і злостісний карбункул. Отож, деззасіб "Хлорамін Б" досить ефективно діє по відношенню до: бактерій (у т.ч. до мікробактерій туберкульозу); різноманітних вірусів; грибків роду Кандіда; дерматофітів; сибірської виразки; чуми; холери тощо.

Цю речовину використовують у вигляді дезінфікуючого розчину (як активованого, так і неактивованого) для:

- профілактики, поточних і остаточних дезінфекційних заходів (обробка різних типів поверхонь, зокрема, твердих меблів, салонів ТЗ, санітарної техніки, постільної білизни, харчового та лабораторного посуду, інвентарю для прибирання, предметів, що оточують хворих, іграшок тощо);
- вилучення залишків біорідин;
- генеральних прибирань у медичних і дитячих закладах;
- дезінфекції медінструменту, зокрема, стоматологічного з низьковуглецевої сталі, а також виробів з металу, каучуку, пластику і скла.

Хлорамін Б призначається для обробки різноманітних поверхонь у приміщеннях, посуду, медичного та санітарно-технічного обладнання, постільної білизни, предметів догляду за хворими, іграшок, прибирального обладнання при проведенні дезінфекцій (це може бути дезінфекція для профілактики, поточна або завертальна дезінфекція в інфекційних вогнищах). Хлорамін Б використовується в дитячих та лікувально-профілактичних установах, підприємствах громадського харчування, на комунальних об'єктах, а також при проведенні генеральних прибирань у школах, санаторіях та інших громадських закладах.

Слабкі робочі розчини даного препарату до 1 % не подразнюють шкіру навіть при багаторазових впливах, але розчини понад 1 % можуть викликати сухість шкіри, а у формі аерозолі подразнюють слизові оболонки очей та органів дихання [33].

Робоча концентрація: Для обробки робочих поверхонь та обладнання розчин хлораміну-Б зазвичай готується в концентрації до 1%.

Норми витрат: Норма витрати засобу при протиранні - 150 мл / м² поверхні, при використанні розчину з миючим засобом - 100 мл / м² при зрошенні - 300 мл / м². Після закінчення дезінфекції санітарно-технічне обладнання промивають водою, приміщення провітрюють до зникнення запаху хлору.

Ця субстанція належить до 3-го класу небезпеки за ступенем впливу на людський організм, до якого проникає через органи дихання, шкіру (може також випадково потрапити всередину). У порошкоподібному вигляді подразнює шкірні покриви і слизові оболонки очей. [31, 33].

Новохлор-екстра

Робоча концентрація: Готують розчин концентрацією 0,5% - 910 мл засобу на 10 л робочого розчину.

Норми витрат: Поверхні протирають ганчір'ям, змоченим у розчині засобу із розрахунку 100 мл / м². Час знезараження – 30 хв [34].

Новохлор-екстра є універсальним дезінфекційним засобом, який містить гіпохлорит натрію та допоміжні компоненти, такі як мийні, ароматизуючі та антикорозійні компоненти. Він ефективний проти широкого спектра мікроорганізмів та відноситься до помірно небезпечних речовин.

Особливість цього засобу полягає в тому, що його розчини з вмістом активного хлору від 0,01% до 0,1% можуть застосовуватися в присутності осіб, які не причетні до проведення дезінфекційних робіт. Це робить його практичним для використання в областях, де потрібна регулярна дезінфекція, таких як медичні заклади, громадські приміщення та інші.

Також важливо відзначити, що розчини Новохлор-екстра не ушкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, деревини, кераміки та різних покриттів. Це робить його універсальним засобом для використання в різних сферах, включаючи виробничі приміщення, медичні

установи, громадські місця та інші. Можна використовувати як вручну, так і для системи інтенсивного миття та роботи. [31, 35].

Обробка обладнання та миття резервуарів

Також, для обробки обладнання та миття резервуарів пропонується використовувати розчин Escalab та каустичну соду. Обробляти обладнання цими засобами можна здійснювати за допомогою CIP- мийки, а не вручну, бо це більш економічний метод (витрати миючих засобів для одного циклу становить 20%-30%, а вручну 50% об'єму) [30].

Каустична сода

Обидва засоби є ефективними для цієї мети, проте кальцинована сода вважається менш небезпечною для використання, оскільки вона відноситься до 3-го класу небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007, у той час як каустична сода відноситься до 2-го класу небезпеки. Однак каустична сода має кращі мийні та бактерицидні властивості, тому для забезпечення максимальної ефективності стерилізації, кращим вибором буде саме вона.

Таким чином, для обробки обладнання рекомендується використовувати розчин каустичної соди. На відміну від ручної обробки, яка може бути часо- та працезатратною, пропонується використовувати систему миття CIP. Ця система є більш ефективною та економічно вигідною, оскільки дозволяє значно зменшити витрати миючих засобів.

Ефективність застосування каустичної соди: 2-5% водний розчин вбиває більшість вегетативних форм мікробів. 5% розчин вбиває мікробів сибірської виразки через 2 години, 10% розчин через 1 годину, а 30% через 10 хвилин. Розчин соди каустичної вбиває вірус ящура і холери свиней, збудників холери птахів і багатьох паразитів тварин в приміщеннях [36]. Отже, будемо використовувати 30% розчин соди.

Біомой

Склад: алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0-8,0%; лужна протеаза 1,0-1,1 (діючі речовини)%; натрію карбонат; диспергатор; наповнювач [37].

Призначення: Достерилізаційне очищення виробів медичного призначення із металу, скла, гуми та полімерних матеріалів (включаючи жорсткі та гнучкі ендоскопи, медичні інструменти до гнучких ендоскопів, стоматологічні та хірургічні інструменти). Миття поверхонь приміщень, підлоги, предметів догляду за хворими, предметів інтер'єру тощо. Миття об'єктів навчально-виховних закладів, об'єктів комунально-побутового призначення, підприємств парфумерно-косметичної, мікробіологічної, харчової, переробної і фармацевтичної промисловості, закладів ресторанного господарства і торгівлі, перукарень, косметологічних салонів, аптек, місць тимчасового проживання, на транспорті.

Токсичність та безпечність: Біомой, належить до помірно небезпечних речовин при введенні у шлунок (3 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). Не виявляє шкірно-резорбтивних, шкірно-подразнювальних та сенсibiliзуючих властивостей. У нативній формі (порошок) спричиняє подразнення слизової оболонки очей та верхніх дихальних шляхів. У рекомендованих до застосування концентраціях не подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Не виявляє мутагенних, канцерогенних та ембріотоксичних властивостей (за діючою речовиною). Використання робочих розчинів Біомой для ручного та механізованого достерилізаційного очищення виробів медичного призначення, враховуючи відсутність у його складі летких компонентів, не становить загрози надходження компонентів засобу у повітря робочої зони.

Робоча концентрація: Робочий розчин Біомой зазвичай має концентрацію 0,3%. Робочий розчин Біомой використовують протягом доби після виготовлення за умов зберігання його кольору. Допускається зберігати невикористаний робочий розчин протягом 14 діб за умов зберігання у тарі зі щільно закритою кришкою.

Норми витрат: 100 мл / м² [37].

Крім того, для чистки на місці (CIP) у фармацевтичному технологічному обладнанні, включаючи змішувачі трубопроводів, псевдозріжені шари, резервуари та ємності для зберігання, можна також використовувати м'який лужний миючий засіб Ecolab COSA CIP 90. Цей засіб містить поверхнево-активну речовину і майже нейтральна формула, що дозволяє чистити обладнання як вручну, так і за допомогою системи CIP. Він підтримується повним пакетом валідації, включаючи методи визначення прийнятних залишкових рівнів і аналітичні методи кількісного визначення залишків, що робить його надійним і безпечним використанням у фармацевтичній промисловості. [31, 38].

Обробка рук персоналу

Серед найпопулярніших можна виділити «Стериліум», розчин рецептури «С-4», 76% розчин етилового спирту та «Неостерил М». Однак, з урахуванням регулярності обробки рук та їхнього здоров'я, варто надавати перевагу найбільш безпечним для шкіри засобам.

«Стериліум», зі складом, що містить 2-пропанол, 1-пропанол та мететроній етилсульфат, відзначається м'якістю та високою ефективністю в боротьбі з мікроорганізмами на шкірі. Він зменшує кількість транзиторної мікрофлори шкіри вдвічі за 30 секунд, зберігаючи свою дію до 1 години. Не подразнює та не порушує водно-жировий баланс шкіри, володіє бактерицидною та фунгіцидною дією.

Щодо «Неостерил М», цей засіб містить неіоногенні і амфотерні поверхнево-активні речовини, полігексанід та зволожуючі компоненти. Він володіє широким спектром антимікробної дії, включаючи бактерицидну, фунгіцидну та віруліцидну активність. Будучи класифікованим як засіб 4-го класу небезпеки, він вважається безпечним для шкіри рук персоналу [39].

З урахуванням цих фактів, «Неостерил М» є оптимальним вибором для регулярної обробки рук персоналу, оскільки забезпечує ефективний захист від мікроорганізмів, при цьому м'яко діє на шкіру, зберігаючи її здоров'я та комфорт [40].

Для встановлення обсягів поверхонь для обробки використаємо специфікацію обладнання з його габаритними розмірами. У ферментаційному відділенні наявні інокулятори та виробничий ферментер на 10 м³. Висота ферментера становить близько 5,3 м, приймаємо висоту поверху – 8 м.

Загальна площа приміщення, де встановлено дане обладнання становить 8 м × 4 м = 32 м². Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту 2,5 м, загальна площа обробки становитиме:

$$\sum F = (8 \text{ м} \times 4 \text{ м}) + (8 \text{ м} + 8 \text{ м} + 4 \text{ м} + 4 \text{ м}) \times 2,5 \text{ м} = 32 \text{ м}^2 + 60 \text{ м}^2 = 92 \text{ м}^2$$

Загальний обсяг обладнання, яке підлягає миттю, становить:

$$20 + 10 + 100 + 1000 + 10000 = 11\,130 \text{ л}$$

Оскільки при використанні СІР-мийки витрата становить 20% від обсягу обладнання, то поверхня для миття буде наступною:

$$11\,130 * 20\% / 100\% = 2226 \text{ л}$$

Дані щодо розрахунків розглянутих миючих та дезінфікуючих засобів представлено у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Розрахунок показників миючих та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, грн/л	Витрати робочого розчину, л/м ²	Ефективність використання дез. розчину, Е _{дз} , грн/м ²
Перекис водню	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	3%	91	2,73	0,1	25,1
Хлорамін-Б	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	1%	275	2,75	0,1	25,3
Новохлор-екстра	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога	0,5%	108	0,54	0,1	4,9
Біомой	Обладнання	0,3%	459	1,37	0,02	0,06
Каустична сода	Обладнання	30%	89	26,7	0,02	1,17

Таким чином, з метою обробки технологічних поверхонь, стін, вікон, дверей, підлоги варто обрати засіб Новохлор-екстра та 3% перекис водню, оскільки дані засоби демонструють оптимальні економічні показники та мають хороші дезінфікуючі властивості. У свою чергу, для миття реакторів, ферментера та іншого обладнання і комунікацій обираємо каустичну соду та засіб Біомой. Миття такої групи об'єктів буде проходити з використанням СІР-мийки, що дозволить скоротити витрати робочого розчину.

5.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для отримання білка

Метою стерилізації є звільнення поживного середовища від живих мікроорганізмів або їх форм спокою. Стерилізація поживного середовища залежить від фізико-хімічних властивостей його компонентів.

В біотехнології широко використовуються термічні методи знезараження поживних середовищ чи їх окремих компонентів. Спори мікроорганізмів мають терморезистентність в $3 \cdot 10^6$ разів більшу в порівнянні з вегетативними формами. Термічні методи стерилізації спрямовані саме на їх максимальне знищення. Окремі компоненти поживних середовищ по-різному реагують на термічну дію [27].

Переваги теплової обробки парою є:

- легке транспортування;
- здатність проникати в важкодоступні вузли стерилізаторів, трубопроводів і апаратури;
- велика тепловіддача при конденсації;
- нетоксичність.

Конденсат водяної пари зволожуючи спори, сприяє збільшенню швидкості їх загибелі в 10 - 1 000 разів.

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

Для одержання посівного матеріалу і виробничого культивування *K. marxianus* GQ 506972 використовують поживне середовище, що складається з молочної сироватки.

Згідно з літературними даними, відомо що підготовка сироватки відбувається за рахунок стерилізації протягом 20 хвилин при 112 °C і рН 3,5 (початковий рН сироватки). Після стерилізації температуру зменшують до 40°C і вносять посівний матеріал. Ферментацію проводять при низькому рН (3,5) і високій температурі (40°C), щоб мінімізувати ймовірність забруднення, яке є однією з найпоширеніших проблем у промисловості [4,27].

Таблиця 5.2

Склад компонентів для підготовки ПС для вирощування в посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,6 л середовища, г(мл)	Об'єм композиції, мл
Молочна сироватка	1000	600	600

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

Приготування та стерилізація поживних середовищ здійснюється безпосередньо в інокуляторах, оскільки в складі поживного середовища відсутні компоненти, які потребують розчинення.

Підготовка 6, 61,3 та 606 л поживного середовища здійснюється у відповідних посівних апаратах наступним чином: молочну сироватку стерилізують протягом 20 хвилин при 112 °C і рН 3,5 (початковий рН сироватки). Після стерилізації температуру зменшують до 40°C, вносять посівний матеріал і проводять вирощування культури.

Таблиця 5.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 6 л середовища, кг(л)	Об'єм композиції, л
Молочна сироватка	1000	6	6

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 61,3 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 61,3 л середовища, кг(л)	Об'єм композиції, л
Молочна сироватка	1000	61,3	61,3

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 606 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 606 л середовища, кг(л)	Об'єм композиції, л
Молочна сироватка	1000	606	606

5.5.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

При виробничому біосинтезі підготовка 6 м³ поживного середовища, здійснюється безпосередньо у ферментері, оскільки в складі поживного середовища відсутні компоненти, які потребують розчинення.

Приготування проводять наступним чином: молочну сироватку стерилізують протягом 20 хвилин при 112 °С і рН 3,5 (початковий рН сироватки). Після стерилізації температуру зменшують до 40°С, вносять посівний матеріал і проводять біосинтез цільового продукту [4,27].

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 6 м³ середовища, кг(л)	Об'єм композиції, л
Молочна сироватка	1000	6000	6 м ³

5.6. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

У статті [7] вказано, що ферментацію проводили при низькому рН 3,5, щоб мінімізувати ймовірність забруднення сторонньою мікрофлорою. Тому необхідно забезпечити приготування розчину кислоти для підтримки рівня рН на зазначеному рівні. Як підкислюючий агент обираємо 6% розчин соляної кислоти, який будемо готувати з концентрованої кислоти; даний розчин стерилізації не піддається. Розчин кислоти будемо додавати до поживного середовища з розрахунку 2 мл розчину на 1 л середовища (табл. 2.5).

Таблиця 5.7

Розрахунок кількості кислоти на кожен етап вирощування культури

Об'єм поживного середовища, л	6% розчин HCl	
	Об'єм, мл	Особливості приготування
6	12	Реактор 20 л
60	120	
600	1,2 л	
6000	12 л	

Підсумовуючи зазначене вище, технологія одержання кормового білку передбачає такі допоміжні роботи:

- Приготування та стерилізація поживного середовища;

- Приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища в інокуляторах та ферментері;

Для проведення допоміжних та основних етапів варто забезпечити таке обладнання:

- Реактор об'ємом 20 л для приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища в інокуляторах та ферментері.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА МІКРОБНОГО БІЛКА

У таблиці 6.1 представлено специфікацію ферментаційного обладнання, наведеного у графічній частині роботи на апаратурній схемі.

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки мікробного синтезу кормового білка

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Вентилятор ВДН №15. Призначений для переміщення димових газів та невибухонебезпечних пилогазоповітряних сумішей з температурою від -30°C до +200°C, запиленістю до 2 г/м³. Компанія: «ХАРКІВСЬКИЙ ВЕНТИЛЯТОРНИЙ ЗАВОД» (Україна) [41]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря DustFilter E100. Для частинок розміром > 10 мкм. Матеріал: вологостійка фанера Матеріал фільтра: неткані полотна із синтетичних волокон, товщина 20 мм. Компанія: «GrowPro» (Україна) [42]
К-3	Компресор	1	Компресор двоступінчастий з ремінною передачею Fini BK119-500F-7.5/AP. Тиск 10 бар. Продуктивність 705 л/хв. Максимальний тиск 14 бар. Потужність 5,5 кВт. Компанія: «Fini» (Італія) [43]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря каналний С-VKO-50-30. Максимально допустимий тиск рідини в охолоджувачах 1,6 МПа. Конструкція охолоджувача - корпус, виконаний з оцинкованої сталі, всередині якого встановлюється теплообмінник, краплевловлювач і піддон. Компанія: «ССК ТМ» (Україна) [44]

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Руда К.А.				РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання для виробництва мікробного білка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Резніченко Ю.М.						50	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Продовження таблиці 6.1

P-5	Ресивер	1	Ресивер Повітряний Лідер. Об'єм ресивера 495 л. Максимальний робочий тиск 10 бар. Габаритні розміри 1819 x 616. Товщина сталі Ст3сп/5мм. Компанія: «Лідер» (Україна) [45]
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Канальний водяний повітрянагрівач КАНАЛ-КВН 40-20. Максимально допустима температура теплоносія (води) не повинна перевищувати 150 ° С, максимально допустимий тиск - не більше 1,6 МПа. Компанія: «ТЕКО Україна» (Україна) [46]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр тонкого очищення повітря ФЯК F9 592x490x600-8, клас очищення F9 (EU9). Вид рамки - оцинковка. Компанія: «AS FILTER» (Україна) [47]
Д-8	Дозатор рідин	1	Масовий рідинний дозатор ДЖМ-1. Діапазон дозування: 1000...30000 мл. Компанія: «PackTech» (Україна) [48]
P-9	Реактор 20 л	1	Реактор 20 л. Розрахований на робочий тиск: -1 + 6 бар. Матеріал виготовлення: сталь AISI 316L. Компанія: «Промвіт» (Україна) [49]
Н-10 Н-23	Насос	2	Насос відцентровий Aquatica. Матеріал корпусу - нержавіюча сталь аісі 304. Вал двигуна - нержавіюча сталь. Продуктивність від 10 до 80 л/хв. Компанія: «Сантехдеталь» (Україна) [50]
Д-11 Д-14 Д-17 Д-20	Дозатор ваговий	5	Поршневий дозатор с додатковим тиском в бункері. Напруга: 220V / 110V. Потужність: 50W. Вага 50 кг. Компанія: «АгроТех» (Україна) [51]
Ф-12 Ф-15 Ф-18 Ф-21	Індивідуальний фільтр	4	Фільтрполотно Петрянова ФПП-15-1,5 розмір 150 см x 90 см. Матеріал ФПП являє собою шар ультратонких волокон із середнім розміром 1,5 мкм нанесених на марлеву підкладку. Уловлювання аерозолів з розмірами частинок до 0,1-0,2 мкм. Компанія: «БРОМ» (Україна) [52]

ІН-13	Інокулятор 10 л	1	Ферментер-біореактор Biostat® Cplus. Матеріал корпусу нержавіюча сталь AISI 304, 316L. Швидкість обертання мішалки 20-1500 об/хв. Можливість контролю температури, рН, розчиненого кисню, тиску, мутності. Співвідношення (висота:ширина) - 2:1. Компанія: «САРТОКАРАТ» (Україна) [53]
ІН-16	Інокулятор 100 л	1	ЦКТ на 100 літрів. Матеріал AISI 304, полірований всередині. Сорочка охолодження, ізоляція пінополіуретан. D= 580 мм, H = 1757 мм. Компанія: «Термо-Паб» (Україна) [54]
ІН-19	Інокулятор 1 м ³	1	Біореактор BIOSTAT® CultiBag STR 1000L. Контроль параметрів: швидкість перемішування, рН, рО ₂ , температура, кількість внесеного субстрату, швидкість змішування та подачі газів, контролер масової витрати. Керована гнучка система аерації. Компанія: «Sartorius» (Україна) [55]
ФР-22	Ферментер 10 м ³	1	Ферментер на 10 000 л з нержавіючої сталі 304/316. Діапазон роботи мішалки 40-2990 об/хв. Діаметр 1800 мм, висота 5250 мм. Компанія: «Wenzhou Aowei Machinery Co., Ltd.» (Китай) [55]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1) у найвищій точці $H = 20$ м [56].

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю $E = 90\%$, затримуються частинки діаметром більше 50 мкм.

ДР 1.3. Компресіювання повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, тиск становить 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-осушувачі (Т-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70% [56].

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для усунення остаточного конденсату пари на головному та індивідуальному фільтрах, охолоджене повітря з попередньої стадії нагрівають до температури оптимальної для культивування продуцента (40°C) у теплообміннику Т-6.

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми одержання мікробного білка	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Руда К.А.					53	6
Перевір.		Резніченко Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря направляють на головний фільтр очистки Ф-7. Ступінь очищення повітря наближається до $E = 95 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед ферментаційним обладнанням встановлюють індивідуальні фільтри Ф-12, Ф-15, Ф-18, Ф-21, матеріал даних фільтрів уловлює аерозолі з розмірами частинок до 0,1-0,2 мкм (очищення до 99,9999%).

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl

До реактора Р-9 обсягом 20 л з використанням дозатора рідин Д-8 подають 2,18 л 37 %-го розчину соляної кислоти, після чого за допомогою лічильника відмірюють 11,16 л води очищеної, запускають перемішуючий пристрій. Одержаний розчин хлоридної кислоти не піддають стерилізації. Розчин подають насосом Н-10 до ІН-13, ІН-16, ІН-19, ФР-22.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація молочної сироватки для вирощування інокуляту в колбах на качалках

На технічних вагах у мірному стакані зважують 600 г молочної сироватки. Наважку поміщають у колбу на 1000 мл, закривають колбу ватно-марлевою пробкою, на стерилізують при температурі 112°C упродовж 20 хв на водяній бані, по закінченню стерилізації колбу охолоджують та передають на стадію ТП 4.4.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація молочної сироватки для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

За допомогою вагового дозатора Д-11 зважують 6 кг молочної сироватки, яку поміщають в інокулятор ІН-13 на 10 л. Для проведення стерилізації в сорочку подають пару і нагрівають апарат до температури 112°C та витримуючи упродовж 20 хв. По закінченні процесу стерилізації, інокулятор охолоджують до 40 °C.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація молочної сироватки для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

За допомогою вагового дозатора Д-14 зважують 61,3 кг молочної сироватки, яку поміщають в інокулятор ІН-16 на 100 л. Для проведення стерилізації в сорочку подають пару і нагрівають апарат до температури 112°C та витримуючи упродовж 20 хв. По закінченні процесу стерилізації, інокулятор охолоджують до 40 °C.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація молочної сироватки для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1 м³

За допомогою вагового дозатора Д-17 зважують 606 кг молочної сироватки, яку поміщають в інокулятор ІН-19 на 1000 л. Для проведення стерилізації в сорочку подають пару і нагрівають апарат до температури 112°C та витримуючи упродовж 20 хв. По закінченні процесу стерилізації, інокулятор охолоджують до 40 °C.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація молочної сироватки для біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

За допомогою вагового дозатора Д-20 зважують 6000 кг молочної сироватки, яку поміщають у ферментер ФР-22 на 10 м³. Для проведення стерилізації в сорочку подають пару і нагрівають апарат до температури 112°C та витримуючи упродовж 20 хв. По закінченні процесу стерилізації, ферментер охолоджують до 40 °C.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Kluuveromyses marxianus* GQ 506972 зберігається у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем за температури 4 °C. Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру *K. marxianus* GQ 506972, що зберігалася в пробірках з середовищем МПА (від ТП 4.1), розсівають петлею до

ізолюваних колоній на чашки Петрі з середовищем МПА і вирощують при температурі 40⁰ С протягом 24 год.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем МПА та вирощують при температурі 40⁰ С протягом 24 год.

ТП 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках

600 мл поживного середовища від ДР 3.1 в асептичних умовах розливають по 150 мл у 4 качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *K. marxianus* GQ 506972 від ТП 4.3, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з поживним середовищем.

Культивування *K. marxianus* GQ 506972 здійснюють в колбах на качалці при температурі 40⁰ С, швидкість перемішування 250 об/хв протягом 24 годин.

Після культивування посівний матеріал зливають в одну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 10 л

В інокуляторі ІН-13 знаходиться охолоджена стерилізована молочна сироватка (від ДР 3.2). Далі через засівну колбу об'ємом 1 л стерильно вносять посівний матеріал (від ТП 4.4.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (220-240 об/хв.), подачу повітря у барботер, рН 3,5 (початковий рН сироватки), температуру 40⁰С підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 36 год. Значення рН підтримують 6% розчином хлоридної кислоти від ДР 2.1.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 100 л

В інокуляторі ІН-16 знаходиться охолоджена стерилізована молочна сироватка (від ДР 3.3). Далі перекачують посівний матеріал (від ТП 4.5.)

через трубу перетискування. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (150 об/хв.), подачу повітря у барботер, рН 3,5 (початковий рН сироватки), температуру 40°C підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 36 год. Значення рН підтримують 6% розчином хлоридної кислоти від ДР 2.1.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 4.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1000 л

В інокуляторі ІН-19 знаходиться охолоджена стерилізована молочна сироватка (від ДР 3.4). Далі подають посівний матеріал (від ТП 4.6) через трубу перетискування. Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (150 об/хв.), подачу повітря у барботер, рН 3,5 (початковий рН сироватки), температуру 40°C підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 36 год. Значення рН підтримують 6% розчином хлоридної кислоти від ДР 2.1.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері ФР-22 об'ємом 10 м³. У ферментері ФР-22 знаходиться охолоджена стерилізована молочна сироватка (від ДР 3.5). Потім подаються посівний матеріал (від ТП 4.7) через трубу перетискування. Перемішуючим пристроєм слугує мішалка, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 70 об/хв. Вмикають мішалку, подачу повітря у барботер, рН 3,5 (початковий рН сироватки), температуру 40°C підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 36 год. Значення рН підтримують 6% розчином хлоридної кислоти від ДР 2.1.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю. В кінці біосинтезу контролюють концентрацію

біомаси – 15,9 г/л та концентрацію білка – 4,5 г/л. Після закінчення процесу насосом Н-23 культуральну рідину подають на наступні стадії отримання цільового білка.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА МІКРОБНОГО БІЛКА

Постадійний контроль одержання кормового білка *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972 зображений у таблиці 8.1.

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Руда К.А.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва мікробного білка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					59	20
Реценз.						Кафедра БТМ ⁵		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю виробництва кормового білка

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	H=20 м
Кт 1.2 Очищення від грубих домішок	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E=90%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр технічний	Повітря після компресування	P=0,35 МПа, t=120-200°C
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=25-30°C, W=60-70%
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Підігріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	t=40°C
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	E=95%
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	E=99,9999 %
Кх 2.1 Приготування 6% розчину HCl	Концентрація HCl	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=6%

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 3.1 Приготування та стерилізація молочної сироватки для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Молочна сироватка, температура, час, стерильність	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=112^{\circ}\text{C}$, $\tau=20$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2 Приготування та стерилізація молочної сироватки для інокулятора 10 л	Молочна сироватка, температура, час, стерильність	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t_1=112^{\circ}\text{C}$, $\tau=20$ хв, $t_2=40^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3 Приготування та стерилізація молочної сироватки для інокулятора 100 л	Молочна сироватка, температура, час, стерильність	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t_1=112^{\circ}\text{C}$, $\tau=20$ хв, $t_2=40^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4 Приготування та стерилізація молочної сироватки для інокулятора 1 м ³	Молочна сироватка, температура, час, стерильність	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t_1=112^{\circ}\text{C}$, $\tau=20$ хв, $t_2=40^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5 Приготування та стерилізація молочної сироватки для ферментера 10 м ³	Молочна сироватка, температура, час, стерильність	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t_1=112^{\circ}\text{C}$, $\tau=20$ хв, $t_2=40^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Kluyveromyces marxianus</i> GQ 506972, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=4°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, чашки Петрі з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=40°C, τ=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, пробірки з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=40°C, τ=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, тахометр, рН- метр, мікробіологічний контроль	Після вирощування інокуляту в колбах на качалках	t=40°C, τ=24 год, ω=250 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 10 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=40°C, τ=36 год, ω=220- 240 об/хв, рН=3,5, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення таблиці 8.1

Кт, Кх, Км 4.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 100 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=40°C, τ=36 год, ω=150 об/хв, рН=3,5, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1000 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=40°C, τ=36 год, ω=150 об/хв, рН=3,5, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, температура, рН, концентрація розчиненого кисню, тривалість культивування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, рН-датчик, датчик розчиненого кисню, тахометр, сушильна шафа, ваги, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 години, концентрація біомаси визначається після закінчення процесу культивування	t=40°C, τ=36 год, ω=70 об/хв, рН=3,5, C _{біомаси} = 15,9 г/л, C _{білка} =4,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

Упродовж процесу культивування періодично (кожні 4 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, білку, вмісту джерела вуглецю та азоту.

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом мікроскопіювання і висіву культуральної рідини та поживних середовищ на чашки Петрі з агаризованими середовищами.

Проби культуральної рідини відбирають у стерильних умовах з колб за допомогою стерильної піпетки, а з інокуляторів і ферментера за допомогою пробовідбірників [27].

Висів на агаризовані середовища

Пробу культуральної рідини висівають петлею на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та сусло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів і інкубують при температурі 37 та 30 °C відповідно.

Через 24 години інкубації на СА при 40 °C повинні вирости тільки колонії продуцента *K. marxianus*, який утворює колонії білого кольору з рівним краєм, матовою поверхнею, лінзовидним профілем і сметаноподібною консистенцією [27, 57] (рис 8.1). Відсутність колоній сторонніх бактерій та дріжджів свідчить про чистоту культури.



Рис. 8.1. Колонії *K. marxianus*

Для проведення мікробіологічного контролю чистоти поживного середовища в асептичних умовах відбирають пробу, далі висівають по кілька крапель у чашки Петрі з СА та МПА і ставлять у термостати на 30°C та 37°C відповідно.

Відсутність колоній мікроорганізмів свідчить про чистоту поживного середовища.

Мікроскопіювання

Для мікроскопіювання готують препарат «роздавлена крапля» на знежиреному предметному склі, на яке наносять краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і розглядають його з імерсією (збільшення 90×).

Під мікроскопом повинні спостерігатися клітини продуцента *K. marxianus*, які мають овальну форму, 3-7 мкм в діаметрі. Клітини розмножуються брунькуванням.

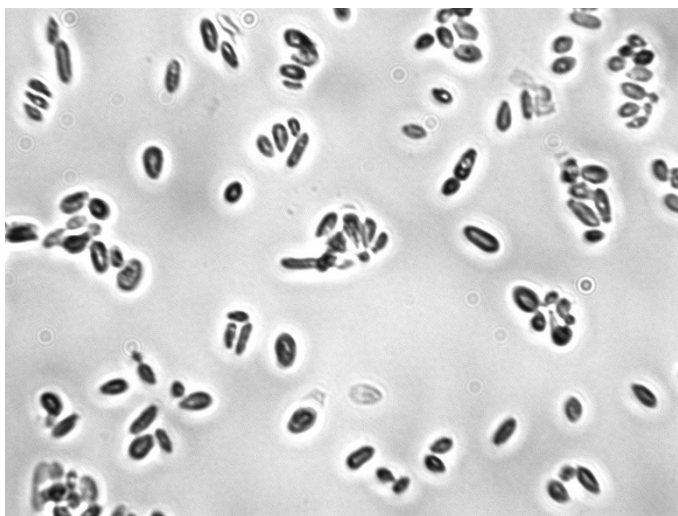


Рис 8.2. Клітини *K. marxianus* під мікроскопом

Брунькування справжнє, багатостороннє, істинного міцелію не утворюють (рис 8.2) [58]. Крім цього, під мікроскопом не повинно спостерігатися сторонніх мікроорганізмів.

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають гравіметрично. Цей метод використовується для оцінки зростання мікроорганізмів у рідких середовищах.

Для визначення біомаси проводять три послідовні операції: доводять масу центрифужної пробірки до постійного значення, відділяють мікробні клітини від культуральної рідини та визначають їхню масу.. Біомаса виявляється у грамах та міліграмах на літр культуральної води [27].

Хід виконання роботи

Виділення мікроорганізмів центрифугуванням або фільтрацією.

Доведення маси пробірок до постійного значення. З цією метою фільтри, заздалегідь встановлені у центрифужні пробірки поміщують в сушильну шафу і висушують протягом 1-2 год. при температурі 80-85°C і 90-100°C відповідно. Потім чашку Петрі з фільтрами або центрифужні пробірки виймають з сушильної шафи і переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl_2) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких проводитиметься зважування. За годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують з точністю до 0,0001 г. Висушування і зважування повторюють, дотримуючи вказану послідовність операцій, поки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її визначеннях не перевищать $\pm 0,0001$ г [57].

Відділення мікроорганізмів від середовища можливо здійснити завдяки фільтруванню або центрифугуванню, для цього точно виміряний об'єм культуральної рідини 5-10 мл, фільтрують через фільтр. Підкисленою дистильованою водою промивають осад на фільтрі. Мембранні фільтри використовуються для відділення бактерій. Для того щоб зрозуміти, який фільтр використовувати, нам потрібно визначити біомасу клітин. Цей фільтр поміщають на пористу пластинку утримувача, вставленого в колбу. Для того щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водоструменевого насоса. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

Результати роботи

Визначення біомаси.

Для того, щоб визначити кількість біомаси беруть центрифужну пробірку з осадом клітин поміщають в сушильну шафу, висушують і далі

зважують. Режим висушування і зважування такий, який використовували і при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають по формулі:

$$M = \frac{(A - B)1000}{V}$$

де М – суха біомаса в г/л; А – маса центрифужної пробірки (фільтру) з осадом в г; В – маса центрифужної пробірки (фільтру) без осаду в г;

V – об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) в мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища і ретельністю зважування [57].

8.2.2. Концентрація білка

Метод визначення масової частки загального азоту і білків за К'ельдалем

Принцип методу:

Для визначення загального азоту за К'ельдалем, молочний продукт мінералізують при високій температурі (370-400°C) концентрованою сульфатною кислотою з окиснювачами. При цьому органічні речовини окиснюються у присутності каталізатора (CuSO_4) до CO_2 і H_2O , а весь азот переходить в амоніак і зв'язується з сульфатною кислотою, утворюючи амонію сульфат. Для підвищення температури кипіння сульфатної кислоти можуть додавати K_2SO_4 . Далі концентрованим розчином NaOH нейтралізують надлишок сульфатної кислоти і розкладають амоніюсульфат. Амоніак, що утворюється відганяють парою у колбу з борною кислотою. При цьому утворюється амонію тетраборат. Утворений амонію тетраборат, який у водному середовищі сильно гідролізований і має лужну реакцію, відтитровують стандартним розчином хлоридної кислоти. За об'ємом 0,1 моль/дм³ розчину хлоридної кислоти, яка була витрачена на титрування амонію тетраборату, розраховують кількість азоту. Далі, припустивши, що азот для молочних продуктів становить 15,67 % від маси білків, обчислюють

масову частку білків. У зв'язку з тим, що незначна частина азоту ($\approx 5,5 \%$) входить до складу азотистих сполук небілкової природи (сечовина, креатин, креатинін та ін.), Міжнародна молочна федерація рекомендує використовувати коефіцієнт 0,95 при обчисленні істинного вмісту білку в молочному продукті [58].

Матеріали, реактиви, обладнання:

Молоко, ваги лабораторні 2-го та 4-го класу точності, електроплитка, блок нагрівальний для колб К'ельдаля, колби К'ельдаля, прилад для відгонки амоніаку, колби мірні, колби конічні, бюретки, циліндри, піпетки, лійки, фільтрувальний папір, термометри, скляна трубка, концентрована сульфатна кислота, калію сульфат, купруму сульфат, 2 % розчин фенолфталеїну, розчин гідроксиду натрію з концентрацією 0,1 і 1 моль/дм³, розчин хлоридної кислоти 0,1 моль/дм³, розчин борної кислоти 0,1 моль/дм³.

Хід визначення:

В колбі К'ельдаля розміщують декілька коротких відрізків скляної трубки і 10 г суміші солей (суміш 100 г калію сульфату і 0,4г купруму сульфату). У склянці з кришкою зважують 1 см³ молока. Молоко переливають у колбу К'ельдаля. Пусту склянку зважують і встановлюють масу взятого продукту. В колбу К'ельдаля додають 10 см³ сульфатної кислоти і 10 см³ перекису водню або 0,5 г перманганату калію. Колбу К'ельдаля розміщують у гнізді алюмінієвого нагрівального блоку на електроплитці. Регулятор нагріву встановлюють у середнє положення. Після закінчення бурхливого піноутворення (приблизно через 10 хв) регулятор встановлюють у максимальне положення. Нагрівання продовжують до тих пір, поки рідина не стане прозорою (безбарвною або ледь голубуватою). Після припинення нагріву колбу охолоджують до кімнатної температури. Далі визначають масову частку азоту. Для цього у колбу К'ельдаля з мінералізатором додають 20 см³ дистильованої води і ретельно перемішують до повного розчинення осаду. Для перегонки амоніаку збирають апарат. Включають електроплитку під колбою-пароутворювачем, відкривають

затискач на лінії відводу пари і закривають затискач на лінії подачі пари у колбу К'ельдаля. Нагрівають воду у колбі-пароутворювачі до кипіння. Колбу К'ельдаля з мінералізатом приєднують до апарату. У конічну колбу відміряють мірним циліндром 20см³ суміші борної кислоти з розчином індикатора. Для приготування такої суміші в 1000 см³ розчину борної кислоти (40 г борної кислоти розчиняють в 1000 см³ гарячої дистильованої води) вносять 25 см³ індикаторного розчину (0,075 г метиленового червоного і 0,200 г метиленового голубого розчиняють у 100см³ ацетону). Конічну колбу розташовують так, щоб кінець трубки холодильника знаходився нижче верхнього рівня розчину у колбі. Далі мірним циліндром у ділильну лійку вносять 50 см³ розчину гідроксиду натрію (400 г гідроксиду натрію розчиняють у 600 см³ дистильованої води) і обережно, не допускаючи викидів, переливають у колбу К'ельдаля. Після цього кран ділильної лійки зразу закривають. Закривають затискач на лінії відводу пари і відкривають затискач на лінії подачі пари із колби-пароутворювача у колбу К'ельдаля. Перегонка амоніаку триває до досягнення об'єму конденсату 90-120 см³. Тривалість перегонки 5-10 хв. Температура конденсованої води на виході із холодильника не повинна перевищувати 25°C. Після завершення перегонки вміст конічної колби з розчином індикатора, борної кислоти і конденсатом титрують розчином хлоридної кислоти концентрацією 0,2 моль/дм³ (вміст двох ампул стандарт-титру хлоридної кислоти вносять в мірну колбу місткістю 1000 см³, доводять до позначки дистильованою водою і перемішують) до зміни кольору із зеленого на фіолетовий (у точці еквівалентності – колір сірий) і визначають об'єм кислоти, який було витрачено на титрування. Періодично або при заміні реактивів необхідно проводити контрольне вимірювання, використовуючи замість продукту 1 см³ дистильованої води.

Масову частку загального азоту X (%) обчислюють за формулою :

$$X = (1,4 \cdot (V_1 - V_2) \cdot c) / m$$

Масову частку білку Y (%) обчислюють за формулою:

$$Y = 6,38 \cdot X$$

де 6,38 – маса молочного білку, еквівалентна одиниці маси загального азоту.

За остаточний результат вимірювання приймають середньоарифметичне значення результатів двох паралельних вимірювань, округлюючи результат до другого десяткового знаку [58].

8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену

Визначення вмісту лактози йодометричним методом

Хімічні методи визначення лактози та інших відновлювальних цукрів ґрунтуються на їх відновлювальних властивостях у разі взаємодії з певним окисником. Вуглеводи, які в окисно-відновних реакціях здатні виступати відновниками, називають редукувальними (відновлювальними) цукрами, а які не здатні - невідновлювальними. Ця здатність пов'язана з наявністю вільного високореакційного глікозидного гідроксилу. Так, молекула лактози, яка побудована із моносахаридів глюкози та галактози, містить один вільний глікозидний гідроксил, тому у розчинах вона перебуває у двох таутомерних формах - циклічній і альдегідній, які зв'язані між собою рухомою рівновагою. У зв'язку з цим, лактоза виявляє відновні властивості. Альдегідна група в її молекулі легко окиснюється в карбоксильну, і лактоза перетворюється на лактобіонову кислоту. Хімізм методу. За кип'ятіння точної кількості рідини Фелінга (розчин CuSO_4) з досліджуванним розчином лактози у присутності йодидів відбувається відновлення двовалентного іону купруму до оксиду одновалентного купруму і одночасне окиснення лактози до лактобіонової кислоти [58].

Молекулярний йод, який міститься у реакційній суміші, вступає в окисновідновну реакцію, в результаті якої одновалентний купрум окиснюється до двовалентного купруму, а молекулярний йод відновлюється до аніону йоду.

Після додавання до розчину кислоти молекулярний йод, що не вступив у реакцію, виділяється, і його відтитровують розчином тіосульфату натрію.

Для визначення кількості двовалентного купруму, відновленого цукрами, проводять контрольний дослід, в якому замість досліджуваного розчину, що містить цукри, беруть дистильовану воду. При цьому визначаються кількість гіпосульфиту, яка еквівалентна до загальної кількості молекулярного йоду, доданого до реакційної суміші. Кількість двовалентного купруму, відновленого цукрами, розраховують за різницею об'ємів розчину гіпосульфиту натрію, витраченого на титрування J_2 у контрольному досліді та тим, що залишився після взаємодії з купрумом, відновленим редукувальними цукрами. За цією величиною, вираженою в cm^3 0,1N розчин $Na_2S_2O_3$, знаходять еквівалентну кількість цукру у певному об'ємі досліджуваного розчину [58].

Підготовка зразка до аналізу

У мірну колбу об'ємом 500 cm^3 відважують наважку досліджуваного середовища масою 25 г з точністю $\pm 0,01$ г або відміряють, піпеткою 25 cm^3 і перераховують на масу з урахуванням густини. Туди ж додають дистильовану воду приблизно до половини об'єму, потім додають 10 cm^3 розчину Фелінга і 4 cm^3 0,1N розчину КОН. Після кожного додавання рідину ретельно перемішують. Вміст колби доводять до мітки перемішують і залишають на 30 хв. Рідину, що відстоялась, фільтрують у суху колбу через складчастий паперовий фільтр. Перші порції фільтрату $10\text{--}20\text{ cm}^3$ видаляють. 50 cm^3 фільтрату переносять піпеткою у конічну колбу ємністю $250\text{--}300\text{ cm}^3$ з притертим або гумовим корком. Додають 25 cm^3 0,1N розчину йоду і повільно, неперервно перемішуючи, додають $37,5\text{ cm}^3$ 0,1NN розчин гідроксиду натрію. Колбу закривають корком і залишають у темному місці на 20 хв за температури $20^\circ C$.

Проведення досліджень

Для визначення кількості йоду, що не вступають у реакцію, до суміші вносять піпеткою $8,0\text{ cm}^3$ 0,5N розчину хлоридної кислоти, після чого виділяється вільний йод, який забарвлює фільтрат у чорно-коричневий колір. Через 10 хв йод, що виділився, титрують 0,1N розчином гіпосульфиту натрію.

1,0 см³ індикатора (0,5 %-й розчин крохмалю) вносять наприкінці титрування, коли забарвлення в реакційній колбі набуває світло-жовтого кольору. Титрування продовжують до моменту зникнення синьо-фіолетового забарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід, відміряючи колбу 50 см³ води (замість фільтрату) і виконуючи експеримент у тій самій послідовності, як і в основному досліді [58].

Оброблення результатів аналізу

Масову частку лактози W1, у відсотках, обчислюють за формулою

$$W1 = ((V0 - V1) \cdot T1 \cdot 0.97 \cdot 100) / m$$

За наважки досліджуваного зразка, що дорівнює 25 г, формула для розрахунку лактози такого вигляду:

$$W1 = 0.699 \cdot (V0 - V1)$$

8.3. Методи ідентифікації білка

Цільовим продуктом є кормовий білок, що знаходиться в складі біомаси, тому слід проводити ідентифікацію білка.

Кольорові реакції на білки є якісними на функціональні групи радикалів амінокислот, які входять до складу білків. Ці специфічні реакції часто використовують у лабораторній практиці для ідентифікації та кількісного визначення білків і окремих амінокислот [59].

Біуретова реакція на білки

Принцип: Білки та пептиди в лужному середовищі за присутності солей міді проявляють біуретову реакцію. Назва реакції походить від біурету – похідного сечовини. Хімічна формула біурету наступна – $H_2N-CO-NH-CO-NH_2$. У складі цієї сполуки міститься пептидний зв'язок (-CO-NH-), як і у молекулах білків.

Біурет синтезується із сечовини і в ході реакції набуває того ж кольору, що й сечовина. Шляхом біуретової реакції в речовинах виявляють пептидний зв'язок, який утворюється з α -амінокислот за рахунок реакції між карбоксильною групою однієї кислоти з аміногрупою іншої, з виділенням молекули води. Вільні амінокислоти такої реакції не проявляють.

Біуретова реакція характерна лише для тих речовин, які мають не менше двох пептидних зв'язків. У сильнолужному середовищі білки за присутності CuSO_4 утворюють комплексні сполуки міді з пептидними групами, забарвлені у червоно-фіолетовий або синьо-фіолетовий колір. Забарвлення білково-мідного комплексу залежить від довжини пептидного ланцюга. Дипептиди забезпечують синій комплекс, трипептиди - фіолетовий, а пептиди з довжиною ланцюга від чотирьох амінокислотних залишків і здебільшого мають червоний комплекс. Так, синьо-фіолетове забарвлення дають розчини білків, а пептони, що є продуктами неповного гідролізу білків, рожеве або червоне забарвлення [59].

Матеріали: 1% розчин білка, 10% розчин NaOH , 0,5% розчин CuSO_4 , пробірки, піпетки.

Виконання дослідження: до 2-3 мл розчину білка додають таку ж кількість 10% розчину NaOH та кілька крапель 0,5% CuSO_4 . Таким чином спочатку виникає рожеве забарвлення, яке при додаванні розчину купрум(II) сульфату переходить у червоний, фіолетовий та синій колір [59].

Таким чином проводять ідентифікацію білків.

8.4. Визначення показників якості мікробного білка

1) Зовнішній вигляд

Визначають візуально. Колір продукту має бути від жовтого до світло-коричневого.

2) Вологість

Загальну кількість води в кормах можна встановити прискореним способом. Наважку подрібненого корму поміщають в бюкс або металеву чашку і витримують в сушильній шафі при 130°C [60].

Проведення дослідження

1. До попередньо висушених до постійної маси скляні або алюмінієві бюкси (діаметр 50 мм, висота 20 мм) додають дві наважки корму – по 5 г кожна (зважують з точністю до 0,01 г). Наважки розсипають тонким шаром по дну бюксів.

2. Відкриті бюкси разом з кришками поміщають в попередньо підігріту до температури $130 \pm 2^\circ\text{C}$ електросушильну шафу і витримують наважки протягом 40 хв. Корми з підвищеним вмістом вологи слід просушувати в шафі до 1 год.

3. Після 40 хв висушування бюкси із сушильної шафи виймають тигельними щипцями, швидко закривають кришками і залишають на 20-30 хв в ексикаторі для охолодження до кімнатної температури.

4. Після охолодження в ексикаторі бюкси з досліджуваними зразками знову зважують. За різницею маси до та після висушування встановлюють вміст вологи. Для розрахунків використовують наступну формулу [60]:

$$X = \frac{m - m_1}{a} \times 100$$

де X – загальний вміст води в кормі, %; m – маса корму до висушування, г; m_1 – маса корму після висушування, г; a – наважка корму, г; 100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки [60].

Показник вологості має становити не більше 10%.

3) Частка жиру

Визначають методом С.В. Рушковського, що передбачає визначення жиру за кількістю знежиреного залишку [60].

Необхідні матеріали: Апарат Сокслета, органічний розчинник, сушильна шафа, бюкси, ексикатор, паперові пакетики з фільтрувального паперу. Апарат Сокслета складається з колби – випаровувача, екстрактору та кулькового холодильника. Екстрактор обладнаний двома трубками – більшою та вузькою (сифон), по якій зливається ефір. Перед роботою апарат Сокслета збирають, з'єднуючи колбу для розчинника з екстрактором, потім екстрактор приєднують до холодильника. У готовому вигляді апарат Сокслета слід закріпити у штативі Бунзена.

Проведення дослідження

1. Готують пакети з фільтрувального паперу, поміщають в бюкси та висушують в сушильній шафі при температурі $100 - 105^\circ\text{C}$, після чого

охолоджують в ексікаторі та зважують. До пакету поміщають 1–2 г досліджуваного зразка, кладуть в бюкс та висушують при температурі 100 – 105°C до постійної маси.

2. Висушені та зважені в бюксах промарковані пакети з кормом поміщають в екстрактор апарату Сокслета, заливають органічним розчинником – 200–250 мл ефіру – та залишають на ніч. Наступного дня доливають в екстрактор таку кількість ефіру, щоб після його зливання з екстрактору в ньому залишався деякий надлишок ефіру – орієнтовно 50 – 25 мл.

3. Колбу апарату Сокслета розміщують на водяній бані, нагрівають на повільному вогні, при цьому розчинник не має сильно кипіти. Нагріваючись в колбі, відбувається випаровування ефіру, внаслідок чого він піднімається по широкій трубці екстрактору в холодильник. В холодильнику ефір конденсується та по краплях стікає в екстрактор, де знаходяться пакети з досліджуваним зразком. Коли екстрактор наповниться ефіром до верхнього згину сифонної трубки, ефір з розчиненням в ньому жиром стікає з сифонної трубки в колбу.

4. При оптимальному режимі екстракції впродовж 1 год відбувається 4–5 зливань ефіру. Корми зі значною часткою жиру екстрагують 10–12 год, а корми з низьким вмістом жиру – 5–6 год.

5. В кінці екстракції пакети виймають, викладають на великому годинниковому склі та висушують. Потім пакети поміщають у відповідні бюкси, та висушують при 100 – 105°C до постійної маси.

6. Вміст сирого жиру визначають наступним чином [60]:

$$x = \frac{(m - m_1) \times 100}{b},$$

де x – вміст сирого жиру в кормі, який досліджується, %; m – маса бюкси і пакетика з наважкою корму після висушування до екстрагування жиру; m_1 – маса бюкси і пакетика з наважкою після екстрагування та

висушування; b – наважка корму в повітряно–сухому стані; 100 – коефіцієнт для переведення у відсотки [60].

Частка жиру має становити не більше 10%.

4) Вміст золи

Визначають методом спалювання [60].

Необхідні матеріали: аналітичні ваги (похибка зважування не більше 0,0002 г), муфельна піч, порцелянові тиглі № 3-4-5, ексикатор, тигельні щипці, азотна кислота, азотнокислий амоній; перекис водню, 30%-ий водний розчин.

Проведення дослідження

1. Порцелянові тиглі прожарюють протягом 30 хв – 1 год в муфелі за температури темно-червоного каління.

2. Тиглі з муфеля за допомогою тигельних щипців переносять в ексикатор і охолоджують протягом 1 – 1,5 год.

3. Зваживши на аналітичних вагах порожній тигель, фіксують масу, потім вносять в тигель 2-5 г досліджуваного зразка і зважують тигель з кормом. За різницею показників визначають кількість аналізованого зразка.

4. Поміщають тиглі в холодну муфельну піч, вмикають на слабкий нагрів, відкриваючи двері муфеля для більшого доступу повітря. Через 50-60 хвилин при 250-300°C після припинення диміння зразка в тиглі нагрів муфеля збільшують до 450-500°C, змінюючи положення важеля реостата. Тиглі в муфелі при темно-червоному накаливанні залишають на 2-3 години до одержання золи світло-сірого кольору.

По закінченню прожарювання, тиглі з золою охолоджують у вимкненій муфельній печі, після чого переносять до ексикатора і зважують.

Кількість сирової золи в повітряно-сухій речовині досліджуваного зразка встановлюють за формулою [60]:

$$X = \frac{m - m_1}{a} \times 100$$

де X – вміст золи, %; m – маса тигля з сирою золою, г; m_1 – маса порожнього тигля, г; a – наважка корму, г.; 100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки [60].

Вміст золи має становити не більше 17%.

5) Вміст білка

Широкого впровадження у лабораторній практиці для визначення вмісту білка набув метод Дюма [61].

При визначенні азоту цим методом зразок спалюється за високої температури (900–1030 °C) у спеціальній лунці в атмосфері кисню при наявності каталізаторів, внаслідок чого вивільняється CO_2 , H_2O і N_2 . Вуглекислий газ і вода видаляються шляхом пропускання через спеціальні колонки, які поглинають їх, а вміст азоту, що виділився визначають інноваційним самокалібрувальним детектором за теплопровідністю (TCD) LoGas™ (для його роботи не потрібний газ порівняння) і порівнюють з калібрувальною кривою (GOST R 54390- 2011).

Основною перевагою цього методу є швидкість проведення аналізу. При його проведенні не використовуються токсичні хімічні речовини і каталізatori, і практично відсутня пробопідготовка (тільки розмел проби), а на одне визначення потрібно лише декілька хвилин [61].

Вміст білка має бути в межах 65-72%.

8.5. Оцінка біологічної дії білка

Оскільки кінцевий продукт являє собою кормовий білок, то біологічну дію можна визначити за перетравністю поживних речовин корму [62].

Під перетравністю розуміють властивість поживних речовин корму розщеплюватися під дією ферментів травних соків і мікроорганізмів до простих сполук, здатних всмоктуватися у травному каналі тварини. Перетравлені поживні речовини (ППР) визначають як різницю між кількістю спожитих поживних речовин корму (ПР корму) та виділених з калом (ПР калу).

Оскільки перетравність вважається узагальненою характеристикою корму, який можна згодовувати у різній кількості, то її виражають не в абсолютних, а у відносних величинах. Кількість перетравленої речовини, вираженої у відсотках до спожитої, називається коефіцієнтом перетравності. Його визначають за формулою [62]:

$$КП = \frac{ППР \times 100}{ПР_{\text{корму}}},$$

Найчастіше визначають коефіцієнти перетравності органічної речовини, протеїну, жиру, клітковини і БЕР корму. З цією метою проводять спеціальні дослідження, для яких підбирають не менше трьох тварин однієї породи і статі, подібних за віком, живою масою, вгодованістю і продуктивністю. Для годівлі використовують корми з відомим хімічним складом.

Тривалість дослідження поділяють на два періоди: підготовчий і обліковий. У підготовчий період тварин привчають до поїдання досліджуваного корму. Тривалість його, залежно від виду тварин, становить 6-15 діб. У обліковий період, що триває 5-10 діб, збирають кал, визначають його масу і відбирають 3-10% для аналізу. Облік спожитого тваринами корму здійснюють протягом усього дослідження [62].

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА КОРМОВОГО БІЛКА

Місцем емісії рідких відходів є етап приготування титрувальних розчинів, відділення біомаси, санітарна підготовка виробництва. Місцем емісії газоподібних відходів є: одержання посівного матеріалу, виробничий біосинтез.

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

На території біотехнологічного виробництва утворюються три види стічних вод: побутові, виробничі та атмосферні.

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Відомо, що для миття та дезінфекції обладнання за допомогою мобільної циркуляційної СІР-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму ємкісного обладнання. Відповідно до специфікації обладнання, для цього розрахунку будемо використовувати реактори-збірники, інокулятори та ферментери.

$$V_{\text{ємностей}} = V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{інокулятор}} + V_{\text{реактор}} + V_{\text{ферментер}}$$

$$= 6,6 + 10 + 67,3 + 100 + 666,6 + 1000 + 6600 + 10000 = 18450,5 \text{ л}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = 18450,5 * 0,2 = 3690,1 \text{ (3690) л}$$

$$V_{\text{засобів}} = 18450,5 * 0,3 = 5535,2 \text{ (5535) л}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 3690 - 5535 л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємкісного обладнання. Як і розраховано нижче, цей параметр дорівнює 3690- 5535 л. Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: 5535 + 5535 = 11070 л.

					НУХТ БТЕК 04.03.28 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Руда К.А.			РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва кормового білка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.					79	8
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Відповідно до розрахунків від курсові роботи (ТЕО) за одну добу отримуємо 3152 л культуральної рідини, з концентрацією кінцевого продукту 4,5 г/л та біомасою 15,9 г/л.

Тобто для подальших розрахунків необхідно розрахувати залишки біомаси, що будуть слугувати твердими відходами.

$$15,9 - 4,5 = 11,4 \text{ (0,0114 кг/л)}$$

$$\text{Тобто } 3152 \cdot 0,0114 = 36 \text{ кг}$$

Так як основна частина культуральної рідини є вода, то $3152 - 36 = 3116$ кг

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 36 кг кінцевого продукту та 3116 л води.

Тоді на 1 т готової продукції, утворюється:

$$(1000 \cdot 3116) / 36 = 86555,55 \text{ л стічних вод.}$$

Після цього визначимо **середні витрати стічних вод від виробничого підприємства**.

Для розрахунку виробничих стічних вод візьмемо до уваги данні з ТЕО потужність виробництва відповідно ТЕО становить 3 090 кг (865,2 м³ культуральної рідини) мікробного білка за 305 днів.

Кількість трудоднів прийнято за 305, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 961\,333,3 / 305 = 3152 \text{ л}$$

Тоді,

$$Q_e = q_e \cdot n;$$

де q_e - норма водовідведення в л на одиницю продукції, яку випускає підприємство (орієнтовно можна прийняти відповідно до пройденої практики тобто 50-100 л); n - кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу).

$$Q_e = 50 \cdot 3152 \approx 157600 \text{ л/доба.}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = q_n \cdot N = 25 \cdot 5 = 125 \text{ л/зміну,}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л/зм на одного робітника (приймаємо для холодного цеху $0,025 \text{ м}^3/\text{зм}$ люд); N – кількість робітників, що працюють у зміну, приймаємо 5:

1. Технолог цеху (біотехнолог): ця особа буде відповідати за процес культивування, збір та очищення біомаси з ферментера.
2. Мікробіолог ВКЯ (відповідальний за контроль якості): відповідає за контроль якості на різних етапах виробництва та забезпечує виконання стандартів GMP і вимог затверджених регулюючими органами.
3. Технік з обслуговування та ремонту обладнання: ця особа буде відповідати за обслуговування та ремонт обладнання в разі необхідності.
4. Керівник зміни: ця особа буде відповідати за керування роботою всіх працівників на зміні та вирішення питань, пов'язаних з виробництвом біомаси бактерій.
5. Санітарний робітник: цей працівник забезпечує дотримання правил санітарної гігієни та чистоти в цеху. Він займається підготовкою приміщень, дезінфікує обладнання та поверхні, контролює виконання правил особистої гігієни працівників, дотримання ними правил переодягання та захисту від шкідливих впливів, що забезпечує безпеку продукту та працівників.

Саме таку кількість робітників ми приймаємо, бо відповідно до вимог GMP варто мінімізувати кількість робітників на зміні, адже персонал це головне потенційне джерело контамінації. Також, якщо правильно провести процес оптимізації виробництва, то зменшення кількості робітників може допомогти знизити рівень помилок та підвищити рівень якості продукції.

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = Q_n \cdot N_{зм} = 125 \cdot 3 = 375 \text{ л/добу},$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу ($N_{зм} = 4$).

Загальна за добу витрата атмосферних стічних вод становлять:

$$Q_a = Q_n/15 = 375/15 = 25 \text{ л/добу}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 157600 + 375 + 25 = 158000 \text{ л/добу.}$$

Зважаючи на отримані данні пропонується використовувати систему фільтрації Aquasana Rhino EQ-3. Дана система має приблизну продуктивність 30 000 л на добу, що підходить під потреби виробництва якщо буде встановлено 6 таких одиниць. Також, Aquasana Rhino здійснює запатентовану 4х ступеневу систему очистки води:

1-й ступінь: фільтрація будь-якого осаду, що може бути у водопроводі. Коли цей осад видалено, він не може засмітити головний фільтр, таким чином збільшуючи термін служби фільтра [63].

2-й ступінь: гранули цинку та міді створюють окисно-відновний потенціал, що змінює молекулярну структуру хлору та перетворює його на нешкідливий хлорид. Враховуючи, що для дезінфекції виробництва ми будемо використовувати засоби, що містять хлор в складі, дана система очищення доволі актуальна.

3-й та 4-й ступінь: гранули активованого вугілля різного розміру. Вугільні фільтри використовуються для видалення органічних забруднень, таких як хлор, бензол та інші хімічні речовини. Також допомагають відфільтрувати бактеріальні клітини. Активне вугілля є ефективним поглиначем запахів, хімічних та органічних забруднень, що дозволяє очищувати стічні води від цих речовин. Після відпрацювання терміну служб, фільтри з активним вугіллям можуть бути використані повторно. Активне вугілля після регенерації знову набуває своїх фільтраційних властивостей.

Данна фільтраційна система забезпечує очистку води від бактерій, хімічних речовин, запахів та інших забруднень. Також, додатковою перевагою Aquasana Rhino EQ-3 є його компактні розміри. Це дозволяє встановити фільтраційну систему в будь-якому місці, щоб забезпечити максимальну ефективність очищення стічних вод [63].

Також, до рідких відходів підприємства можна віднести супернатант, отриманий під час виділення біомаси бактерій центрифугуванням.

Супернатант пропонується використати для потреб промисловості чи сільського господарства. *Kluyveromyces marxianus* GQ 506972 може бути використана як джерело високоякісного кормів тварин. Цей продуцент містить значні кількості залишків біомаси з усіма необхідними амінокислотами для здорового росту та розвитку тварин, особливо молодняку, тварин у період лактації або вирощування.

Також даний штам виявляє пробіотичні властивості, що сприяють здоров'ю тварин. Вони можуть бути використані для підтримки нормальної мікробіоти та здоров'я шлунково-кишкового тракту тварин. Додавання пробіотиків до кормів покращує перетравлення кормів, знижує ризик захворювань та підвищує виробничі показники тварин.

K. marxianus виробляє різноманітні ферменти, такі як ліпази, амілази та протеази. Додавання таких ензимів до кормів поліпшує перетравлення складних компонентів кормів та забезпечує краще засвоєння поживних речовин тваринами.

Узагальнюючи, використання *K. marxianus* у галузі кормів для тварин може бути ефективним способом покращення якості кормів, забезпечення необхідних поживних речовин та підтримки здоров'я та добробуту тварин.

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

У процесі культивування утворюються такі газоподібні відходи, як відпрацьований азот, що містить аерозоль клітин продуцента, а також вуглекислий газ. Для очищення газоподібних відходів пропонується встановити фільтри класу F9 Multiglas, через системи витяжної вентиляції на виході відпрацьованих газоподібних викидів в атмосферне повітря. З даною системою очищення відпрацьованого повітря було ознайомлено під час проходження практики. Фільтри F9 Multiglas належать до фільтрів тонкої очистки повітря та допомагають вловлювати мікробні часточки та пил. Ці фільтри мають високу стійкість до вологості та температурних змін, це

дозволяє їх використовувати в різноманітних умовах та подовжує термін їх експлуатації. Фільтри також легко монтувати та замінювати, що забезпечує зручність в обслуговуванні [64].

Утворення газоподібних відходів, що містять аерозоль клітин у вигляді відпрацьованого повітря після аерації культуральної рідини на стадіях:

- отримання посівного матеріалу в інокуляторі 10, 100 л
- отримання посівного матеріалу в посівному апараті 1 м³
- культивування в ферментері 10 м³

Розрахуємо об'єм відпрацьованого повітря, знаючи, що він приблизно дорівнює об'ємам аераційного повітря.

1. В інокуляторі 10 та 100 л, робочий об'єм $6,6+67,3=73,9$ л, отже аераційного повітря потрібно 21 л/хв, тобто $21*73,9 = 1551,9$ л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 36 год, для цього необхідно $36*1551,9 = 55868,4$ л аераційного повітря на виробничий цикл.

2. В посівному апараті 1000 л, робочий об'єм 666,6 л, отже аераційного повітря потрібно 251 л/хв, тобто $251*666,6 = 167316,6$ л/год. Процес отримання посівного матеріалу займає 36 год, для цього необхідно $36*167316,6 = 6023397,6$ л аераційного повітря на виробничий цикл.

В ферментері 10 000 л, робочий об'єм 6600 л, отже аераційного повітря потрібно 11 380 л/хв, тобто $11380*6600=75108000$ л/год. Процес біосинтезу займає 36 год, для цього необхідно $36*75108000= 2703\ 888\ 000$ л аераційного повітря на виробничий цикл.

9.3. Системи знешкодження твердих відходів

Оскільки білок біологічного агенту є цільовим продуктом виробництва, то тверді відходи представлені пакувальною тарою, та залишками, що утворюються стадіях подрібнення та просіювання. Для утилізації пакувальної тари будемо використовувати попереднє сортування відходів з метою повної або часткової переробка з подальшим використанням, це найбільш економічний та зручний метод утилізації.

Тверді відходи на підприємстві:

- Бруд на фільтрах
- Непридатні хімічні реактиви
- Пакувальні матеріали
- Скло

На фільтрах можуть залишитись клітини продуцента, тому такі відходи піддають обробці гострою парою шляхом обробки в автоклаві знешкодження біологічно-активних відходів.

Непридатні хімічні реактиви варто зберігати в окремо відведений шафі, а потім передавати спеціальним організаціям на утилізацію.

Утилізація хімічних реактивів проходить наступним чином.

Відпрацьовані розчини збирають і закривають в ємкості місткістю не менше 5 л. Обов'язково проводити розподіл відходів: органічні сполуки (збирати тільки в пластикових ємкостях), неорганічна (якщо кількість невеликого, то можна збирати в скляних пляшках, з щільною кришкою), галоген-органічні розчинники (хлороформ і хлоровмісні). Після того як вона наповниться на 4/5, перевіряють рН і нейтралізують при необхідності рідиною до рН = 7-7,5 твердими карбонатами або гідроксидами натрію або калію. По можливості зважити відходи.

Щомісячно до 20-го числа кожного місяця відповідальні за збір відходів зобов'язані повідомляти координаторів про кількість накопичених відходів.

Координатор заздалегідь повідомляє в відділі постачання і інженера з охорони праці про необхідність утилізації і заміні заповнених ємкостей.

Реактиви з вичерпаним терміном придатності або ті, які втратили властивості з інших причин (порушення умов зберігання реактиву, герметичності його упаковки), підлягають утилізації, списуються з складанням акту, упаковується в окремій тарі по групах зберігання і передаються до централізованої утилізації відповідальній установі. Підготовлені до утилізації реактиви зберігають в спеціальній тарі в спеціально відведеному місці [65].

Інші відходи варто складати в окремі контейнери з кришками (макулатура, скло та інше) та передавати на переробку до пунктів вторсировини [66].

З урахуванням сучасної ситуації в Україні станом на 2024 рік, пластикові відходи будемо направляти до відповідних організацій на переробку для виготовлення протезів [67] з метою забезпечення протезами ветеранів війни.

ЛІТЕРАТУРА

1. Jach, M. E., Serefko, A., Ziaja, M., & Kieliszek, M. (2022). Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source. *Metabolites*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>.
2. Park, S. W., Kang, B. H., Lee, H. M., Lee, S. J., Kim, H. S., Choi, H. W., Park, T. J., & Kong, K. H. (2021). Efficient brazzein production in yeast (*Kluyveromyces lactis*) using a chemically defined medium. *Bioprocess and biosystems engineering*, 44(4), 913–925. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02499-y>
3. Pérez-Torrado, Roberto & Gamero, Esther & Gomez-Pastor, Rocio & Garre, Elena & Aranda, Agustín & Matallana, Emilia. (2015). Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 46. 10.1016/j.tifs.2015.10.008.
4. Biochem Zusatzstoffe Handels - TechnoYeast: a successful alternative to blood plasma in piglet nutrition [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.biochem.net/en/current-news/news/2019/technoyeast-a-successful-alternative-to-blood-plasma-in-piglet-nutrition.html>
5. Paul, D., Mukhopadhyay, R., Chatterjee, B. P., & Guha, A. K. (2002). Nutritional profile of food yeast *Kluyveromyces fragilis* biomass grown on whey. *Applied biochemistry and biotechnology*, 97(3), 209–218. <https://doi.org/10.1385/abab:97:3:209>.
6. Silva, Caio & Castro-Goméz, Raul. (1995). Estudo de um processo fermentativo utilizando soro de leite e a levedura *Kluyveromyces Fragilis*. *Semina: Ciências Agrárias*. 16. 10.5433/1679-0359.1995v16n1p17.
7. Yadav, J. S., Bezawada, J., Elharche, S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(6), 1017–1029. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1072-6>.

8. Karim, Ahasanul & Aider, Mohammed. (2021). Bioconversion of Electro-Activated Lactose, Whey and Whey Permeate to Produce Single Cell Protein, Ethanol, Aroma Volatiles, Organic Acids and Fat by *Kluyveromyces Marxianus*. *SSRN Electronic Journal*. 10.2139/ssrn.3952371.

9. Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 339–354. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6>.

10. Crous, Pedro & Stalpers, Joost & Robert, Vincent. (2004). MycoBank: An online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*. 50, 19-22.

11. Walt, J.. (1971). New Combinations in the Genera *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Lodderomyces* and *Wingea*. *Bothalia*. 10 (2), 417-418. 10.4102/abc.v10i3.1545.

12. MYCOBANK Database - *Kluyveromyces fragilis* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>

13. Виробництво та використання кормового білка в Україні / О. В. Корнійчук, І. С. Воронецька, О. М. Рибаченко // Економіка АПК. - 2014. - № 8. - С. 26-31.

14. Bajić, B., Vučurović, D., Vasić, D., Jevtić-Mučibabić, R., & Dodić, S. (2022). Biotechnological Production of Sustainable Microbial Proteins from Agro-Industrial Residues and By-Products. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(1), 107. <https://doi.org/10.3390/foods12010107>.

15. Бомко В.С., Сиваченко Є.В., Сметаніна О. В. Корми і кормові добавки та ефективність їх використання в годівлі тварин: навч. посібник. – Біла Церква, 2023. – 225с.

16. Тваринництво України. Livestock in Ukraine. ДЕРЖСТАТ УКРАЇНИ / STATISTICS UKRAINE. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2022/zb/05/zb_tv_2021.pdf.

17. Ротар, Б.С. (2020). Структура стада та план опоросів як показники інтенсивності технології ведення галузі свиначства. *Миколаївський національний аграрний університет*, 205-209.

18. БМВД для свиней Універсальний 25-10% - ТМ АГРО-В - Оригінал 10 кг [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://agro-v.in.ua/ua/p1019028777-bmvd-dlya-svinej.html> .

19. Вирощуємо молодняк поросят правильно [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://denzadnem.com.ua/blogy/korysni-porady/96199>.

20. Кормові дріжджі є одним з кращих джерел повноцінного білка [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://agrofond.uaprom.net/ua/p36504572-kormovi-drizhdzhi-odnim.html> .

21. KEGG Database - Glycolysis / Gluconeogenesis - Kluyveromyces marxianus [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/kmx00010>

22. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія // Підручник. – К.: НУХТ. – 2004. – 471 с.

23. Сидоров Ю. І. Промислові ферментери // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 33 – 39.

24. Малежик І. Процеси та апарати харчових виробництв. – К.: НУХТ, 2003. – 400 с.

25. М серия SIP биореакторов / ферментеров. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://soctrade.com/laboratorное_oborudovanie/m-seriya-sip-bioreaktorov-fermenterov.phtml

26. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.

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

28. Біотехнології та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології. Рекомендації до виконання практичних робіт [Електронний ресурс] : навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра, які навчаються за

освітньо-професійною програмою «Регенеративна та біофармацевтична інженерія» спеціальності 163 Біомедична інженерія / КПІ ім. Ігоря Сікорського; уклад.: В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько. – Електронні текстові данні (1 файл: 1,13 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 96 с.

29. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.

30. Красінько В. О., Резніченко Ю. М. Програма переддипломної практики для здобувачів освіт. Навч. вид. для ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. форм навч. / В. О. Красінько, Ю. М. Резніченко; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2022. – 22 с.

31. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001. – № 502.

32. Дезінфікуюча дія перекису водню та лізоформіну на грамнегативні бактерії, які контамінують виробництва харчової промисловості / І. М. Фуртат, Т. В. Нів'євська, Л. О. Горбатько, Л. О. Михальський // Магістеріум. Вип. 16. Природничі науки / Національний університет "Києво-Могилянська академія". - 2004. - С. 29-35.

33. Хлорамін Б [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/item-hloramin-b-2>

34. ІНСТРУКЦІЯ із застосування засобу «Новохлор-екстра» з метою дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/wp-content/uploads/2020/06/Instructions-Novohlor-Extra-2019-uk.pdf>

35. Новохлор-екстра/Інтердез. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>
36. СОДА КАУСТИЧНА [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://krebs-feed.com.ua/product/%D1%81%D0%BE%D0%B4%D0%B0-%D0%BA%D0%B0%D1%83%D1%81%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%BD%D0%B0/>
37. БІОМОЙ МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ (ІНСТРУКЦІЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>
38. Перекачування азотної кислоти і каустичної соди. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tapflo.ua/ua/example-cases-2/perekachivanie-azotnoj-kisloty-i-kausticheskoy-sody>
39. Розчин для антисептики та гігієни рук, Sterillium Classic Pure,(Стериліум Класік Пур),5л. BODE CHEMIE. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vdsstomat.com.ua/product/sterillium-klasik-pur-sterillium-classic-pure-5l/>
40. НЕОСТЕРИЛ М / Baltiachemi. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/antisepticheskoe-sredstvo-neosteril-m-baltiachemi-kiev>
41. Вентилятор дутьевой ВДН №15 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://khvent.com.ua/p1248830087-ventilyator-dutevoj-vdn.html?source=merchant_center&gclid=EAIaIQobChMIk7Ttt5ClggMVkYtoCR07eg7ZEAQYAiABEgLFkvD_BwE .
42. Фільтр грубої очистки повітря DustFilter E100 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://growpro.ua/ua/catalog/detail/filtr-gruboy-ochistki-vozdukha-dustfilter-e100/> .
43. Компресор двоступінчастий з ремінною передачею Fini BK119-500F-7.5/AP E100 [Електронний ресурс]. – Режим доступу:

<https://storgom.ua/ua/product/kompressor-dvuhstupenchatyi-s-remennoi-peredachei-fini-bk119-500f-75-ap.html> .

44. ОХОЛОДЖУВАЧ ПОВІТРЯ КАНАЛЬНИЙ С-VKO-50-30 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ccktm.prom.ua/ua/p185481854-ohladitel-vozduha-kanalnyj.html> .

45. Ресивер Повітряний Лідер 10 бар 495 к. с. РВ495.600.01 (1") для компресора (PRM013235) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://tusk.ua/ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-495-l-rv49560001-1-dlya-kompressora/> .

46. КАНАЛЬНИЙ ВОДЯНИЙ ПОВІТРОНАГРІВАЧ КАНАЛ-КВН 40-20 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://teko-ua.com/ua/vodyanoj-vozdixonagrevatel-kanal-kvn.html> .

47. Карманный фильтр ФЯК F9 592х490х600-8 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://asfilter.com.ua/catalog/karmannye-filtry/karmannyj-filtr-592kh490kh600-8-f9/> .

48. Масовий рідинний дозатор ДЖМ-1 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://pack-tech.com.ua/ua/p1181953771-massovyj-zhidkostnyj-dozator.html?source=merchant_center&gclid=EAIaIQobChMI7seEiL-gggMVVpuDBx0XBADOEaQYCCABEGJpqPD_BwE .

49. Реактор 20 л, для виробництва м'яких лікарських форм та аерозолів розрахований на робочий тиск: – 1 + 6 бар [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-20-l-davlenie-1-6-bar/> .

50. Насос відцентровий Aquatica 0.37кВт 44м-10л/хв/10м-80л/хв ф94мм+бл.упр 1.5м кабелю [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://sdplus.com.ua/nasos-tsentrobezhnny-0-37kvt-h-57-38-m-q-60-40-l-min-85mm-aquatica-dongyin-777112> .

51. Поршневий дозатор с додатковим тиском в бункері [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p856373339-porshnevoj-dozator->

dopolnitelnym.html?source=merchant_center&gclid=EAIaIQobChMI35uDrcKgggMVViZiDBx1R6ALjEAQYBCABEgJ0w_D_BwE .

52. Фільтрполотно Петрянова ФПП-15-1,5 розмір 150 см х 90 см, площа 1,35 м. кв. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://brom.ua/uk/filtrpolotno-petrianova-ukr> .

53. Biostat® Cplus [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://sartorius.com.ua/fermenteri-i-bioreaktori/sterilizuyemi-na-misczi-fermenteri-bioreaktori-cip/biostat-cplus/> .

54. ЦКТ на 100 літрів [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://termopab.com.ua/ua/p1097166722-tskt-100-litrov.html> .

55. Biostat STR 1000 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-str.html> .

55. Factory price 200L-20000L liquid chemical stainless steel 304/316 mixing tank with agitator jacketed heating mixer tank reactor [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Factory-Price-200L-20000L-Liquid-Chemical_1600909389349.html?s=p .

56. 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. – 79 с.

57. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>.

58. Лабораторний практикум з хімії і фізики молока і молочних продуктів / Укладачі: В.П. Ясній, Т.А. Довбуш. – Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2018. – 182 с.

59. Біохімія : навчальний посібник / С.В. Прилуцька, І.І. Гринюк, Т.А. Ткаченко. – Київ : НУБІП України, 2022. – 193 с.

60. Годівля тварин і технологія кормів. Зоохіманаліз кормів : метод. реком. до виконання лабораторно-практичних занять для здобувачів вищої освіти СВО "Бакалавр" освітньої спеціальності 204 "ТВППТ" денної форми навчання / уклад. : О. О. Кравченко. Миколаїв : МНАУ, 2021. 52 с.

61. Характеристика сучасних методів визначення сирого протеїну у кормах та рослинній сировині / Г. В. Кушнір, Т. Р. Левицький, Г. П. Ривак, Л. В. Курилас, О. М. Вільха, Г. Ю. Федор // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія : Ветеринарні науки. - 2017. - Т. 19, № 82. - С. 97-100.

62. Дехтяр Ю. Ф. Годівля тварин і технологія кормів : курс лекцій / Ю. Ф. Дехтяр. - Миколаїв : МНАУ, 2014. - 129 с.

63. AQUASANA RHINO EQ-30000-WELL. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://by.ebay.com/b/Aquasana-Water-Filtration-Systems/116400/bn_77049297 .

64. Перекачування азотної кислоти і каустичної соди. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tapflo.ua/ua/example-cases-2/perekachivanie-azotnoj-kisloty-i-kausticheskoy-sody> .

65. Особливості дотримання техніки безпеки при роботі в біохімічній та хімічній лабораторіях: навч. посібник для студентів та викладачів вузів / К. В. Александрова, В. М. Швець, М. В. Дячков, Д. А. Васильєв. - Запоріжжя: [ЗДМУ], 2017. – 76 с.

66. Чуєшов В. І., Гладух Є.В. Технологія ліків промислового виробництва. Том 2: підручник для фарм. ф-тів ВМНЗ IV р.а. – Вінниця: Нова Книга, 2014 – 664 с.

67. Nachal, Visalakshi & Mohanty, Cheerag & Irshath, Aadil & Rajan, Anand. (2023). A Review on Recycle of Waste To Make Prosthetics. *IJRAR*, 10, 5 - 13. 10.5281/zenodo.7964869.