

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
(ім'я та прізвище)

(підпис)

«__» червня 2023 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

(підпис)

«__» червня 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: Одержання біомаси *Lactobacillus casei* як компонента заквашувальної
композиції для виробництва кефіру

Виконав: здобувач IV курсу, групи _____

КОЛЕСНИК Марина Ігорівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник БЕЛЕМЕЦЬ Тетяна Олександрівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 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 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОЛЕСНИК Марини Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Одержання біомаси *Lactobacillus casei* як компонента заквашувальної композиції для виробництва кефіру

керівник роботи БЕЛЕМЕЦЬ Тетяна Олександрівна, ст. викл.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи *Lactobacillus casei*, кефір, заквашувальні культури

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Розділ 1. Характеристика *Lactobacillus* у складі заквашувальної композиції для виробництва кефіру. Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування. Розділ 4. Біосинтез цільового продукту. Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Розділ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. Розділ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. Розділ 8. Методи

ідентифікації цільового продукту та визначення показників його біологічної дії.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема одержання біомаси *Lactobacillus casei* як компонента заквашувальної композиції для виробництва кефіру – 1 аркуш формату А1. . Апаратурна схема одержання біомаси *Lactobacillus casei* як компонента заквашувальної композиції для виробництва кефіру – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	<i>Характеристика <i>Lactobacillus</i> у складі заквашувальної композиції для виробництва кефіру</i>	<i>01.03.2023–08.03.2023</i>	
2	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>09.03.2023–19.03.2023</i>	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>20.03.2023–31.03.2023</i>	
4	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	<i>01.04.2023–06.04.2023</i>	
5	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>07.04.2023–16.04.2023</i>	
6	<i>Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	<i>17.04.2023–27.04.2023</i>	
7	<i>Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>	<i>28.04.2023–07.05.2023</i>	
8	<i>Методи ідентифікації цільового продукту та визначення показників його біологічної дії</i>	<i>08.05.2023–15.05.2023</i>	
9	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	<i>16.05.2023–22.03.2023</i>	
10	<i>Виконання графічної частини роботи</i>	<i>23.03.2023–31.05.2023</i>	

Здобувач _____
(підпис)

Марина КОЛЕСНИК
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна БЕЛЕМЕЦЬ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології отримання біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 для подальшого використання в якості складової сироватки для виготовлення кефіру

В даній роботі проведено порівняння біологічних агентів які використовуються для виробництва кефіру, а саме роду *Lactobacillus*, та визначено найкращого з розглянутих, яким виявився *Lactobacillus plantarum* AS-14. Даному біологічному агенту притаманна найменша умовна вартість 1 г біомаси (0,31 грн/г) та найбільший показник синтезованого продукту за годину (0,668 г/год), в порівнянні з іншими представниками.

Розглянуто потребу в бактеріальних заквасках для виробництва кефіру та розраховано теоретичну річну потребу в *Lactobacillus plantarum*, яка складає 238 кг. Розраховано потужність виробництва, для задоволення річної потреби якої необхідно використовувати виробничий ферментер об'ємом 0,63 м³, при використанні якого кількість виробничих циклів становитиме 51 в рік.

Розроблено технологічну та апаратурну схеми синтезу біомаси *L. plantarum* AS-14, які передбачають наявність допоміжних робіт (підготовка азоту, приготування титрувальних розчинів для регулювання рівня рН і приготування та стерилізація поживного середовища) та технологічного процесу (отримання посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14 та виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14).

Кваліфікаційна робота складається з вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (45 найменувань), апаратурної та технологічної схеми (2 листа формат А1). Загальний обсяг роботи – 59 сторінок, 4 рисунки, 16 таблиць.

Ключові слова: *Lactobacillus*, кефір, заквашувальні композиції, кефірні зерна, *Lactobacillus plantarum*, пробіотик, гіпохолестеринемічний ефект.

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Колесник М.І.			РЕФЕРАТ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.					2	61
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Характеристика <i>Lactobacillus</i> у складі заквашувальної композиції для виробництва кефіру	6
1.1. Загальна характеристика та склад кефіру	6
1.2. Застосування <i>Lactobacillus</i> в заквашувальних композиціях	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	10
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	14
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	16
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	17
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	18
3.1. Потреба в заквасках <i>Lactobacillus plantarum</i>	18
3.2. Розрахунок потужності виробництва	19
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	22
РОЗДІЛ 4. Біосинтез біомаси <i>lactobacillus plantarum</i> as-14.....	25
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	25
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	27
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	28
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	28
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	28
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки азоту	29

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ								
					ЗМІСТ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Колесник М.І.											
Перевір.		Белемець Т.О.											
Консультант													
Н. Контр.					Кафедра БТМ								
Затверд.		Стабніков В.П.											

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	30
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	35
5.1.4.1. Вирощування інокуляту <i>Lactobacillus plantarum AS-14</i> в колбах на качалці.....	35
5.1.4.2. Вирощування інокуляту в інокуляторі та посівному апараті	36
5.1.4.3. Виробничий біосинтез	36
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	38
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	41
РОЗДІЛ 8. Методи ідентифікації цільового продукту та визначення показників його біологічної дії.....	52
8.1. Мікробіологічний контроль.....	52
8.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	52
8.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища	53
8.2. Визначення показників бактеріального росту	53
8.2.1. Визначення кількості життєздатних клітин	53
8.2.2. Визначення концентрації біомаси	54
8.3. Визначення концентрації джерел вуглецю та азоту	54
8.3.1. Визначення концентрації джерела вуглецю	54
8.3.2. Визначення концентрації джерела азоту	56
Література.....	57

ВСТУП

Сучасні тенденції світового продовольчого ринку включають використання пробіотичних добавок, біоактивних інгредієнтів та молочних напоїв в раціоні харчування. Активне використання кисломолочних напоїв та розробка нових промислових технологій, виробництва класичних молочних продуктів, свідчать про актуальність і комерційну привабливість оптимізації біотехнологічного процесу отримання даних речовин [1].

Одним з таких продуктів є кефір, це кисломолочний продукт, отриманий в результаті спільного молочнокислого і спиртового бродіння лактози, що міститься в молоці. Кефір отримують шляхом інокуляції молока кефірними зернами або заквасками із відносно стабільним і специфічним співвідношенням бактерій і дріжджів. В основному для виробництва кефіру використовують кефірні зерна, що не дозволяє повністю контролювати стандартні вихідні параметри готового продукту, в той час як при використанні заквасок дані проблеми відсутні [2]. Склад біологічних заквасок для виробництва кефіру різний у кожному регіоні світу, але в кожній заквасці можна побачити представників роду *Lactobacillus*, серед яких іноді можна спостерігати *Lactobacillus plantarum*. Дослідження продемонстрували що дана бактерія позитивно впливає на організм людини, а саме якщо використовувати *Lactobacillus plantarum* в кефірних заквасках то в організмі людини знижується рівень холестерину, що на сьогодні є великою проблемою, а також дана культура не змінює властивості інших представників симбіотичної культури заквасок [3].

Отже, нині є актуальним використання представників виду *Lactobacillus plantarum* в складі заквашувальної культури, серед даних представників доцільно використовувати *Lactobacillus plantarum* AS-14, який для синтезу біомаси використовує сирну сироватку, яка є відходами виробництва сиру.

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Колесник М.І.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемєць Т.О.					5	61
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					Кафедра БТМ			

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА *LACTOBACILLUS* У СКЛАДІ ЗАКВАШУВАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА КЕФІРУ

1.1. Загальна характеристика та склад кефіру

Lactobacillus – рід грампозитивних паличкоподібних анаеробних бактерій також нормальний резидент ротової порожнини, кишечника, вульви та піхви людини. Лактобактерії містяться в ферментованих продуктах, таких як йогурт, сир та кефір [4].

В даний час виробництво кефіру регулюється міжнародними та національними нормативами. Відповідно до стандартних норм мікробна спільнота для ферментів кефіру включає такі основні групи бактерій: дріжджі (лактозоферментуючі дріжджі *Kluveromyces marxianus* і дріжджі, що не ферментують лактозу – *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevicobaccobasic*, *Laccharomyces cerevicoccobasic*, *Laccharomyces cerevicoccobasic*, *Laccharomyces cerevicoccobasic*. *Lactobacillus casei*, гомо- і гетероферментативний лактокок та *Acetobacter aceti*. Роль цих мікроорганізмів важлива, оскільки вони тісно симбіотичні під час ферментації молока, забезпечуючи специфічні органолептичні характеристики та функції кінцевого активного продукту [4].

Кефір - це змішаний молочно-спиртовий продукт бродіння, отриманий шляхом сквашування молока з симбіотичною кефірною закваскою в концентраті кефірного гриба або грибкових кефірних дріжджів.

Таблиця 1.1

Таблиця органолептичних показників кефіру

Назва	Характеристика
Зовнішній вигляд і консистенція	Однорідна, в'язка, з порушеним або непорушеним згустком (залежно від технології виробництва). Дозволено: газоутворення, яке спричинено нормальною життєдіяльністю мікрофлори кефірної закваски; незначне відокремлення сироватки

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ			
Розроб.		Колесник М.І.			РОЗДІЛ 1. Характеристика <i>Lactobacillus</i> у складі заквашувальної композиції для виробництва кефіру	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.					6	61
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Назва	Характеристика
Смак і запах	Чистий, кисломолочний. Смак щипкий, без сторонніх присмаків і запахів
Колір	Молочно-білий, рівномірний за всією масою
Примітка. Дозволено незначне здіймання герметичного спожиткового пакування з кефіром, що спричинено газоутворенням внаслідок дії мікрофлори кефірної закваски.	

Цей кефірний напій характеризується наявністю газу, який утворюється внаслідок діяльності кефірної мікрофлори, що бродить.

Вміст молочної кислоти в готовому продукті 0,8-1,5%, етанолу 0,05-2,00%, вуглекислого газу до 0,2%. До складу кефіру входять і інші метаболіти мікрофлори кефіру, а саме: органічні кислоти (оцтова, пропіонова та мурашина), специфічні смакові речовини, в'язкі екзополімери та ін. Висока протеолітична активність *Lactobacillus* призводить до накопичення в продукті вільних амінокислот (у тому числі незамінних амінокислот), а завдяки активності дріжджів кефір багатий на вітаміни В1, В2, К, фолієву кислоту, біотин [4].

Серед добре відомих функціональних властивостей кефіру є антагоністична активність по відношенню до широкого кола грампозитивних і грамнегативних бактерій, сприяння травленню, посилення імунітету. Основні метаболіти дріжджів та молочнокислих бактерій кефірних грибків та заквасок - спирт та молочна кислота, поряд зі специфічними антибактеріальними сполуками, - запобігають розвитку сторонніх мікроорганізмів.

Так, на прикладі, *Lactobacillus*, виявляє ряд корисних функцій а саме:

- Продукують молочну кислоту, яка дозволяє знижувати рівень кислотності у травній системі та пригнічує ріст умовно-патогенних мікроорганізмів.[5]
- Збільшують частоту знищення *Helicobacter pylori* [6].
- Володіють високою біологічною та функціональною активністю, що визначає їх практичне використання як пробіотик, різних БАДів та у виробництві біопродуктів для надання їм пробіотичних властивостей та

корекції мікрофлори ШКТ, а також як лікарських препаратів для відновлення нормальної мікрофлори піхви та імуностимуляторів.[5]

Видовий склад домінуючих представників наступний: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis*. Слід зазначити, що ці лактобацили характеризуються вираженою антагоністичною дією щодо бактерій групи кишкової палички [4]

1.2. Застосування *Lactobacillus* в заквашувальних композиціях

Оскільки *Lactobacillus* використовується у складі закваски, то не дивно, що досліджується різний вплив культивування на якість різних молочних продуктів. Навіть у симбіозі з *Kluuyveromyces fragilis* він виробляє більше кислоти за короткий час.

Отже, розглянемо різні закваски, які представлено на ринку, для одержання кефіру. Аналіз представлено в табл. 1.2

Таблиця 1.2

Склад різних заквасок для кефіру, представлених на ринку

Назва	Торгова марка	Склад	Джерело
Закваска Vivo	Vivo	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	[7]
Закваска для кефіру KEFIR 2 Хансен, 100 U	KEFIR 2 Хансен 100 U	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	[8]

Закваска для кефіру	GENESIS	<i>Lactococcus lactis sp. Lactis,</i> <i>Lactococcus lactis sp. cremoris,</i> <i>Lactococcus lactis sp. lactis biovar.</i> <i>Diacetylactis, Leuconostoc</i> <i>mesenteroides sp. Cremoris,</i> <i>Streptococcus salivarius sp.</i> <i>Thermophiles,</i> <i>Lactobacillus kefir, Candida kefir,</i> <i>Sacchromuces unisporus,</i>	[9]
Закваска для кефіру DI-PROX K 01	BIOPROX	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> <i>Lactococcus lactis subsp lactis var</i> <i>diacetylactis Leuconostoc mesenteroïdes</i> <i>ssp cremoris Streptococcus</i> <i>thermophilus Lactobacillus acidophilus</i>	[10]

Як видно з таблиці 1.2. мало заквасок використовує наш продуцент.

Важливим параметром є вміст життєздатних клітин в залежності від типу заквашувального препарату [4].

Також можна зазначити, що під час виробництва кефіру наявний збалансований розвиток всіх груп мікроорганізмів забезпечує одержання продукту з індивідуальними органолептичними властивостями. Так, представники роду *Lactobacillus* синтезують молочну кислоту, специфічні екзополісахариди та проявляють чудову антагоністичну активність щодо сторонньої мікрофлори; *Leuconostoc ssp.* та *L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* утворюють смакоароматичні сполуки (діацетил, ефіри, леткі кислоти) та вуглекислий газ; види *L. lactis subsp. Cremoris* та *S. thermophilus* надають продукції сметаноподібної консистенції; лактозоброджувальні є ініціаторами спиртового бродіння з утворенням етанолу та CO₂, а оцтовокислі бактерії синтезують оцтову кислоту, яка надає кефіру гострого освіжаючого смаку.

Тому необхідною умовою отримання якісного кефіру є підтримання структури мікробної спільноти кефіру на певному рівні, що забезпечує необхідний процес формування для процесу бродіння.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

В основному в якості продуцентів кефірних заквасок виступають представники роду *Lactobacillus*, розглянемо більш детально порівняльну характеристику декількох представників даного роду, дані порівняння біологічних агентів наведено в табл. 2.1.

Lactobacillus plantarum AS-14 при рості на поживному середовищі з сирною сироваткою та глюкозою які виступають в якості джерела вуглецю накопичує найбільшу концентрацію біомаси (16,02 г/л) в порівнянні з іншими продуцентами, а також має найменший час культивування (24 год) [11].

Lactobacillus casei NRRL 1917 при використанні лактози в якості джерела вуглецю накопичує найменшу концентрацію біомаси (6,51 г/л) за відносно невеликий проміжок часу (48 год) [12].

Lactobacillus casei MTCC 1423 при рості на цукровій патоці накопичує приблизно в 2,3 рази більшу кількість біомаси (14,98) в порівнянні з *L. casei* NRRL 1917, але для накопичення даної кількості біомаси витрачає приблизно в 1,2 рази більше часу (59,5 год) [13].

Враховуючи різний склад поживного середовища, накопичену концентрацію біомаси та час культивування, складно визначити найкращого біологічного агента, тому для початку слід визначити вартість поживного середовища. Порівняння вартості поживного середовища для культивування розглянутих біологічних агентів наведено в табл. 2.2.

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Колесник М.І.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.				10	61
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента							

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика штамів, які використовуються для виробництва кефіру

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Умови культивування	Література
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS-14	Сирна сироватка – 60; Глюкоза – 15; Кукурудзяний екстракт – 15; Ацетат натрію – 5; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 5; Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O – 2; C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇ – 2; MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,3; MnSO ₄ ×4H ₂ O – 0,04	16,02	24 год, pH 6,2 40 °C Анаеробно	Manzoor A., Qazi J. I., Haq I. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain <i>Lactobacillus plantarum</i> (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. <i>Journal of Biological Engineering</i> . 2017, 11(1). doi:10.1186/s13036-017-0059-2
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL 1917	Лактоза – 76; Соєвий шрот – 72; Дріжджовий екстракт – 2; MgSO ₄ – 0,7	6,51	48 год pH 6,5 37 °C 200 об/хв	Eyahmalay J., Elsayed E.A. Statistical Optimization Approaches for High Cell Biomass Production of <i>Lactobacillus casei</i> . <i>Journal of Scientific & Industrial Research</i> . 2020, 70: 216-221
<i>Lactobacillus casei</i> MTCC 1423	Цукрова патока – 190; Кукурудзяний екстракт – 25; MnSO ₄ – 0,02; CaCO ₃ – 47,5	14,98	59,5 год pH 6,75 38 °C	Thakur A., Panesar P. S., Saini M.S. Optimization of process parameters and estimation of kinetic parameters for lactic acid production by <i>Lactobacillus casei</i> MTCC 1423. <i>Biomass Conversion and Biorefinery</i> . 2018. doi:10.1007/s13399-018-0347-1

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Lactobacillus plantarum AS-14, *Lactobacillus casei* NRRL 1917 та*Lactobacillus casei* MTCC 1423

Продуцент	Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1 – 11)*
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS-14	Сирна сироватка	60	45	2,7	1
	Глюкоза	15	55	0,825	2
	Кукурудзяний екстракт	15	35	0,525	3
	Ацетат натрію (NH ₄) ₂ SO ₄	5	64	0,32	4
	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	5	20	0,1	12
	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	2	130	0,26	13
	C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇	2	112	0,224	14
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,3	36	0,011	5
	MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,04	43	0,002	6
Вартість 1 л середовища – 4,967 грн					
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL 1917	Лактоза	76	110	8,36	7
	Соевий шрот	72	17,5	1,26	8
	Дріжджовий екстракт	2	1 100	2,2	9
	MgSO ₄	0,7	36	0,03	5
	Вартість 1 л середовища – 11,85 грн				
<i>Lactobacillus casei</i> MTCC 1423	Цукрова патока	190	84	15,96	10
	Кукурудзяний екстракт	25	35	0,875	3
	MnSO ₄	0,02	43	0,001	6
	CaCO ₃	47,5	41	1,948	11
	Вартість 1 л середовища – 18,784 грн				

Примітка: * – Ціни вказано станом на травень 2022 р.

- https://prom.ua/ua/p1661376480-suhaya-molochnaya-syvorotka.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_50_produkty_pitaniya&gclid=CjwKCAjw67ajBhAVEiwA2g_jEA0tFTmn78Yc-A6kXVq8Zvb8vNQnlcL31KGHi90p-VLoktFnwzppJBoCllgQAvD_BwE
- <https://prom.ua/ua/p1559014336-glyukoza-pishevaya-meshok.html>
- <https://prom.ua/ua/p1310282824-ekstrakt-kukuruznyj-litrov.html?&primelead=MC40MjU>
- https://prom.ua/ua/p1133584024-atsetat-natriya-vodnyj.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cp_c_1&gclid=CjwKCAjw67ajBhAVEiwA2g_jED9PqEBfPfh0BPYoGBxoRgLNn0W1riwOUWjX1VUUVxPbwvtbhBwXmRoCpZoQAvD_BwE

5. https://tukva.in.ua/p1336584164-sulfat-magniya.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjw67ajBhAVEiwA2g_jEBIhbhuhIVO03nGcJpx64Zs3bY8eWglaNpcH0RryuYoWYdNLnT7V1hoCazkQAvD_BwE
6. <https://prom.ua/ua/p47505427-sulfat-margantsa.html>
7. https://all-him.com.ua/p/2165287-laktoza/?o=tG0FgrPrkLQIV31-IMkrYg==&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAjw67ajBhAVEiwA2g_jEDNPDv_mC60TJ-ZGfuJvxMsTmgaRIMgJYyRX0Qdoxv7aSy09Y6OKKhoCEnYQAvD_BwE
8. <https://prom.ua/ua/p963613132-soevyj-shrot-protein.html?&primelead=MC44NQ>
9. <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
10. https://33konditera.com.ua/product/%D0%BF%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BA%D0%B0-1000%D0%B3/?srsltid=AR57-fCzQryfsXgD7DgLkpAwbY_0GIA41S_zeJ6O4OTxJ8LSg7AnlNVChlQ
11. https://prom.ua/ua/p1261706371-kaltsij-karbonat-uglekislyj.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=CjwKCAjw67ajBhAVEiwA2g_jEPXxy1N-yaDPZFYATCbqFpqEE7f3ix0Lzfa-LspZF4zNIaNyRixOohoCab8QAvD_BwE
12. <https://harkiv-torg.com.ua/ua/p740948461-sulfat-ammoniya-ammoniumsulphate.html>
13. <https://prom.ua/ua/p509301658-gidrofosfat-natriya-natrij.html>
14. <https://prom.ua/ua/p1799845715-tsitrat-natriya-trinatrij.html?&primelead=NC4z>

Розглянувши табл. 2.2. можна зробити висновок, що *Lactobacillus casei* MTCC 1423 має найбільшу вартість 1 л поживного середовища (18,78 грн/л), менша вартість 1 л поживного середовища притаманна *Lactobacillus casei* NRRL 1917 (11,85 грн/л). найдешевше обійдеться вирощувати *Lactobacillus plantarum* AS-14 (4,967 грн/л), вартість 1 л поживного середовища для вирощування даного продуцента в 2,7 та 4,3 рази менша в порівнянні з *L. casei* NRRL 1917 та *L. casei* MTCC 1423, відповідно.

Для остаточного вибору оптимального продуцента необхідно розглянути умовну вартість 1 г накопиченої біомаси та кількість утвореної біомаси за 1 год. Порівняння умовної вартості 1 г біомаси для *Lactobacillus plantarum* AS-14, *Lactobacillus casei* NRRL 1917 та *Lactobacillus casei* MTCC 1423 наведено в табл. 2.3.

Умовна вартість 1 г біомаси при культивуванні *Lactobacillus plantarum* AS-14, *Lactobacillus casei* NRRL 1917 та *Lactobacillus casei* MTCC 1423

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси, г/л	Умовна вартість 1 г біомаси, грн/г	Час культивування, год	Кількість синтезованої біомаси за годину, г/год
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS-14	4,967	16,02	0,31	24	0,668
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL 1917	11,85	6,51	1,82	48	0,136
<i>Lactobacillus casei</i> MTCC 1423	18,784	14,98	1,25	59,5	0,252

З даних наведених в табл. 2.3, можна зробити висновок, що серед розглянутих продуцентів найгіршим є *Lactobacillus casei* NRRL 1917, через найменшу кількість утвореної біомаси за 1 год (0,136 г/год) та найбільшу вартість 1 г біомаси (1,82 грн/г), в порівнянні з іншими біологічними агентами. Кращими досліджуваними показниками володіє *Lactobacillus casei* NRRL 1917, даний продуцент проявляє майже в 2 рази кращі показники синтезу біомаси за 1 год (0,252 г/год) та приблизно на 31 % менша умовна вартість 1 г біомаси (1,25 грн/г) в порівнянні з *L. casei* NRRL 1917. Найменшу умовну вартість 1 г біомаси проявляє *Lactobacillus plantarum* AS-14 (0,31 грн/г) та синтезує найбільшу кількість біомаси за 1 год (0,668 г/год).

Підсумовуючи вище перераховане, можна дійти висновку що оптимальним варіантом для синтезу біомаси буде використання *Lactobacillus plantarum* AS-14, який володіє найменшою умовною вартістю 1 г синтезованої біомаси (0,31 грн/г) та найбільшим показником синтезованої біомаси за 1 год (0,668 г/год).

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Обравши біологічного агента слід впевнитись, що вказана інформація з статті [11], дійсно дозволить синтезувати дану кількість біомаси, тому слід провести розрахунок складу поживного середовища.

Lactobacillus plantarum AS-14 синтезує 16,02 г/л біомаси, хімічний склад клітини мікроорганізму складається з 50 % вуглецю та 10 % азоту, отже, для синтезу даної кількості біомаси необхідно $16,02 \times 50\% = 8,01$ г/л вуглецю, але враховуючи що для синтезу необхідна енергія то приблизно стільки ж вуглецю піде не холосте окислення, а також необхідно $16,02 \times 10\% = 1,602$ г/л азоту.

В поживному середовищі в якості джерела вуглецю виступає глюкоза та сирна сироватка, яка на 70 % складається з лактози (60 г/л \times $70\% = 42$ г/л лактози) [14].

$$\text{Глюкоза (C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 15 \text{ г/л}$$

$$M(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 180 \text{ г/моль}$$

$$M(\text{C}_6) = 72 \text{ г/моль}$$

$$15 \times 72 / 180 = 6 \text{ г/л вуглецю}$$

$$\text{Лактоза (C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}) = 42 \text{ г/л}$$

$$M(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}) = 342 \text{ г/моль}$$

$$M(\text{C}_{12}) = 144 \text{ г/моль}$$

$$42 \times 144 / 342 = 17,68 \text{ г/л вуглецю}$$

Отже, загальна кількість вуглецю в поживному середовищі становить $6 + 17,68 = 23,68$ г/л, що задовольняє наші вимоги.

В якості джерела азоту в поживному середовищі слугує сирна сироватка, кукурудзяний екстракт та сульфат амонію. Кукурудзяний екстракт вміщує приблизно 7,7 % азоту [15], а сирна сироватка – 0,14 % азоту [16].

$$\text{Сульфат амонію ((NH}_4)_2\text{SO}_4) = 5 \text{ г/л}$$

$$M((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) = 132 \text{ г/моль}$$

$$M(\text{N}_2) = 28 \text{ г/моль}$$

$$5 \times 28 / 132 = 1,061 \text{ г/л вуглецю}$$

В 15 г/л кукурудзяного екстракту знаходиться $15 \times 7,7\% = 1,155$ г/л азоту, а в 60 г/л сирної сироватки $60 \times 0,14\% = 0,084$ г/л азоту. Загальна кількість азоту в поживному середовищі становить:

$$1,155 + 0,084 + 1,061 = 2,3 \text{ г/л азоту.}$$

Необхідна кількість становить 1,602 г/л азоту, отже можна зробити висновок що в наявному поживному середовищі кількість азоту задовольняє наші потреби.

Підсумовуючи, можна зробити висновок, що за джерелом вуглецю та джерелом азоту даний кількісний склад поживного середовища відповідає потребам для синтезу біомаси з запасом.

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

Lactobacillus plantarum AS-14 — грампозитивна неспороутворювальна бактерія, клітини якої являють собою нерухомі прямі палички із заокругленими кінцями (завширшки 0,9–1,2 мкм і завдовжки 3–8 мкм), що можуть розташовуватися поодиночі, парами або короткими ланцюжками (рис. 2.1). Колонії *L. plantarum* AS-14 на агаризованих середовищах зазвичай невеликі (2-5 мм) з цільними полями, опуклі, гладенькі, блискучі та зазвичай непрозорі з каротиноїдним пігментом 4,4'-діапоннейропонеїроспореном. [17, 18].



Рис. 2.1. *Lactobacillus plantarum* AS-14 під мікроскопом (зліва) і на агаризованому середовищі MRS (справа)

Lactobacillus plantarum AS-14 є аеротолерантними факультативно гетероферментативними бактеріями, які виробляють обидва ізомери молочної кислоти (D- і L-). Для росту необхідні такі фактори росту, як кальцію пантотенат і ніацин. Оптимальним рН для росту *L. plantarum* AS-14 є діапазон від 3,4 до 8,8, температурні межі росту – від 12 °С до 40 °С (оптимум 30-40

°C). Здатен зброджувати амігдалін, целобіозу, ескулін, глюконат, манітол, мелібіозу, рафінозу, рибозу, сорбіт і сахарозу [17].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Домен: *Bacteria*

Тип: *Bacillota*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Lactobacillales*

Сімейство: *Lactobacillaceae*

Рід: *Lactobacillus*

Вид: *Lactobacillus plantarum*

Штам: *Lactobacillus plantarum* AS-14

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба в заквасках *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum — це універсальна молочнокисла бактерія, яка зустрічається в низці екологічних ніш, включаючи м'ясо, рибу, фрукти, овочі, молоко та зернові продукти. Після повного визначення послідовності генома *L. plantarum* WCFS1, вчені почали досліджувати функції даного виду.

На сьогодні встановлено що даний вид *Lactobacillus* володіє функціями які можуть позитивно вплинути на організм людини при споживанні, розглянемо більш детально дані дослідження.

Вчені в 2009 році провели [19] дослідження в якому вивчили вплив *Lactobacillus plantarum* MA2, ізольованого з тибетського кефіру, на зниження рівня холестерину у щурів *in vivo*. Під час дослідів було встановлено що при споживанні щурами *Lactobacillus plantarum* MA2 рівень загального холестерину в сироватці крові значно зменшився, також відзначались знижені показники холестерину ліпопротеїнів низької щільності та тригліцеридів, в той час як показник холестерин ліпопротеїнів високої щільності не зазнав змін.

В 2013 році *Huang* з співаторами провели аналогічні дослідження з *Lactobacillus plantarum* Lp27 [20], дана культура була ізольована з зерен тибетського кефіру. Під час дослідів було визначено такі самі результати як і при раніше згаданому. Дані результати демонструють що представники *Lactobacillus plantarum* можуть бути ефективними пробіотиками, що знижують рівень холестерину.

В 2013 році було проведено дослідження [21] в якому вчені перевіряли захисну дію суміші, що складається з мікроорганізмів, виділених із кефіру (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lc. lactis*, *Kluyveromyces marxianus* і *Saccharomyces cerevisiae*) на моделі хом'яка, інфікованого

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування			Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Колесник М.І.								18	61
Перевір.		Белемець Т.О.									
Консультант											
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ						

Clostridium difficile. В ході дослідження було встановлено що пероральне лікування сумішшю бактерій і дріжджів, виділених із кефіру, запобігає діареї та ентероколіту, викликаним *C. difficile*. В даному дослідженні не відбувалось встановлення властивостей окремо *Lactobacillus plantarum* від мікробної спільноти, але можна зробити висновок, що він в суміші мікроорганізмів не пригнічує позитивну дію інших представників.

Розглянувши декілька досліджень спрямованих на встановлення властивостей *Lactobacillus plantarum*, можна зробити висновок, що використання даного представника в кефірних заквасках позитивно вплине на організм людини, а саме буде знижувати рівень холестерину, що на сьогодні є великою проблемою, та не погіршить властивості інших представників симбіотичної культури заквасок.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно статистичних даних спілки молочних підприємств України у 2020 році, виробництво кефіру становило 145,2 тис. т [22].

Слід також врахувати наявну тенденцію на збільшення кількості споживання кефіру, так з 2017 року по 2020 рік виробництво кефіру збільшилось майже на 11,5 %. Тому доцільно для подальших розрахунків збільшити показник виробництва 2020 року на дане значення.

$$145,2 \text{ тис. т} + 11,5 \% = 161,9 \text{ тис. т}$$

Для комерційного приготування кефіру зазвичай використовують кефірні зерна, які є мікроколоніями симбіотичних мікроорганізмів, дана технологія отримання є добре вивченою та перевіреною часом, але в ній є велика кількість недоліків, а саме можливість утворення різної за показниками кінцевої продукції в залежності від партії (через можливу зміну мікробіоти в кефірних зернах). На сьогодні набирає популярності використання ліофілізованої закваски, даний спосіб виробництва кефіру є більш прогнозованим, а саме види мікроорганізмів відбираються в лабораторних умовах і можна контролювати необхідний симбіотичний склад. Тому, в нашому випадку ми будемо виготовляти *Lactobacillus plantarum* для кефірних

заквасок, враховуючи що точно розрахувати необхідну кількість біомаси для даного продукту неможливо та наявність великої кількості літературних джерел присвячених кефірним зернам, розрахунок буде відбуватись по кефірним зернам, з перерахунком на закваски (враховуючи вологу).

Для приготування кефіру до молока вносять приблизно 5% зерен від об'єму молока [23]. Для визначення необхідного об'єму мікроорганізмів слід розрахуємо необхідну кількість зерен для отримання 161,9 тис. т кефіру.

$$161,9 \text{ тис. т} \times 5 \% = 8,095 \text{ тис. т кефірних зерен.}$$

Для визначення необхідної кількості закваски (яка складається з ліофілізованих мікроорганізмів), слід врахувати вологу яка наявна в кефірних зернах, прийємо що вологість кефірних зерен становить 80 %.

$$8,095 \text{ тис. т} \times 0,2 = 1,619 \text{ тис. т мікробіологічної маси.}$$

Як зазначалось раніше закваски складаються з різних видів мікроорганізмів, які умовно можна поділити на чотири групи: гомоферментативні та гетероферментативні молочнокислі бактерії та дріжджі, що засвоюють лактозу та здатні до безлактозного бродіння. Переважаючим родом даних мікроорганізмів є *Lactobacillus*. Так як точно не можна дізнатись відсоткове співвідношення мікроорганізмів даного роду до інших в кефірних зернах, припустимо що кількість даних представників становить 49 % (дане значення було отримано при дослідженні мікробному складу різних кефірів в Бразилії [24]). Серед даного дослідження не наведено наявність нашого виду мікроорганізму (*Lactobacillus plantarum*), а також якщо розглянути літературні джерела можна зробити висновок, що використання даного виду є не особливо популярним, в Європейському регіоні даний вид зустрічається нечасто (можна спостерігати наявність даної культури в регіонах Азії), тому для визначення потреби на нашому ринку даного виду прийємо невеликий відсоток, а саме 3 %.

$$1,619 \text{ тис. т} \times 49 \% = 0,79331 \text{ тис. т (кількість } Lactobacillus)$$

$$793,31 \text{ т} \times 3 \% = 23,8 \text{ т (} Lactobacillus plantarum)$$

Слід врахувати що покрити весь молочний ринок неможливо через наявність конкуруючих умов та в нашому випадку даний продукт може бути специфічним для нашого регіону, тому для подальших розрахунків приймемо що потреба в даному продукті буде складати 1 % від загальної.

$$23,8 \text{ т} \times 1 \% = 238 \text{ кг}$$

Виробничий синтез відбувається культивуванням *Lactobacillus plantarum* AS-14, який спроможний накопичувати 16,02 г/л біомаси за 48 год. Отже, для синтезу необхідної кількості біомаси потрібна наступна кількість культуральної рідини.

$$238 \text{ кг} / 16,02 \text{ г/л} = 14,86 \text{ м}^3$$

Під час очищення та виділення відбувається втрата цільового продукту, тому слід врахувати її заздалегідь.

$$14,86 \text{ м}^3 / (1 - 0,3) = 21,23 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Дізнавшись річну потребу культуральної рідини для отримання біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 з подальшим використанням в якості заквасок, проведемо розрахунок необхідного об'єму КР за добу, для цього приймемо що кількість трудоднів становитиме 140 днів:

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{21,23 \text{ м}^3}{140} = 0,152 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Розрахувавши об'єм КР за добу визначимо кількість циклі необхідних для отримання даного об'єму:

$$V_{\text{пц}} = \frac{K_1 * V_d * T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,2 * 0,152 * 55}{24} = 0,418 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

де $T_{\text{цф}}$ –робочий цикл ферментера, який включає часу синтезу біомаси (48 год) та часу підготовки обладнання (7 год) та врахуємо можливі нестерильні операції ($K_1 = 1,2$).

0,418 м³ культуральної рідини ($V_{\text{пц}}$) можна отримати при вирощуванні продуцента в ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_r = 0,418 / 0,7 = 0,59 \text{ м}^3$$

Найближчий стандартний за об'ємом ферментер $V_r = 0,63 \text{ м}^3$.

Необхідно провести уточнення коефіцієнта заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{пц}}}{V_{\text{г}}} = \frac{418}{630} = 0,66,$$

що задовольняє необхідні нам умови, тому залишаємо його.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

В результаті одного циклу зливається 418 л культуральної рідини. Щоб отримати зазначену кількість рідини потрібно зважати на втрати які є результатом краплевиносу відпрацьованого повітря, тому необхідно збільшити зазначений об'єм культуральної рідини перед синтезом.

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1-E_{\text{ф}}} = \frac{418}{1-0,1} = 464,4 \text{ л}$$

Робочий об'єм ферментера є сумарним об'ємом посівного матеріалу та поживного середовища. Посівний матеріал складає 10 % від об'єму середовища в який він вносить, та його вирощування через менший об'єм відбувається в посівному апараті.

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 464,4 / (1 + 0,1) = 422,2 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 464,4 - 422,2 = 42,2 \text{ л}$$

Розрахунок необхідного об'єму поживного середовища та посівного матеріалу для отримання посівного матеріалу Lactobacillus plantarum AS-14 в посівному апараті

Вирощування посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum AS-14* відбувається в посівному апараті з наступним робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{пм}}) = 42,2 / (1 - 0,1) = 46,9 \text{ л}$$

де $E_{\text{пм}}$ становить 0,1 та є відсоток втрат при краплевиносі які відбуваються в результаті аерації середовища.

Щоб виростити 46,9 л посівного матеріалу потрібно передбачити наявність наступної кількості поживного середовища $V_{\text{пс2}}$:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{пм2}}) = 46,9 / (1 + 0,1) = 42,6 \text{ л}$$

Необхідний об'єм посівного матеріалу для засіву становитиме:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 46,9 - 42,6 = 4,3 \text{ л}$$

Щоб дізнатись апарат якого об'єму необхідно використовувати робочий об'єм з врахуванням коефіцієнта заповнення 0,7:

$$V_{\text{па1}} = V_{\text{роб2}} / K_{\text{зап}} = 46,9 / 0,7 = 67 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14 отримують при вирощуванні біологічного агента в посівному апараті об'ємом $V_{\text{па}} = 63 \text{ л}$.

Обравши об'єм посівного апарату визначимо наявний коефіцієнт заповнення при вирощуванні *L. plantarum* AS-14 в даному об'ємі:

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{па}} = 46,9 / 63 = 0,74, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок необхідного об'єму поживного середовища та посівного матеріалу для отримання посівного матеріалу Lactobacillus plantarum AS-14 в інокуляторі

Вирощування посівного матеріалу для засіву посівного апарата об'ємом 63 л відбувається в інокуляторі з наступним робочим об'ємом $V_{\text{роб3}}$

$$V_{\text{роб3}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{пм3}}) = 4,3 / (1 - 0,05) = 4,53 \text{ л,}$$

де $E_{\text{пм}}$ становить 0,05 та є відсоток втрат при краплевиносі які відбуваються в результаті аерації середовища.

Щоб виростити 4,53 л посівного матеріалу потрібно передбачити наявність наступної кількості поживного середовища $V_{\text{пс2}}$:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб3}} / (1 + X_{\text{пм3}}) = 4,53 / (1 + 0,1) = 4,12 \text{ л}$$

Необхідний об'єм посівного матеріалу для засіву становитиме:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 4,53 - 4,12 = 0,41 \text{ л}$$

Щоб дізнатись апарат якого об'єму необхідно використовувати робочий об'єм з врахуванням коефіцієнта заповнення 0,7:

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{роб3}} / K_{\text{зап}} = 4,53 / 0,6 = 6,4 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14 отримують при вирощуванні біологічного агента в інокуляторі об'ємом 6 л.

Обравши об'єм інокулятора визначимо наявний коефіцієнт заповнення при вирощуванні *L. plantarum* AS-14 в даному об'ємі:

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{ін}} = 4,53 / 6 = 0,75, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб

Кількість посівного матеріалу, вирощуваного в качалочних колбах становить $V_{\text{пм4}} = 0,41$ л. На даній стадії втрати при культивуванні не враховуємо через невеликий об'єм.

$$V_{\text{роб5}} = V_{\text{пм4}} = 0,41 \text{ л}$$

Щоб виростити 0,41 л посівного матеріалу потрібно передбачити наявність наступної кількості поживного середовища $V_{\text{пс5}}$:

$$V_{\text{пс5}} = V_{\text{роб5}} / (1 + X_{\text{пм5}}) = 0,41 / (1 + 0,1) = 0,37 \text{ л}$$

Необхідний об'єм посівного матеріалу для засіву становитиме:

$$V_{\text{пм5}} = V_{\text{роб5}} - V_{\text{пс5}} = 0,41 - 0,37 = 0,04 \text{ л}$$

Для отримання початкового посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14 доцільно використати колби місткістю 0,75 л, коефіцієнт заповнення в даних колбах становить $K_{\text{зап}} = 0,2$

Необхідна кількість колб враховуючи коефіцієнт заповнення становитиме:

$$N_{\text{к}} = V_{\text{роб5}} / V_{\text{кол}} \times K_{\text{зап}} = 0,41 / 0,75 \cdot 0,2 = 2,7 \text{ колби (прийmemo 3)}$$

Отримані результати розрахунків демонструють що процес одержання посівного матеріалу для синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 у ферментері об'ємом 0,63 м³ і з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у три етапи.

Таблиця 3.2

Узагальнені результати розрахованих стадій отримання посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14 та виробничого синтезу біомаси

***Lactobacillus plantarum* AS-14**

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	0,750 × 3 колб	0,2	0,41	0,37	0,04
2	6	0,75	4,53	4,12	0,41
3	63	0,74	46,9	42,6	4,3
4	630	0,66	464,4	422,2	42,2

РОЗДІЛ 4

БІОСИНТЕЗ БІОМАСИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AS-14

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Lactobacillus plantarum AS-14 синтезує біомаси використовуючи в якості ростового субстрату сирну сироватку та глюкозу [11]. В базі даних Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму для *Lactobacillus plantarum* AS-14, тому використовуватимемо схему, наведену для виду *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 [25].

Сирна сироватка залучається до процесу катаболізму в результаті дії бета-галактозидази [КФ: 3.2.1.23] на лактозу з утворенням галактози, яка в подальшому проходить послідовні перетворення: галактоза-1-фосфат, УДФ-галактоза, УДФ-глюкоза та глюкозо-6-фосфат, за допомогою альдозо-1-епімераз [КФ: 5.1.3.3], галактокінази [КФ: 2.7.1.6], UDPглюкозо-гексозо-1-фосфатуридилтрансферази [КФ: 2.7.7.12] та фосфоглюкомутази [КФ: 5.4.2.2]; відповідно.

Глюкоза залучається до реакції під дією глюкокіназа [КФ: 2.7.1.2] з утворенням глюкозо-6-фосфату. Глюкозо-6-фосфат ізомеризується у фруктозо-6-фосфат за дії глюкозо-6-фосфатізомераз [КФ: 5.3.1.9] з подальшим фосфорилуванням у присутності 6-фосфофруктокінази [КФ: 2.7.1.11] до фруктозо-1,6-дифосфату. Утворений продукт піддається розщепленню фруктозо-бісфосфатальдолазою класу II [КФ: 4.1.2.13] до гліцеральдегід-3-фосфату, котрий одночасно окиснюється та фосфорилується гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою [КФ: 1.2.1.12] до 1,3-дифосфогліцерату, від якого далі відщеплюється молекула АТФ (фермент – фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3]), внаслідок чого утворюється 3-фосфогліцерат. Після ізомеризації 3-фосфогліцерату в 2-фосфогліцерат (за присутності 2,3-бісфосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Колесник М.І.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.				25	61
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту		

[КФ: 5.4.2.11]) відбувається перехід останнього у фосфоенолпіруват за посередництвом енолази [КФ: 4.2.1.11], після чого від фосфоенолпірувату піруваткіназою [КФ: 2.7.1.40] відщеплюється АТФ, і в результаті утворюється піруват, котрий у подальшому надходить у цикл трикарбонових кислот.

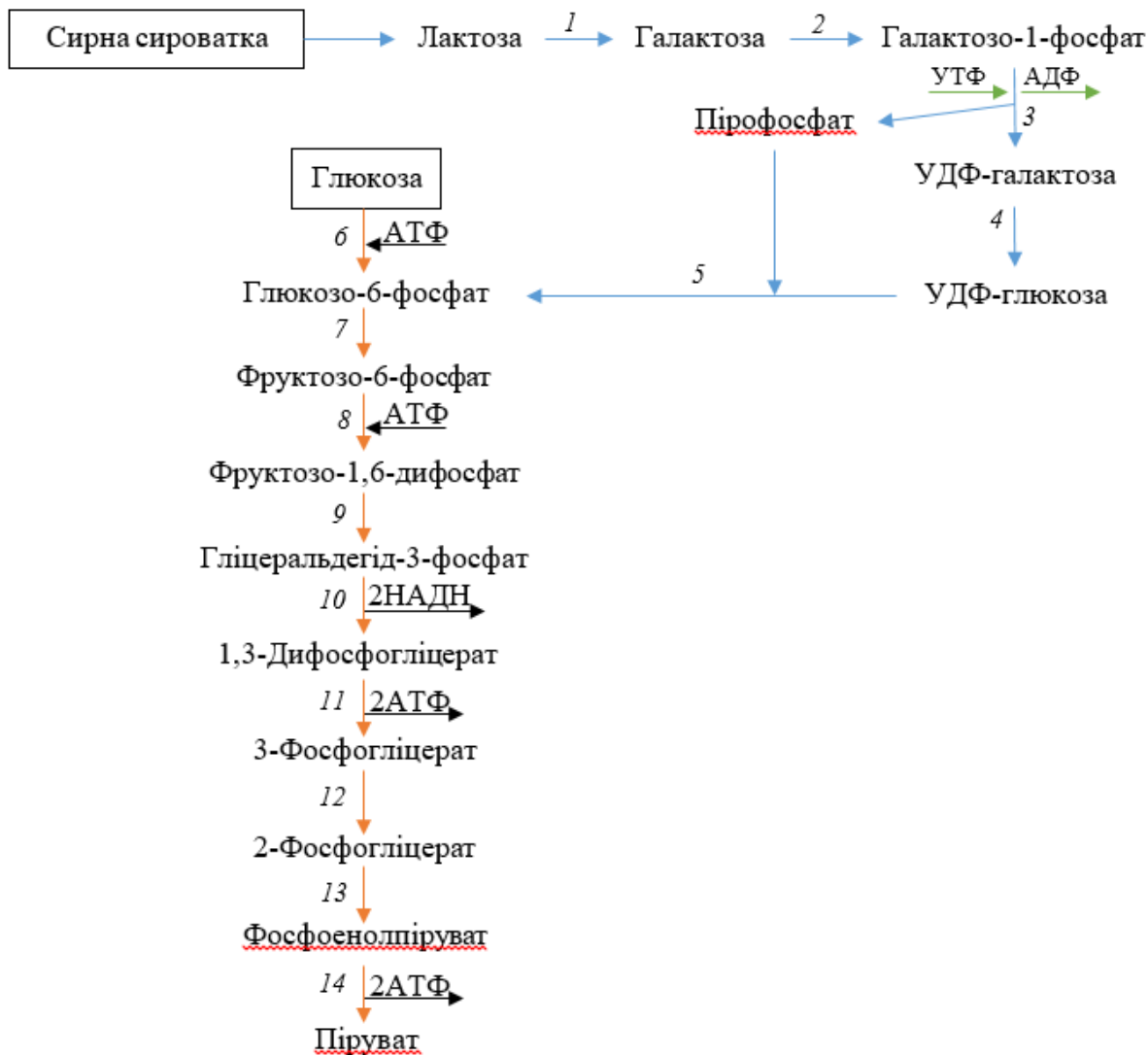


Рис 4.1. Катаболізм сахарози у *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1

Ферменти: 1 – бета-галактозидаза [КФ: 3.2.1.23]; 2 – альдозо-1-епімераза [КФ: 5.1.3.3]; 3 – галактокіназа [КФ: 2.7.1.6]; 4 – UDPглюкозо-гексозо-1-фосфатуридилтрансфераза [КФ: 2.7.7.12]; 5 – фосфоглюкомутаза [КФ: 5.4.2.2]; 6 – глюкокіназа [КФ: 2.7.1.2]; 7 – глюкозо-6-фосфатізомераза [КФ: 5.3.1.9]; 8 – 6-фосфотруктокіназа [КФ: 2.7.1.11]; 9 – фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II [КФ: 4.1.2.13]; 10 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; 11 – фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3]; 12

– 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза [КФ: 5.4.2.11]; 13 – енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 14 – піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40].

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Для синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14, даний біологічний агент повинен синтезувати основні компоненти бактеріальної клітини. Даний мікроорганізм є грам-позитивною бактерією тому для синтезу біомаси необхідні наступні компоненти: білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди та пептидоглікан.

Білки синтезуються в результаті перетворення продуктів катаболізму ростового субстрату в амінокислоти, для синтезу білків утворюється 20 основних амінокислот.

Нуклеїнові кислоти утворюються в результаті катаболізму глюкози-6-фосфату в пентозофосфатному циклі до рибозо-5-фосфату, який в подальшому перетворюється на АТФ, ГТФ та з включенням оксалоацетату в реакції ЦТФ.

Пептидоглікан синтезується в результаті перетворення глюкозо-6-фосфату в Глюкозамін-6-фосфат який в свою чергу перетворюється в Глюкозамін-1-фосфат який з участю ацетил-КоА проходить декілька перетворень та синтезує пептидоглікан.

Ліпіди синтезуються з жирних кислоти, які утворюються в результаті перетворення ацетил-КоА та фосфолопідів та гліколопідів.

Наявність всіх перерахованих компонентів дозволяє синтезувати біомасу бактеріальної клітини.

Графічне зображення схеми синтезу біомаси наведено в додатках.

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Щоб обрати умови та способів вирощування біологічного агента необхідно врахувати морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості біологічного агента. *Lactobacillus plantarum* AS-14 є мезофільним нейтрофілом, оптимальними умовами росту є температура 40 °С та рівень рН 6,2, враховуючи дану особливість необхідно передбачити культивування в асептичних умовах, з метою усунення можливої контамінації, так як дані умови є сприятливими для росту більшості мікроорганізмів.

З огляду на вище зазначену інформацію виробничий біосинтез має відбуватись глибинним способом, а також враховуючи що максимальна концентрація біомаси спостерігається в стаціонарній фазі росту, для способу культивування оптимально обрати періодичний спосіб культивування.

Lactobacillus plantarum AS-14 є аеротолерантним анаеробом, тобто оптимальною умовою для росту та розвитку є відсутність кисню, отже слід забезпечити анаеробні умови культивування.

З вище перерахованого можна дійти висновку, що процес виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 повинен відбуватись періодично, глибинним методом без доступу кисню в асептичних умовах.

Визначивши умови ферментації необхідно обрати ферментер, для виробу якого слід використовувати раніше визначені дані.

Визначивши що синтез біомаси відбувається в строго анаеробних умовах, важливим є створення безкисневих умов за допомогою безперервної подачі інертного газу (аргону або азоту) для відведення надлишку кисню.

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми		
Розроб.		Колесник М.І.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.				28	61
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Оптимальна температура культивування становить 40 °С, щоб забезпечувати сталу температуру в ферментері необхідно встановити сорочкою та датчиком температури для її контролю.

Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН.

Підсумовуючи, ферментер оснащується датчиками температури, рівня рН, сорочкою, мішалкою та пристроєм для подачі інертного газу.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки азоту

Lactobacillus plantarum AS-14 є аеротолерантним анаеробом, який для синтезу АТФ використовує процес бродіння, для даного типу мікроорганізмів наявність кисню є небажаною, вони не використовують кисень, але при наявності кисню вони можуть захистити себе від реактивних молекул кисню. Враховуючи дану фізіолого-біхімічну особливість *Lactobacillus plantarum* AS-14 необхідно передбачити створення анаеробних умов культивування. Для створення анаеробних умов доцільно використовувати інертний газ, а саме азот, так як його процес отримання є легким а його кількість в атмосферному повітрі складає 78 %.

Визначившись з методом створення анаеробних умов, слід визначити яким способом дані умови будуть забезпечуватись. Для забезпечення подачі азоту можна використовувати два способи, перший це купівля азоту в балонах та задування з балону в ферментер, а другий це використання генератора азоту, який за допомогою адсорбційних колон виділяє азот з навколишнього повітря, даний пристрій дозволить зменшити кількість закупаваних балонів, та дозволить контролювати чистоту азоту.

Отже процес отримання азоту для створення анаеробних умов буде виглядати наступним чином:

- Забір атмосферного повітря (вертикальна труба з повітрязабірником у найвищій точці будівлі, приблизно 12 м);
- Подальше очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) (за допомогою тканинних фільтрів грубого очищення);

- Стиснення в компресорі (в результаті повітря нагрівається до температури 120 – 200°C);
- Охолодження отриманого після компресора повітря (для конденсації вологи);
- Видалення конденсованої вологи у ресивері (також зменшує пульсаційні рухи повітря);
- Подача стисненого повітря до паралельно з'єднаних адсорбційних колон де відбувається видалення кисню та на виході отримується азот високої чистоти.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробничий процес синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14, відбувається впродовж 140 днів та відбувається в ферментері об'ємом 0,63 м³, з попереднім вирощуванням посівного матеріалу в посівному апараті 63 л та інокуляторі 6 л. Виробничий процес відбувається в наступних приміщеннях: цех виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14, цех отримання посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14, приміщення для вирощування *Lactobacillus plantarum* AS-14 в качалочних колбах та мікробіологічної лабораторії.

Схематичний план приміщення з врахуванням діаметрів обладнання та відстані від стани та між апаратами, для технологічного процесу синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 наведено на рис. 5.1.

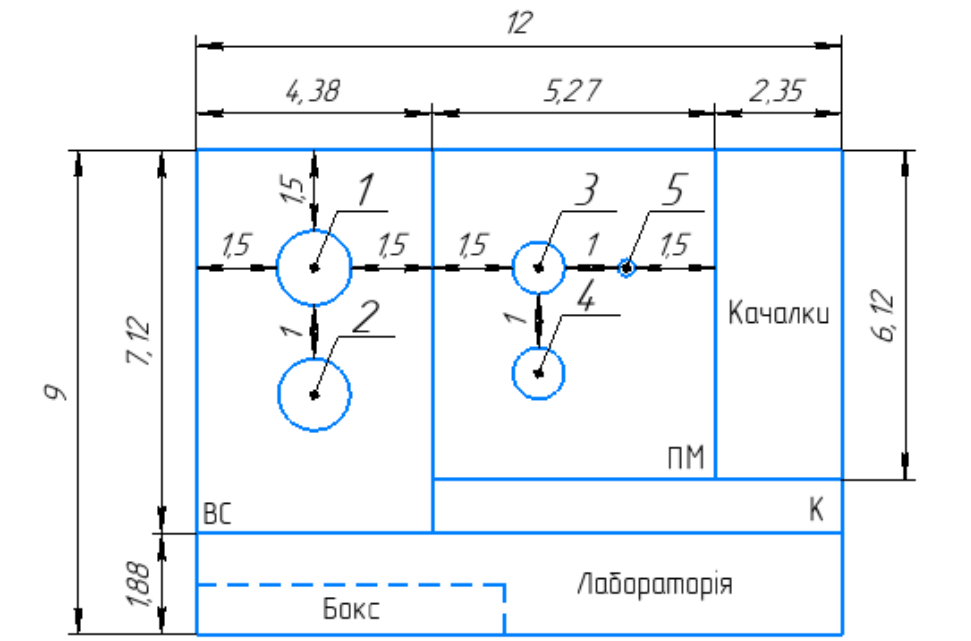


Рис. 5.1. Ескіз планування виробничих приміщень для виробництва біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14

BC – цех виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14, ПМ – цех отримання посівного матеріалу, К - коридор.

Габаритні розміри обладнання зображеного на рис. 5.1 представлено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Розміри основного обладнання для отримання біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14

Поз.	Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
1	Ферментер	630	1,38	2,8
2	Реактор-змішувач для приготування композиції А	630	1,325	1,84
3	Посівний апарат	63	0,965	2,6
4	Реактор-змішувач для приготування композиції А	63	0,95	1,4
5	Інокулятор-1	6	0,3	0,4
	Всього	1 393		

Згідно даних наведених в табл.2.1, об'єм всього обладнання необхідного для отримання біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 становить 1,393 м³. Також слід розрахувати площу на якій дане обладнання знаходиться, а саме

підлогу, стіни (висота стін виробничих приміщень 6 м). Площа підлоги цеху виробничого синтезу біомаси *L. plantarum* AS-14 становить $7,12 \text{ м} \times 4,38 \text{ м} = 31,1856 \text{ м}^2$, а площа стін становить $(7,12 \text{ м} \times 3 + 4,38 \text{ м} \times 3) \times 2 = 69 \text{ м}^2$. Площа підлоги цеху отримання посівного матеріалу становить $5,27 \times 6,12 = 32,2524 \text{ м}^2$, а площа стін $(5,27 \times 3 + 6,12 \times 3) \times 2 = 68,34 \text{ м}^2$. Мікробіологічна лабораторія $1,88 \times 12 = 22,56 \text{ м}^2$, а стін – $(1,88 \times 3 + 12 \times 3) \times 2 = 83,28 \text{ м}^2$. Площа підлоги приміщення з качалками дорівнює $2,35 \times 6,12 = 14,382 \text{ м}^2$, а стін – $(2,35 \times 3 + 6,12 \times 3) \times 2 = 50,82 \text{ м}^2$, визначені дані площ продемонстровано в узагальненому форматі в табл. 5.2

Таблиця 5.2

Розрахунок площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу	31,1856	69	100,1856
Цех отримання посівного матеріалу	32,2524	68,34	100,5924
Мікробіологічна лабораторія	22,56	83,12	105,68
Приміщення з качалками	14,382	50,82	65,202
Загальна площа	100,38	270,28	

Кількість виробничих циклів отримання культуральної рідини для отримання біомаси становить 51, так як миття виробничого обладнання відбувається перед початком виробничого циклу та в кінці технологічного процесу, кількість миття обладнання за весь технологічний процес становитиме 52 рази. Під час проведення технологічного процесу кожен день проводять миття підлоги (140 разів), щоб забезпечувати чистоту приміщення. Також раз на місяць проводять генеральне прибирання технологічних приміщень, за весь технологічний процес проведуть 5 генеральних прибирань. Загальна площа обробки враховуючи кількість виробничих циклів наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	1,393	52	72,44
Підлога	100,38	140	14 053,2
Стіни, двері вікна	270,28	5	1 351,4

Загальне порівняння дезінфекційних засобів наведено в табл. 5.4

Миття обладнання буде відбуватись каустичною содою, змінювати миючий засіб кожні 2 місяці не має сенсу через стерилізацію реакторів парою, що призведе до загибелі небажаної мікрофлори.

Для дезінфекції приміщень будемо використовувати два засоби, для зменшення ймовірності утворення резистентних штамів, а саме: «Вернедор» та «Ексан Про Дез».

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів під час виробництва біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода (NaOH) [26]	Обладнання	1%	72,44	21 732	57	0,6	13 039
«Фамідез Форте» (формальдегід, глютардіальдегід) [27]	Стіни, підлога, вікна, двері	1 %	15 404,6	1 540,46	419	4,19	6 455
«Вернедор» (перекис водню, ЧАС) [28]	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1%	15 404,6	1 540,46	473	0,473	729
«Ексан Про Дез» (ПАР, етанол, ялицева олія) [29]	Стіни, підлога, вікна, двері	1,5%	15 404,6	1 540,46	93,5	1,403	2 162

Примітка: ПАР – поверхнево-активні речовини, ЧАС - четвертинні амонійні сполуки.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для отримання інокуляту використовують більш просте поживне середовище в порівнянні з виробничим синтезом, склад поживного середовища для отримання інокуляту та виробничого синтезу наведено в табл. 5.5.

Таблиця 5.5

Склад поживних середовищ для отримання інокуляту та виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14

Поживне середовище для отримання інокуляту	Поживне середовище для виробничого синтезу
Пептон - 10	Сирна сироватка – 60
Дріжджовий екстракт – 5	Кукурудзяний екстракт – 15
Екстракт яловичини – 10	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 5
Глюкоза – 20	Глюкоза – 15
Ацетат натрію – 5	Ацетат натрію – 5
C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇ – 2	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O – 2
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O – 2	C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇ – 2
MnSO ₄ ×4H ₂ O – 0,05	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,3
MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,1	MnSO ₄ ×4H ₂ O – 0,04

5.1.4.1. Вирощування інокуляту *Lactobacillus plantarum* AS-14 в колбах на качалці

Для отримання початкового інокуляту необхідно приготувати 370 мл поживного середовища, враховуючи даний об'єм, доцільно готувати композиції в колбах, а проводити стерилізацію в автоклаві. Поділ компонентів поживного середовища на композиції буде відбуватись з врахуванням властивостей даних компонентів до температури.

Композиція А: Пептон, дріжджовий екстракт, екстракт яловичини та глюкоза (112 °С, 20 хв, 0,05 МПа);

Композиція Б: Ацетат натрію, триамоній цитрат, сульфат магнію семиводний, сульфат мангану чотириводний (131 °С, 40 хв, 0,15 МПа);

Композиція В: Гідроортофосфат натрію (131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Пептон, дріжджовий екстракт, екстракт яловичини та глюкоза є термолабільними речовинами тому приготування та стерилізація даних

компонентів буде відбуватись в одній композиції. Стерилізації даної композиції буде відбуватись 20 хв при температурі 112 °С.

Основні солі та фосфатні солі доцільно простерилізувати окремо, щоб не утворився осад, тому гідроортофосфат натрію готують та стерилізують окремо від інших солей. Стерилізації даних двох композицій буде відбуватись 40 хв при температурі 131 °С.

5.1.4.2. Вирощування інокуляту в інокуляторі та посівному апараті

Для вирощування інокуляту в інокуляторі та посівному апараті необхідно приготувати 4,12 л та 42,6 л поживного середовища, відповідно. Враховуючи об'єми, стерилізації поживного середовища для інокулятора доцільно проводити в автоклаві, а для посівного апарату в реакторах.

Поділ компонентів на композиції та умови приготування і стерилізації для інокулятора будуть такі самі як і для попередньої стадії. В той час як для посівного апарату доцільно об'єднати дві композиції солей в одну, для зменшення економічних витрат. Перед стерилізацією об'єднаної композиції солей, слід знизити рівень рН до 3,8, щоб не утворився осад. Після стерилізації рівень рН необхідно буде збільшити до рівня оптимуму біологічного агента.

5.1.4.3. Виробничий біосинтез

На стадію виробничого синтезу необхідно приготувати 422,2 л поживного середовища, враховуючи об'єм стерилізація буде відбуватись в реакторах, поділ компонентів на композиції буде відбуватись з врахуванням властивостей компонентів по відношенню до температури.

Композиція А: Сирна сироватка, кукурудзяний екстракт та глюкоза (112 °С, 20 хв, 0,05 МПа);

Композиція Б: Ацетат натрію, триамоній цитрат, сульфат магнію семиводний, сульфат мангану чотириводний, гідроортофосфат натрію та сульфат амонію (131 °С, 40 хв, 0,15 МПа);

Глюкоза, дріжджовий екстракт та сирна сироватка є термолабільними речовинами, тому приготування і стерилізація даних речовин буде відбуватись разом. Стерилізація буде відбуватись в реакторі 20 хв при температурі 112 °С.

Основні солі та фосфатні солі об'єднують в одну композицію, щоб не утворився осад, перед стерилізацією розчин підкислюють для зниження рівня рН до 3,8. Стерилізація композиції буде відбуватись гострою парою 40 хв при температурі 131 °С.

РОЗДІЛ 6

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Таблиця 6.1

Специфікація виробничого обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою, яка забезпечує видалення забруднюючих частинок
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Сітчастий фільтр, представлений корпус із високолегованої сталі, фільтроматеріал – гофровані ткани сітки з високолегованих сталей. Клас очищення: G2/G3 (E = 90 %), продуктивність – 1100, розмір: 495*247*48 (мм) м ³ /год, стартовий опір 50 Па. [30]
К-3	Компресор	1	Компресор Tidy 4 гвинтовий. Максимальний тиск – 7,5 бар, продуктивність 410 л/хв, потужність – 3 кВт [31]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник ОРЕКС-3-ST кожухотрубний з нержавіючої сталі. Діапазон робочих температур – 60 - 400 °С, робочий тиск – 6 - 40 бар, [32]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер місткістю 200 л з нержавіючої сталі [33]
ГА-6	Генератор азоту	1	Адсорбційний генератор азоту PSA – модель MAS-GN2 [34]
ІФ-7 ІФ-15 ІФ-24	Індивідуальний фільтр	3	Фільтр НЕРА, корпус із пластику, алюмінію, фільтроматеріал представлений мікроскловолоконном, оцинкованою або нержавіючою сталлю. Стартовий опір – 250 Па, кінцевий опір – 650 Па. Клас очищення: E10-12/H13/H14/U15-17 (E = 99,995 %). Розміри: 610*610*78 (мм). Продуктивність – 1000 м ³ /год [35]

НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Колесник М.І.		
Перевір.		Белемець Т.О.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		

РОЗДІЛ 6. Специфікація
обладнання
доферментаційних процесів та
виробничого біосинтезу

Літ.	Арк.	Аркушів
	38	61
Кафедра БТМ		

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
Ін-8	Інокулятор	1	Пілотний ферментер з нержавіючої сталі геометричним об'ємом 6 л, виконаний на замовлення у компанії Solaris (Серія S). Оснащений сорочкою, барботером і мішалкою (частота обертання 200 об/хв), ротаметром (для вимірювання витрати аераційного повітря), датчиками рН, температури, рівня [36]
Н-9	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос РТL09 низького тиску. Тиск на виході – до 4 бар, продуктивність – 80 л/год, частота обертання – 80 об/хв, [37]
Д-10 Д-12 Д-14 Д-19 Д-21 Д-23	Об'ємно-ваговий дозатор	6	Лічильник-дозатор продуктивністю 10-400 л/хв, для води. Максимальна потужність – 180 Вт, номінальний струм – 6 А, робоча напруга – 6-30 В [38].
Р-11 Р-13	Реактор-змішувач	2	Реактор сталевий об'ємом 10 л, з сорочкою та мішалкою. Довжина – 0,52 м, висота – 0,37 м, ширина – 0,45 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв [39]
ПА-16	Посівний апарат	1	Пілотний ферментер з нержавіючої сталі геометричним об'ємом 60 л, виконаний на замовлення у компанії Solaris (Серія S). Оснащений сорочкою, барботером і мішалкою (частота обертання 200 об/хв), ротаметром (для вимірювання витрати аераційного повітря), датчиками рН, температури, рівня [36]
Н-17	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос низького тиску РТL13. Тиск на виході – до 4 бар, частота обертання – 80 об/хв, продуктивність 196 л/год [37]
Дз-18	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор сипких матеріалів, об'єм бункеру 0,6 м ³ , налаштовуваний діапазон дозування 0,2-50 кг. Дискретність – 0,005 г, гарантована точність зважування – 1 кг [40]

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
P-20	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 160 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Довжина – 1,0 м, висота – 1,6 м, ширина – 0,9 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв [39]
P-22	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий об'ємом 40 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Довжина – 0,7 м, висота – 0,53 м, ширина – 0,6 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв [39]
H-26	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос PTL17 низького тиску. Тиск на виході – до 4 бар, частота обертання – 140 об/хв, продуктивність – 908 л/год [37]

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологія синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 складається з допоміжних робіт, а саме: підготовка азоту, приготування титрувальних розчинів для регулювання рівня рН і приготування та стерилізація поживного середовища, а також технологічного процесу - отримання посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14 та виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14.

Зображення технологічної та апаратурної схем виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 наведено в графічній частині.

ДР 1. Підготовка азоту

ДР 1.1. Забір повітря

Через повітрезабірник (ПЗ-1) який знаходиться на висоті 12 м на вертикальній трубі відбувається забір повітря.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря направляють в фільтр грубого очищення (Ф-2), щоб видалити крупні частинки бруду та пилу (розмір часток до 1 мкм). Ступінь очищення – 90 %.

ДР 1.3. Подача повітря на компресор

Повітря після грубого очищення подається в компресор (К-3), де воно стискається до тиску 0,4 МПа та нагрівається до 250°C.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення вологи

На виході з компресора вологість повітрі зростає, тому повітря охолоджують до 18 °С у теплообміннику (Т-4) та в подальшому направляють в ресивер (Рс-5), щоб видалити зайву вологу до вмісту $W=60\%$.

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Колесник Я.І.	ДР 1.4. Видалення кисню		Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.				41	61
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу		

Після видалення зайвої вологи повітря подають в генератор азоту (ГА-6), який складається з декількох послідовних адсорбційних колон які заповненні молекулярною мембраною під час проходження яких відбувається адсорбція кисню та на виході залишається азот E=99,5%.

ДР 1.6. Очищення азоту на індивідуальних фільтрах

Перед подачею азоту в апарати де відбувається вирощування культури азот подають в індивідуальні фільтри (ІФ-7, ІФ-15, ІФ-24) на виході з яких відбувається досягнення ступеня очищення E=99,995%.

ДР 2. Приготування титрувальних агентів для регулювання рівня рН поживного середовища

ДР 2.1. Приготування розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища

Підкислення поживного середовища відбувається 0,93 л 6 % хлоридною кислотою, для цього в колбу об'ємом 2 л вносять 775 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра та при постійному перемішуванні вносять 155 мл 36%-ї хлоридної кислоти відміряної попередньо мірним стаканом.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація розчину 6-% натрію гідроксиду для підлуження поживного середовища

Підлуження поживного середовища відбувається 0,93 л розчину 6%-го натрію гідроксиду. Для приготування даного об'єму на технічних вагах формують наважку кристалічного натрію гідроксиду, масою 55,8 г. Отриману наважку поміщають в колбу об'ємом 2 л та вносять 0,93 л води питної, вміст колби перемішують та закривають ватно-марлевым корком з подальшим розміщенням в автоклаві де відбувається стерилізація впродовж 40 хв, при 131°C.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в колбах на качалці

На дану стадію потрібно приготувати 370 мл поживного середовища поділ компонентів поживного середовища на композиції та їх кількість наведено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в 3 колбах на качалці

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 370 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Пептон	10	3,7	Композиція А	0,11
Дріжджовий екстракт	5	1,85		
Екстракт яловичини	10	3,7		
Глюкоза	20	7,4		
Вода		110 (мл)		
Ацетат натрію	5	1,85	Композиція Б	0,2
$C_6H_{17}N_3O_7$	2	0,74		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,1	0,04		
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05	0,02		
Вода		200 (мл)		
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	2	0,74	Композиція В	0,06
Вода		60 (мл)		
Разом:				0,37 л

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах формують наважки пептону масою 3,7 г, дріжджового екстракту – 1,85 г, екстракту яловичини – 3,7 г та глюкози – 7,4 г. Сформовані наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл та вносять 100 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби перемішують, для рівномірного розподілу компонентів. Провівши перемішування колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві де відбувається стерилізація при 112 °С впродовж 20 хвилин.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою технічних вагів формують наважки ацетату натрію масою 1,85 г, триамонію цитрату – 0,74 г, сульфату магнію семиводного - 0,04 г, та сульфату мангану чотириводного – 0,02 г. Сформовані наважки поміщають в

колбу об'ємом 1 л і наливають 200 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Вміст колби перемішують до повного розчинення солей та в подальшому закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві де відбувається стерилізація при 131 °С впродовж 40 хвилин.

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

За допомогою технічних вагів формують наважку гідроортофосфату натрію – 0,74 г, сформовану наважку поміщають в колбу об'ємом 200 мл та вносять 60 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Вміст колби перемішують до повного розчинення солі та в подальшому закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві де відбувається стерилізація при 131 °С впродовж 40 хвилин.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту *Lactobacillus plantarum* AS-14 в інокуляторі об'ємом 6 л

На дану стадію потрібно приготувати 4,12 л поживного середовища поділ компонентів поживного середовища на композиції та їх кількість наведено в табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 4,12 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Пептон	10	41,2	Композиція А	1,12
Дріжджовий екстракт	5	20,6		
Екстракт яловичини	10	41,2		
Глюкоза	20	82,4		
Вода		1,12 (л)		
Ацетат натрію	5	20,6	Композиція Б	2,5
$C_6H_{17}N_3O_7$	2	8,24		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,1	0,41		
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05	0,21		
Вода		2,5 (л)		

Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	2	8,24	Композиція В	0,5
Вода		0,5 (л)		
Разом:				4,12 л

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою технічних вагів формують наважки пептону масою 41,2 г, дріжджового екстракту – 20,6 г, екстракту яловичини – 41,2 г та глюкози – 82,4 г. Сформовані наважки поміщають в колбу об'ємом 2 л та вносять 1,12 л води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Після внесення компонентів вміст колби перемішують, для рівномірного розподілу компонентів. Провівши перемішування колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві де відбувається стерилізація при 112 °С впродовж 20 хвилин.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою технічних вагів формують наважки ацетату натрію масою 20,6 г, триамонію цитрату – 8,24 г, сульфату магнію семиводного - 0,41 г, та сульфату мангану чотириводного – 0,21 г. Сформовані наважки поміщають в колбу об'ємом 5 л та вносять 2,5 л води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Вміст колби перемішують до повного розчинення солей та в подальшому закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві де відбувається стерилізація при 131 °С впродовж 40 хвилин.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

За допомогою технічних вагів формують наважку гідроортофосфату натрію – 8,24 г, сформовану наважку поміщають в колбу об'ємом 1 л і наливають 500 мл води питної, відміряної за допомогою мірного циліндра. Вміст колби перемішують до повного розчинення солі та в подальшому закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві де відбувається стерилізація при 131 °С впродовж 40 хвилин.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту *Lactobacillus plantarum* AS-14 в посівному апараті об'ємом 63 л

На дану стадію потрібно приготувати 42,6 л поживного середовища, враховуючи що стерилізація буде відбуватись гострою парою слід врахувати конденсат (10 %) який утвориться та зменшити об'єм води який буде вноситись. Поділ та склад компонентів наведено в табл. 7.3.

Таблиця 7.3

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 63 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 42,6 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Пептон	10	426	Композиція А	6,0
Дріжджовий екстракт	5	213		
Екстракт яловичини	10	426		
Глюкоза	20	852		
Вода		6 (л)		
Конденсат		0,6 (л)		0,6
Ацетат натрію	5	213	Композиція Б	32,7
$C_6H_{17}N_3O_7$	2	85,2		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,1	4,3		
$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05	2,1		
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	2	85,2		
Вода		32,7 (л)		
Конденсат		3,3 (л)		3,3
Разом:				42,6 л

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою технічних вагів формують наважки пептону масою 426 г, дріжджового екстракту – 213 г, екстракту яловичини – 426 г та глюкози – 852 г. Сформовані наважки поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-11) та через лічильник (Д-10) подають 6 л води питної. Внісши компоненти вмикають перемішувач (50 об/хв), для їх рівномірного розподілу. Провівши перемішування в реакторі проводять стерилізацію гострою парою при 112 °С впродовж 20 хвилин.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою технічних вагів формують наважки ацетату натрію масою 213 г, триамонію цитрату – 85,2 г, сульфату магнію семиводного - 4,3 г,

сульфату мангану чотириводного – 2,1 г та гідроортофосфату натрію – 85,2 г. Сформовані наважки поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-13) та через лічильник (Д-12) подають 7,7 л води питної. Помістивши компоненти в реактор, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для розчинення компонентів, в подальшому розчинивши компоненти вміст реактора подають в посівний апарат об'ємом 63 л (ПА-16), через лічильник (Д-14) додають 25 л води питної, вносять 6% розчин хлоридної кислоти (від ДР 2.1) та вмикають перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів. Знизивши рівень рН до 3,8 та розчинивши компоненти проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С впродовж 40 хвилин.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого синтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 в ферментері об'ємом 0,63 м³

На дану стадію потрібно приготувати 422,2 л поживного середовища, враховуючи що стерилізація буде відбуватись гострою парою слід врахувати конденсат (10 %) який утвориться та зменшити об'єм води який буде вноситись. Поділ та склад компонентів наведено в табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Склад композицій при стерилізації компонентів для виробничого синтезу біомаси в ферментері об'ємом 0,63 м³

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 422,2 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	60	25 332	Композиція А	100
Кукурудзяний екстракт	15	6 333		
Глюкоза	15	6 333		
Вода		100 (л)		
Конденсат		10 (л)		10
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	2 111	Композиція Б	284,2
Ацетат натрію	5	2 111		
C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇	2	844,4		
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	2	844,4		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,3	126,7		
MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,04	16,9		

Вода		284,2 (л)		
Конденсат		28 (л)		28
Разом:				422,2 л

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

В реактор об'ємом 160 л (Р-20) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Дз-18) вносять 25,332 кг сирної сироватки, 6,333 кг кукурудзяного екстракту, 6,333 кг глюкози та через лічильник (Д-19) подають 100 л води питної. Після внесення компонентів вмикають перемішуючий пристрій та проводять перемішування розчину для рівномірного розподілу компонентів. Провівши перемішування в реактор подають гостру пару для стерилізації розчину, процес відбувається при 112 °С впродовж 20 хвилин.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

За допомогою технічних вагів формують наважки ацетату натрію масою 2 111 г, сульфату амонію – 2 111 г, триамонію цитрату – 844,4 г, гідроортофосфату натрію – 844,4 г, сульфату магнію семиводного – 126,7 г, сульфату мангану чотириводного – 16,9 г та. Сформовані наважки поміщають в реактор об'ємом 40 л (Р-22) та через лічильник (Д-21) подають 34,2 л води питної, після внесення компонентів вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) до повного розчинення компонентів. Розчинивши солі, розчин подають в ферментер об'ємом 0,63 м³ та через лічильник (Д-23) подають 250 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та вносять 6% розчин хлоридної кислоти (*від ДР 2.1*). Знизивши рівень рН до 3,8 та розчинивши компоненти проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С впродовж 40 хв.

ТП 4. Отримання посівного матеріалу *Lactobacillus plantarum* AS-14

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Зберігають колекційну культуру *Lactobacillus plantarum* AS-14 на скошеному середовищі MRS при температурі 4 °С. Через кожні 4 місяці в асептичних умовах культуру пересівають.

ТП 4.2. Отримання робочої культури

Для отримання ізольованих колоній в асептичних умовах, бактеріологічною петлею культуру *Lactobacillus plantarum* AS-14 розсівають

методом виснажувального штриха на чашки Петрі з агаризованим середовищем (MRS). Чашки Петрі ставлять в термостат, інкубують протягом 18 год при 37 °С.

ТП 4.3. Отримання посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії (від ТП 4.2), в строго асептичних умовах, пересівають бактеріологічною петлею у пробірки з MRS. Для пересіву відбирають колонії відстань між якими не менше 1 см. Інкубують в термостаті при 37 °С протягом 18 год.

ТП 4.4. Отримання інокуляту в колбах на качалці

В асептичних умовах до колби з стерильною композицією Б вносять 200 мл стерильної композиції А (від ДР 3.1.1) та стерильну композицію В (від ДР 3.1.3), вміст колби перемішують для рівномірного розподілу компонентів та розливають по 123 мл в три качалочні колби місткістю 750 мл. В асептичних умовах для суспендування клітин в пробірку з культурою *Lactobacillus plantarum* AS-14 додають 5 мл фізіологічного розчину. Отриману суспензію піпеткою переносять в колбу з отриманим стерильним поживним середовищем, в одну колбу вносять суспензію отриману з однієї пробірки.

Посівний матеріал культивують в колбах на качалці протягом 18 год при 37 °С. По завершенню вирощування відбирають пробу для мікробіологічного контролю та встановлення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}} = 8 \text{ г/л}$). Отриманий посівний матеріал з трьох колб в асептичних умовах поміщають в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 4.5. Отримання інокуляту в інокуляторі об'ємом 6 л

В строго асептичних умовах в інокулятор об'ємом 6 л (Ін-8) вносять стерильну композицію А (від ДР 3.2.1), Б (від ДР 3.2.2) та В (від ДР 3.2.3), розмістивши компоненти поживного середовища вмикають мішалку для рівномірного розподілу компонентів. Перемішавши композиції вносять посівний матеріал (від ТП 4.4).

Посівний матеріал культивують в інокуляторі протягом 18 год при 37 °С, та подають очищений азот (від ДР 1.6) для забезпечення анаеробних умов культивування. Впродовж культивування кожні 3 год, а також по завершенню вирощування відбирають пробу для мікробіологічного контролю та встановлення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}} = 8 \text{ г/л}$).

ТП 4.6. Отримання інокуляту в посівному апараті об'ємом 63 л

До посівного апарату об'ємом 63 л (ПА-16) з стерильною композицією Б вносять стерильну композицію А (від ДР 3.3.1) і 6% розчин натрію гідроксиду (від ДР 2.2) та вмикають перемішувач для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал за допомогою перистальтичного насосу (Н-9) (від ТП 4.5).

Посівний матеріал культивують в посівному апараті протягом 18 год при 37 °С, та подають очищений азот (від ДР 1.6) для забезпечення анаеробних умов культивування. Впродовж культивування кожні 3 год, а також по завершенню вирощування відбирають пробу для мікробіологічного контролю та встановлення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}} = 8 \text{ г/л}$).

ТП 5. Виробничий синтез біомаси Lactobacillus plantarum AS-14

ТП 5.1. Виробничий синтез біомаси Lactobacillus plantarum AS-14 в ферментері об'ємом 0,63 м³

В ферментер об'ємом 0,63 м³ (Фр-25) з стерильною композицією Б самоплином вносять стерильну композицію А (від ДР 3.4.1) та 6 % розчин натрію гідроксиду (від ДР 2.2). Після внесення компонентів вмикають перемішувач та після перемішування за допомогою перистальтичного насосу (Н-17) подають посівний матеріал (від ТП 4.6).

Виробничий синтез відбувається в анаеробних умовах тому після внесення поживного середовища та посівного матеріалу, в ферментер подають очищений азот (від ДР 1.6).

Вирощування *Lactobacillus plantarum* AS-14 відбувається до досягнення кінцевої концентрації біомаси (16,02 г/л), впродовж 24 год при температурі 40 °С.

Впродовж виробничого синтезу кожні 6 год, а також по завершенню вирощування, проводять відбори проб культуральної рідини для встановлення концентрації джерел вуглецю, азоту та біомаси для проведення мікробіологічного контролю.

РОЗДІЛ 8

МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЙОГО БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ

8.1. Мікробіологічний контроль

8.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Чистоту культури *Lactobacillus plantarum* AS-14 перевіряють шляхом висівання культуральної рідини на чашки Петрі та мікроскопіювання. Пробу культуральної рідини розсівають виснажувальним штрихом на чашки Петрі. Для виявлення бактерій використовують м'ясо-пептонний агар (МПА), для дріжджів і грибів – сусло-агар (СА). Засіяні чашки інкубують у термостаті впродовж 36 год за температури 35-39 °С (МПА) або впродовж 7 діб за температури 28-32 °С (СА) [41]. Після закінчення витримування чашок візуально оглядають поверхню поживних середовищ, відзначаючи відсутність ознак росту сторонніх мікроорганізмів.

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препарату «роздавлена крапля» і збільшенням $\times 90$. При перегляді препарату зважають на те, що *Lactobacillus plantarum* AS-14 – коротка паличкоподібна (з заокругленими кінцями) неспороутворююча бактерія розмірами близько 0,9-1,2 мкм завширшки та 1,0-8,0 мкм завдовжки, може рости поодинокі або короткими ланцюжками (рис. 8.1) [6]. Також відзначають відсутність клітин сторонніх мікроорганізмів.

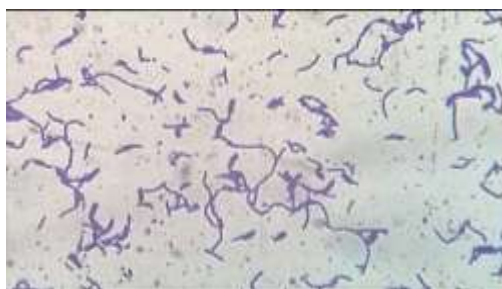


Рис. 8.1. Мікрофотографія *Lactobacillus plantarum* AS-14 (збільшення $\times 90$)

[6]

					НУХТ БТЕК 04.02.45 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Колесник М.І.			РОЗДІЛ 8. Методи ідентифікації цільового продукту та визначення показників його біологічної дії	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.					52	61
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

8.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Для перевірки стерильності поживного середовища спершу відбирають пробу простерилізованого поживного середовища об'ємом 20 мл, потім висівають 0,1 мл з цього об'єму на агаризовані середовища в чашках Петрі. Для виявлення росту бактерій та грибів і дріжджів використовують м'ясо-пептонний агар і сусло-агар відповідно. Засіяні чашки інкубують у термостаті впродовж 36 год за температури 35-39 °С (МПА) або впродовж 7 діб за температури 28-32 °С (СА). Після закінчення витримування чашок візуально оглядають поверхню поживних середовищ, відзначаючи відсутність ознак росту мікроорганізмів [41].

8.2. Визначення показників бактеріального росту

8.2.1. Визначення кількості життєздатних клітин

Для визначення кількості життєздатних клітин пропонується використовувати датчик Aber Futura – просту та компактну систему для онлайн-вимірювання концентрації життєздатних клітин, які розроблені з врахуванням всіх професійних потреб біотехнолога (рис. 8.2):



Рис. 8.2. Датчик для визначення життєздатності клітин Aber Futura

Датчик кріпиться на ферментер та в онлайн режимі вимірює концентрацію живих клітин. Суть роботи: кожна життєздатна клітина, тобто, з цілісною плазматичною мембраною, створює заряд. Діалектрична природа плазматичної мембрани дозволяє накопичувати даний заряд. Датчик вимірює даний заряд і таким чином визначає кількість життєздатних клітин, результат

надзвичайно точний, оскільки заряд залежить від типу клітини і прямо пропорційний об'єму клітин, які містять непошкоджену мембрану.

8.2.2. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси *Lactobacillus plantarum* AS-14 визначають ваговим методом після висушування. Спершу готують алюмінієвий бюкс, висушуючи його до постійної маси, зважуючи його і поміщаючи в ексікатор з безводним кальцію сульфатом. Пробу культуральної рідини центрифугують 5 хв при 5000 об/хв, супернатант зливають, а вологий осад поміщають у бюкс і зважують. Бюкс висушують у вакуумній печі за температури 100 °С до постійної маси, після чого знову зважують. Обчислюють різницю мас до і після висушування та переводять у г/л за формулою:

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

де М – суха біомаса, г/л;

А - маса бюкса з осадом до висушування, г;

В – маса бюкса з осадом після висушування, г;

V – об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування, мл [42].

8.3. Визначення концентрації джерел вуглецю та азоту

8.3.1. Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелами вуглецю є сирна сироватка та глюкоза. Відомо, що в 100 г сирної сироватки міститься 3,5 г вуглеводів [43]. З урахуванням цього факту загальна маса вуглеводів в сироватці масою 60 г становитиме 2,1 г. Оскільки концентрація глюкози в поживному середовищі є вищою (15 г/л), визначатимемо саме її концентрацію, за методом Бертрана в супернатанті, отриманому після відділення біомаси.

В центрифужні пробірки відбирають 100 мл культуральної рідини та центрифугують при 5 000 об/хв протягом 5 хв.

Принцип методу заснований на здатності карбонільних груп цукрів відновлювати в лужному середовищі оксид міді (II) до оксиду міді (I), який випаде в осад. При розчиненні цього осаду сульфатом заліза (III) амонію оксид

міді (I) окиснюється до оксиду міді (II), відновлюючи залізо (III) до заліза (II), кількість якого визначають титруванням розчином перманганату калію.

Методика проведення аналізу:

1. Відбирають три однакові об'єми (по 20 мл): розчину Фелінга I, розчину Фелінга II та супернатанту.

2. Суміш зливають в колбу місткістю 100 мл та кип'ятять рівно 3 хвилини з моменту утворення бульбашок на поверхні, стежачи за тим, щоб кипіння не проходило надто активно. Потім колбу знімають з пальника та дають осаді осісти. Рідина над осадом повинна бути яскраво синього забарвлення; якщо рідина знебарвилась, це говорить про велику концентрацію цукрів. Дослід в такому випадку слід повторити з більшим розведенням досліджуваної рідини.

3. Осад відфільтровують скляним або азбестовим фільтром, при цьому уникаючи переносу осаду на фільтр. Після закінчення процесу фільтр та сам осад промивають гарячою дистильованою водою до зникнення лужної реакції промивних вод. Сам осад (оксид міді(I)) має бути постійно вкритий водою і не контактувати з киснем. Закінчивши промивання, фільтр вставляють в чисту колбу для відсмоктування або залишають в тій же колбі, попередньо звільнивши і ретельно сполоснувши її від фільтрату і промивних вод.

4. Відмірюють 20 мл розчину сульфату амонію заліза (III), вносять у конічну колбу з залишком оксиду міді і по розчиненні переносять на фільтр. Дають кілька хвилин постояти для розчинення осаду, а потім повільно фільтрують. Колбу і фільтр кілька разів промивають водою до зникнення кислої реакції, даючи кожен раз рідини стекти з фільтра. Отриманий зеленуватий розчин в колбі для відсмоктування титрують розчином перманганату калію до появи слабо-рожевого забарвлення, що зберігається протягом 1 хв.

5. Витрачений на титрування об'єм перманганату калію множать на його титр по міді і по таблиці знаходять кількість глюкози [41, 43, 44].

8.3.2. Визначення концентрації джерела азоту

Як джерело азоту в поживному середовищі використовується кукурудзяний екстракт, який містить здебільшого аміний азот (амінокислоти). Вміст амінного азоту визначають, використовуючи метод, який ґрунтується на здатності амінокислот утворювати розчинні комплексні сполуки з іонами міді, кількість якої визначають йодометричним титруванням.

Методика проведення аналізу:

Спершу проводять центрифугування проби культуральної рідини (10 мл) задля усунення біомаси та інших нерозчинних частинок за 5000 об/хв упродовж 5 хв. До отриманого супернатанту додають розчин натрію гідроксиду концентрацією 0,1 М, після чого вносять суспензію ортофосфату міді ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$) у боратному буферному розчині в надлишковій кількості. Нерозчинний залишок ортофосфату міді відфільтровують. До фільтрату додають оцтову кислоту, задля утворення мідної солі оцтової кислоти. Далі до отриманого розчину додають калію йодид, внаслідок чого утворюється йод, кількість якого еквівалентна кількості міді та амінного азоту. Утворений йод відтитровують розчином натрію тіосульфату концентрацією 0,01 М. Вміст амінного азоту розраховують в мг/л, взявши до уваги, що 1 мл 0,01 М розчину натрію тіосульфату відповідає 0,28 мг амінного азоту [45].

Література

1. Fernández M., Hudson J. A., Korpela R., de los Reyes-Gavilán, C. G. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. *BioMed Research International*, 2015, 1–13. doi:10.1155/2015/412714
2. Ding F., Stoyanova, L.G., Netrusov A.I. Microbiome and Metabiotic Properties of Kefir Grains and Kefirs Based on Them. *Microbiology*. 2022, 91, 339–355. <https://doi.org/10.1134/S0026261722100885>
3. Slattery Cotter, O'Toole. Analysis of Health Benefits Conferred by *Lactobacillus* Species from Kefir. *Nutrients*. 2019, 11(6): 1252. doi:10.3390/nu11061252
4. Prado M.R., Blandón L.M., Vandenberghe L.P.S. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01177
5. *Lactobacillus plantarum*: характеристики, морфологія, застосування, 2022. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://uk.warbletoncouncil.org/lactobacillus-plantarum-7051>
6. Abdallah I., Abdulgawad I. Fermentation of *Nile Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) Wastes using *Lactobacillus plantarum* for the Production of Lactic Acid and Fer-tilizer. *Abdulgawad, Int J Waste Resour*. 2016, 6:4. doi: 10.4172/2252-5211.1000253
7. Закваска бактеріальна кефір Vivo №4 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://anc.ua/item/zakvaska-bakterialna-kefir-vivo-4-49966>
8. Закваска для кефіра KEFIR 2 Хансен, 100 U [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://dom-gastronom.com.ua/uk-ua/zakvaski-i-pleseni-dlja-sirodelija/zakvaski-hansen--hansen--dlja-sira/zakvaska-kefir-2--100-u-hansen>
9. Kefir Starter Culture (10 Capsules) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.yogurtbio.com/%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BD%D1%8B%D0%B5->

%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%83%D1%80%D1%8B/%
D0%B7%D0%B0%D0%BA%D0%B2%D0%B0%D1%81%D0%BA%D0%B0-
%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D0%BA%D0%B5%D1%84%D0%B8%D1%80-
10-%D0%BA%D0%B0%D0%BF%D1%81%D1%83%D0%BB%D1%8B-genesis

10. Закваска КЕФІР на 1000 л молока, DI-PROX К 01, 20 U [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prodamix.com.ua/ua/p1696146204-zakvaska-kefir-1000.html>

11. Manzoor A., Qazi J. I., Haq I. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *Journal of Biological Engineering*. 2017, 11(1). doi:10.1186/s13036-017-0059-2

12. Eyahmalay J., Elsayed E.A. Statistical Optimization Approaches for High Cell Biomass Production of *Lactobacillus casei*. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2020, 70: 216-221

13. Thakur A., Panesar P. S., Saini M.S. Optimization of process parameters and estimation of kinetic parameters for lactic acid production by *Lactobacillus casei* MTCC 1423. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2018. doi:10.1007/s13399-018-0347-1

14. Irkin R. Natural Fermented Beverages. *Natural Beverages*. 2019, 399–425. doi:10.1016/b978-0-12-816689-5.00014-6

15. Tan J. P., Jahim J. M., Wu T. Y., Harun S. Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2016, 36: 012058. doi:10.1088/1755-1315/36/1/012058

16. Wasserman a. E. Whey utilization. Iv. Availability of whey nitrogen for the growth of *Saccharomyces fragilis*. *Eastern Regional Research Laboratory, USDA, Philadelphia, Pennsylvania*. 1960.

17. *Lactobacillus* [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.gbm00604>

18. *Lactiplantibacillus plantarum* [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Lactiplantibacillus_plantarum
19. Wang Y., Xu N., Xi A. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84(2): 341–347. doi:10.1007/s00253-009-2012-x
20. Huang Y., Wu F., Wang X., Sui Y. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of Dairy Science*. 2013, 96(5): 2816–2825. doi:10.3168/jds.2012-6371
21. Bolla P. A., Carasi P., Bolla M. de los A. Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*. 2013, 21: 28–33. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.03.010
22. Спілка молочних підприємств України [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uadairy.com/vyrobnyctvo-molokoproduktiv-u-2021-roczy/>
23. Van Wyk, J. Kefir: The Champagne of Fermented Beverages. *Fermented Beverages*. 2019, 473–527. doi:10.1016/b978-0-12-815271-3.00012-9
24. Zanirati D. F., Abatemarco M., Sandes S. H. de C. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*. 2015, 32: 70–76. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.12.007
25. KEGG Pathway Text Search [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.kegg.jp/kegg-bin/search_pathway_text?map=lpl&keyword=lactose&mode=1&viewImage=true
26. Каустична сода [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p694734755-kausticheskaya-soda-granula.html?&primelead=M43NA>
27. Фамідез® Форте [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/instrumenty/famidez-forte>
28. Вернедор універсальний концентрат 5 л [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://panigarmonika.com.ua/uk/1072-vernedor-universalnij->

koncentrat-5-

l.html?utm_campaign=GMERCHANTCENTER&utm_source=google&utm_medium=Merchant&gclid=CjwKCAjwrDmhBhBBEiwA4Hx5g0_XA9jzby11_dQuYPLwQOfAvOtaGtjy6W82r_5gcRlj_65dwhos9xoCPasQAvD_BwE

29. Ексан Про Дез, антимікробна дія [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p914551087-eksan-pro-dez.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_spa_1_50_dom_i_sad&gclid=CjwKCAjwitShBhA6EiwAq3RqA63qo322zwd-

kQ9lxX0Rgkv7Cgprp5peO33Fks4SGZzQUH8QMq1Q7RoCZ5YQAvD_BwE

30. Фільтр грубого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/types/mesh/>.

31. Компресор [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50>.

32. Теплообмінник-охолоджувач [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuвачi/>.

33. Ресивер [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50>.

34. Генератор азоту адсорбційного типу MAS-GN2 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1192179080-generator-azota-adsorbtsionnogo.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_05_1&gclid=CjwKCAjw67ajBhAVEiwA2g_jENiJ7te3vYFKBCS75ZehiWYzUeTCTYg68BWfbIYyk4i7T-Usl6vcEBoCoOAQAvD_BwE

35. Фільтр індивідуальний [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/>.

36. SIP and CIP Customisable Pilot and Industrial Scale Fermenters/Bioreactors [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>.

37. Перистальтичні насоси [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tapflo.ua/images/pt_ptl_ua_rev1_2019.pdf.

38. Лічильник-дозатор для води [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1139912056-schetchik-dozator-dlya.html>.

39. Апарати сталеві з механічним перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.

40. Дозатор для сипких матеріалів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://artmash.ua/product/dozator-sypuchih-materialov-06-kub-m>.

41. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.

42. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.

23. Практикум з аналітичної хімії. Інструментальні методи аналізу. [для студ. вищ. навч. закл.] / Студеняк Я.І., Воронич О.Г., Сухарева О.Ю., Фершал М.В., Базель Я.Р - Ужгород, 2014.- 129 с.

44. В.А. Вешняков, Ю.Г. Хабаров, Н.Д. Камакіна, Порівняння методів визначення редуційних речовин: Метод бертрану, ебуліостатичний і фотометричний методи

45. Визначення вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>.

Додатки

