



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Завідувач кафедри  
біотехнології і мікробіології  
Пирог Т.П.  
«28» жовтня 2020 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Бойко Юлії Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: «Одержання біомаси *Lactobacillus acidophilus* для виробництва кисломолочних продуктів»

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «27» жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем роботи до 31.01.2021

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 1.6 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення ферментера становить 0.6, цільовий продукт біомаса,

виробничий штам *Lactobacillus acidophilus*

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

Характеристика кінцевої продукції

Характеристика біологічного агента

Техніко-економічне обґрунтування

Обґрунтування вибору технологічної схеми

Специфікація обладнання

Опис технологічної схеми

Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва формату А1- аркушів 1

Апаратурна схема виробництва формату А1 - аркушів 1



## РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений проектуванню ділянки виробничого біосинтезу біомаси *Lactobacillus acidophilus* В-7174 для виробництва кисломолочних продуктів. Проект складається зі вступу, семи розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схем) та переліку використаних джерел з 30 найменувань. Загальний обсяг проекту – 61 сторінки, 3 рисунків, 13 таблиць, 2 креслення формату А1.

У проекті надано обґрунтування та технологічний процес ділянки синтезу біомаси *L. acidophilus* В-7174, який включає блок допоміжних робіт (підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів, створення безкисневих умов культивування, підготовка і стерилізація поживних середовищ та розчинів для підтримання рівня рН під час біосинтезу), стадії підготовки посівного матеріалу та безпосереднє вирощування продуцента у виробничому ферментері.

Наведено склад поживного середовища для процесу культивування *L. acidophilus* В-7174. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано необхідні режими стерилізації. Розраховано кількість стадій підготовки посівного матеріалу. Наведено опис основних стадій технологічного процесу із зазначенням параметрів, точок контролю та матеріальних потоків. Складено карту постадійного контролю процесу.

Технологічна та апаратурна схеми процесу представлена у графічній частині проекту на 2 аркушах формату А1.

**Ключові слова:** лактобацили, *Lactobacillus acidophilus*, кисломолочні продукти, поживне середовище, біосинтез.

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА .....	9
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента .....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	15
2.3. Таксономічний статус біологічного агента .....	19
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт .....	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	21
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера .....	23
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	25
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ .....	28
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу .....	28
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	28
4.1.2. Обґрунтування стадій підготовки азоту для культивування .....	30
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	31
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища ....	34
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	37
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	39
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА .....	52
7.1. Карта постадійного контролю біосинтезу .....	52
7.2. Мікробіологічний контроль.....	57

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту .....	57
7.3.1. Визначення кількості життєздатних клітин.....	57
7.3.2. Визначення концентрації біомаси .....	58
7.3.3. Визначення концентрації джерел вуглецю і азоту .....	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	62

## ВСТУП

Ферментовані молочні продукти – сири, масло, сметана та кисломолочні напої є важливим складником раціону харчування людей упродовж всього життя [1].

Кисломолочні продукти одержують в процесі сквашування пастеризованого молока (вершків) чистими культурами молочнокислих бактерій з або без додавання дріжджів чи оцтовокислих бактерій (залежно від того яку саме продукцію виробник прагне отримати). У процесі сквашування під впливом певних бактерій та ферментів відбуваються хіміко-фізичні зміни складових частин молока. Дієтичні та лікувальні властивості кисломолочних продуктів пояснюються сприятливою дією мікроорганізмів і речовин, що утворюються внаслідок біохімічних процесів при заквашуванні молока на організм людини.

Кисломолочні продукти краще засвоюються організмом, аніж молоко, оскільки впливають саме на секреторну діяльність шлунку і кишечника, завдяки чому залози органів травлення інтенсивніше виділяють ферменти, прискорюючи перетравлювання їжі. Кисломолочні продукти підвищують перистальтику органів травлення. Маючи приємний, освіжаючий та іноді гострий смак, ці продукти сприяють підвищенню апетиту і тим самим поліпшують загальний стан організму [2].

За підсумками 2016 року [3] було відмічено приріст виробництва кисломолочного сиру. Обсяг виробництва склав 69,6 тис. т., що на 3,9% більше, ніж у попередньому році. Такі дані вказують на зростання попиту на даний товар.

Тож актуальною є робота, пов'язана з підвищення виробництва сиру кисломолочного за рахунок використання продуктивнішого штаму, для задоволення попиту населення.

					НУХТ БТЕК 05.01.12 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Бойко Ю.С.					5	2
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						Кафедра БТМ

Найчастіше для створення кисломолочних продуктів використовують культури ацидофільних лактобактерій.

Ацидофільні лактобактерії викликають молочнокисле бродіння і, завдяки цій своїй якості, широко використовуються при виготовленні молочнокислих продуктів. Вони також включаються до складу продуктів з метою подальшого позиціонування їх як пробіотичних. Зокрема, ацидофільні лактобактерії використовуються в пробіотичних продуктах наступних марок:

- кисломолочні продукти Biomax (Росія),
- соєвий йогурт Sojasun (Франція),
- йогурт і кисломолочний напій Muller Vitality (Великобританія),
- йогурт Mountain High (США), йогурт LG 21 (Японія),
- кисломолочні і соєві напої Lifeway Kefir (США) [4].

Новизною даної роботи є використання нового штаму ацидофільних лактобактерій, який має виражену антагоністичну дію по відношенню до широкого кола патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, помірну енергію кислотоутворення в молоці за різних температур (що не спричиняє кислого смаку готового продукту ферментації), добрий синерезис молочного згустку та формування молочного згустку, що розколюється [5].

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Завдяки лактобактеріям сьогодні можна отримати широкий вибір кисломолочної продукції – сири сичужні, йогурти, закваски, молочні напої з підвищеним вмістом певних компонентів [6, 7, 8]. Але зупинимось на сичужних сирах.

Кисломолочний сир – це кисломолочний продукт. Виготовляють його шляхом сквашування молока, маслянки чи її суміші з молоком. Використовують заквашувальні препарати із властивостями кислотно-сичужної, кислотної або термокислотної коагуляції білка (згідно ДСТУ 2212:2003 «Виробництво молока та кисломолочних продуктів. Терміни та визначення понять»). Кисломолочний сир – це продукт універсального призначення, має високу засвоюваність. Основною ознакою, яка характеризує і зумовлює його високу харчову і біологічну цінність, є підвищений на порядок вміст білка (10...16%), порівняно з незбираним молоком (3,2±0,5%). Більшу частину білків складає казеїн, який може замінити тваринні білки і має високу поживну цінність. До складу білків сиру кисломолочного входять усі незамінні амінокислоти – що робить його джерелом одним з необхідних сполук. Жир, що концентрується разом з білком при виробництві сиру, засвоюється організмом на 90...95% і містить ряд незамінних жирних кислот. Серед мінеральних речовин, що містяться і необхідні для утворення кісткової тканини та нормального обміну речовин, особливе місце належить елементам кальцію (120...166 мг/100 г) і фосфору (189...224 мг/100 г), які знаходяться у формі, найбільш сприятливій для засвоювання організмом. У сирі кисломолочному містяться важливі мінеральні елементи (мг в 100 г продукту): калій (112...117), натрій (41...44), магній (23...24), залізо (0,3...0,5).

					НУХТ БТЕК 05.01.12 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бойко Ю.С.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					7	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

З вітамінів молока у сирі кисломолочному найбільш представлені (мг в 100 г продукту):  $\beta$ -каротин (0,02...0,06), В1 (0,04...0,05), В2 (0,25...0,3), РР (0,3...0,45), С (0,5) [9]. Усі ці ознаки вказують на поживну цінність продуктів отримані шляхом використання молочнокислих бактерій. Продукти краще засвоюються організмом людини і містять в собі необхідні і незамінні сполуки.

### **Вимоги до якості**

Показники якості кисломолочного сиру повинні відповідати вимогам ДСТУ 4554:2006 «Сир кисломолочний. Технічні умови».

Кисломолочний сир нежирний і з масовою часткою жиру 2...18 % повинен відповідати таким вимогам саме за органолептичними показниками:

- консистенція та зовнішній вигляд – м'яка, розсипчаста або мазка. Дозволено незначну крупинчатість й незначне виділення сироватки;
- смак і запах – без сторонніх присмаків і запахів, характерний кисломолочний;
- колір – білий з кремовим відтінком, рівномірний по всій масі продукту.

Фізико-хімічні та мікробіологічні показники сиру кисломолочного зазначено у таблицях нижче.

*Таблиця 1.1*

### **Фізико-хімічні показники сиру кисломолочного [9]**

<b>Показник</b>	<b>Норма</b>
Масова частка жиру, %	2,0...18,0
Масова частка білку, %	не менше ніж 14,0
Масова частка вологи, %	65,0...80,0
Титрована кислотність (у межах), °Т	170,0...250,0
Активна кислотність, од. рН	4,4...3,8

Наявність фосфатази	відсутня
---------------------	----------

Таблиця 1.2

**Мікробіологічні показники сиру кисломолочного [9]**

<b>Показник</b>	<b>Норма</b>
Кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 г продукту, не менше ніж	$1 \cdot 10^6$
Кількість дріжджів, КУО в 1 г продукту, не більше ніж	100
Плісняві гриби, КУО в 1 г продукту, не більше ніж	50
Бактерії групи кишкових паличок (колі форми): - в 0,01 г продукту з терміном зберігання понад 72 год - в 0,001 г продукту з терміном зберігання до 72 год	Не дозволено
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 г	Не дозволено
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1,0 г продукту	Не дозволено

## РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

На даний час існує широкий вибір культур, що використовуються в виробництві кисломолочних продуктів. Тому важливо обрати рентабельного продуцента, зважаючи на певні особливості культури (час сквашування та кислотність).

Штами зазначені у табл. 2.1 коагулюють білки молока за температури 37°C і посівної дози 3% упродовж 4-5 годин. Гранична кислотність штаму ІМВ В-7247 становить 100°Т [10], а для штаму ІМВ В-7174 – 240°Т [5], що є придатними значеннями для використання у виробництві певних кисломолочних продуктів. Показники часу сквашування даних штамів подібні, що означає, що варто порівняти за рентабельністю, попередньо оцінивши склад поживного середовища, час культивування та концентрацію клітин.

Таблиця 2.1

#### Порівняльна характеристика біологічних агентів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація клітин, КУО/см <sup>3</sup>	Використана література
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ІМВ В-7174	Панкреатичний гідролізат казеїну – 30; сухе знежирене молоко – 10; лактоза – 10; глюкоза – 5,0; дріжджовий екстракт – 5,0; натрій лимоннокислий – 5,0; натрій оцтовокислий – 3,0; MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,2 (рН=6,7)	8	5×10 <sup>8</sup>	Пат 91417. Штам бактерій <i>Lactobacillus acidophilus</i> , що використовується у виробництві заквашувальних культур для сичужних сирів // Шульга Н. М., Кігель Н. Ф. – Опубл. 26.07.2010

					НУХТ БТЕК 05.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бойко Ю.С.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.				10	9 <sup>12</sup>
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
					РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		

<i>Streptococcus thermophilus</i> ІМВ В-7247	Панкреатичний гідролізат казеїну – 30; натрій лимоннокислий – 10,0; кукурудзяний екстракт – 20,0 мл; MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,25 (рН=6,6)	10	6,0×10 <sup>8</sup>	Пат 92287. Штам бактерій <i>Streptococcus thermophilus</i> , що використовується у виробництві бактеріальних концентратів для кисломолочних продуктів // Кігель Н. Ф., Науменко О. В., Рожанська О. М., Пасічнюк Є. Л. – Оpubл. 11.10.2010
-------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----	---------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Концентрація клітин при завершенні процесу культивування для *S. thermophilus* ІМВ В-7247 вища, але досягається за довший час культивування (10 год, у порівнянні 8 год для *L. acidophilus* ІМВ В-7174). Склад поживних середовищ даних штамів подібний.

На наступному етапі обрання біологічного агенту порівнювали вартість поживних середовищ з метою визначення рентабельності останніх для одержання біомаси (табл. 2.2).

**Вартість компонентів поживних середовищ для культивування  
*Lactobacillus acidophilus* IMB B-7174 та *Streptococcus thermophilus* IMB  
 B-7247**

<b>Продуцент</b>	<b>Компонент поживного середовища, г/л</b>	<b>Ціна компонента, грн/кг</b>	<b>Вартість компонента (грн) на 1 л середовища</b>	<b>Джерело інформації</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IMB B-7174	Панкреатичний гідролізат казеїну – 30	65	1,95	1
	Сухе знежирене молоко – 10	30	0,3	1
	Лактоза – 10	40	0,4	1
	Дріжджовий екстракт – 5,0	105	0,5	2
	глюкоза – 5,0	0,88	0,004	3
	Натрій лимоннокислий – 5,0	38,7	0,19	4
	Натрій оцтовокислий – 3,0	50	0,15	4
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,2	6,50	0,0013	1
Вартість 1 л середовища — 3,50 грн				
<i>Streptococcus thermophilus</i> IMB B-7247	Панкреатичний гідролізат казеїну – 30	65	1,95	1
	Натрій лимоннокислий – 10,0	38,7	0,38	4
	Кукурудзяний екстракт – 20,0 мл	140	2,8	1
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O – 0,25	6,50	0,0016	1
Вартість 1 л середовища – 5,15 грн				

Примітки. 1 – <https://prom.ua/>; 2 – <https://alibaba.com/>; 3 – <http://tehnchem.com.ua/>;

4 – <https://www.systopt.com.ua/>

З таблиці 2.2 бачимо, що собівартість середовища для культивування штаму IMB B-7174 нижча у порівнянні з штамом IMB B-7247. Але щоб

остаточно обрати біологічний агент, розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 г продукту**

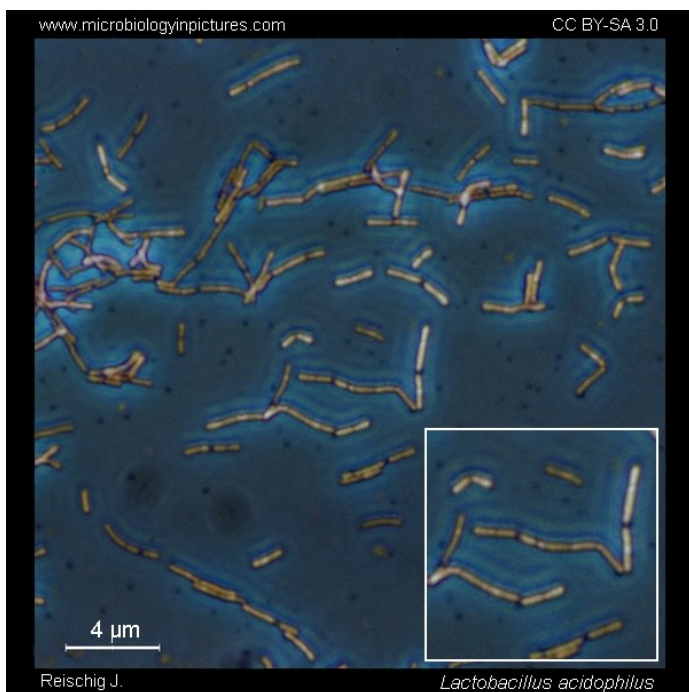
<b>Біологічний агент</b>	<b>Вартість 1 л середовища, грн</b>	<b>Концентрація клітин у 1 л препарату КУО/мл</b>	<b>Умовна вартість 1 КУО цільового продукту, грн/КУО</b>	<b>Тривалість культивування, год</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IMB B-7174	3,50	$5 \times 10^8$	$0,7 \times 10^{-8}$	8
<i>Streptococcus thermophilus</i> IMB B-7247	5,15	$6 \times 10^8$	$0,86 \times 10^{-8}$	10

Економічна складова у виробництві кінцевого продукту відіграє найважливу роль, а саме чим нижчою є собівартість кінцевого продукту, тим дешевшою буде технологія виробництва і відповідно – більший прибуток. З табл 2.3 бачимо, що рентабельнішим є культивування *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7174.

**2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента**

**Культурально-морфологічні ознаки штаму**

Клітини штаму паличкоподібні, нерухомі, грампозитивні. Мають товщину від 1 до 3 мкм та довжину від 8 до 20 мкм, розміщуються у вигляді окремих клітин або ланцюжків. Структура клітин незерниста. Штам росте на поверхні агару з гідролізованим молоком та агаризованому середовищі МРС, створюючи пасмовидні колонії, глибинні колонії мають форму шматочків вати. У рідкій культурі штам росте у вигляді рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні [5].



**Рис 2.1.** Мікрофотографія *Lactobacillus acidophilus*



**Рис 2.2.** Ріст *Lactobacillus acidophilus* на МРС

### **Фізіолого-біохімічні властивості штаму**

Штам є факультативним анаеробом. Штам росте за температури від +12°C до +48°C, оптимальна температура росту – (36±1)°C. Штам коагулює білки молока за цієї температури і посівної дози 3% упродовж 4-5 годин. Нагромадження клітин у молоці складає (4,0-5,0)·10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>. Штам ферментує глюкозу, лактозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, манозу, мальтозу, не ферментує арабінозу, ксилозу, рамнозу, маніт, мелібіозу, рафінозу, гліцерин. Росте за присутності NaCl та жовчі не вище 4,0% та 40% відповідно, не росте у м'ясопептонному бульйоні з кислотністю, вищою за рН 9,6; не утворює аміаку з аргініну [5].

### **Технологічні властивості штаму**

Штам *L. acidophilus* В-7174 згортає молоко, утворюючи щільний згусток, що розколюється, з синерезисом на рівні 25% та помірним рівнем граничної кислотності до 240°Т. Такі показники гарантують формування сирного зерна з інтенсивним відділенням сироватки та мінімізують втрати сухих речовин за рахунок утворення сирного пилу. Позитивною властивістю штаму *L. acidophilus* В-7174 є його низька чутливість до дії нітрату калію, який часто використовують у виробництві сирів з тривалим терміном визрівання для пригнічення розвитку маслянокислих бактерій. Втрата активності штаму, що заявляється, за внесення у молоко максимально дозволеної кількості  $KNO_3$  – 300 г на 1 т молочної суміші – становить не більше 5%. Ступінь виживання бактеріальних клітин *L. acidophilus* В-7174 під час заморожування та сублімаційного сушіння на рівні 74,0% дає змогу одержувати активний сухий бактеріальний концентрат та препарат прямого внесення [5].

Штам характеризується помірним приростом активної кислотності за температурних режимів, що застосовують під час виробництва сирів. Штам *L. acidophilus* В-7174 забезпечує достатній рівень кислотоутворення на всіх стадіях технологічного процесу виробництва сирів голландської чи швейцарської груп: сичужного зсідання молока та розрізання згустку за температури 32-34°С, другого нагрівання до 40-42°С чи 48-54°С і вимішування сирного зерна за цієї ж температури, формування та пресування за умов поступового охолодження сирної маси, соління і визрівання сиру за температури 12-14°С. За температури зберігання 4-6°С нагромадження кислотності штамом не перевищує 0,05 од. рН, що гарантує стабільність показників якості готового продукту [5].

Таблиця 2.4

**Технологічні властивості штаму *L. acidophilus* В-7174 [5]**

Показник	Значення
Гранична кислотність у молоці, °Т	240

Синерезис молочного згустку, %	25
Кінетична в'язкість молочного згустку за температури 20°C, Па·с	8,0·10 <sup>3</sup>

Закінчення табл. 2.4

Вміст білкових сполук у сироватці, мг/см <sup>3</sup>	2,7
Терmostійкість упродовж 60 хвилин:	
За температури 50 °С	+
За температури 60 °С	+
Рівень інгібування KNO <sub>3</sub> , %	
200 г на 1 т молока	0
300 г на 1 т молока	5
Фагостікість	+
Ступінь виживання під час ліофілізації, %	73,0

Антагоністична активність штаму наведена у табл. 2.5. Штам *L. acidophilus* В-7174 характеризується високою антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, що визначали за методом лунок, оцінюючи розмір зони затримки росту відповідної тест-культури після 24-годинної інкубації за температури 37°C [5].

Таблиця 2.5

**Антагоністична активність штаму ІМВ В-7174 [5]**

Тест-культура	Величина зон затримки росту тест-культури, мм
<i>Escherichia coli</i>	23-26
<i>Staphylococcus aureus</i>	16-18
<i>Proteus vulgaris</i>	16-18
<i>Enterobacter sp.</i>	14
<i>Proteus rettgeri</i>	13-15
<i>Bacillus subtilis</i>	20-22

## Біохімічні властивості штаму

Штам *L. acidophilus* В-7174 характеризується високою протеолітичною активністю, гідролізуючи 17,5% фракції S-казеїну та 4,6%-казеїну сирної маси упродовж 45 діб визрівання. Штам забезпечує розщеплення 3,8% пептидів з молекулярною масою 120-67кДа, що дозволяє уникнути формування гіркого присмаку в готовому продукті, а також нагромадження 4,5% пептидів з молекулярною масою 30-20 кДа, 3,2% пептидів з молекулярною масою 20-15 кДа та 8,4% пептидів з молекулярною масою 15-10 кДа. Штам дає змогу одержати сир із вмістом вільних амінокислот на рівні 4,2%, що є достатнім для досягнення зрілості сиру. Такі властивості штаму, що заявляється, здатні забезпечити одержання сичужних сирів з вираженими смаковими якостями та прискорити визрівання сирної маси [5].

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічний статус *L. acidophilus* згідно з дев'ятим виданням керівництва Бергі з систематики бактерій [11]:

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Lactobacillales*

Родина: *Lactobacillaceae*

Рід: *Lactobacillus*

Штам *L. acidophilus* В-7174 був одержаний у результаті спрямованої селекції культури, вилученої з кисломолочного продукту домашнього приготування. Штам первісно депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України і зареєстровано за номером ІМВ В-7174. Штам *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7174 використовується у виробництві заквашувальних культур для натуральних сирів [5].

## 2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Джерелом вуглецю та енергії у середовищі для біосинтезу біомаси продуцента є глюкоза та панкреатичний гідролізат казеїну. Схема перетворення компонентів всередині клітини наведено на рис. 2.3.

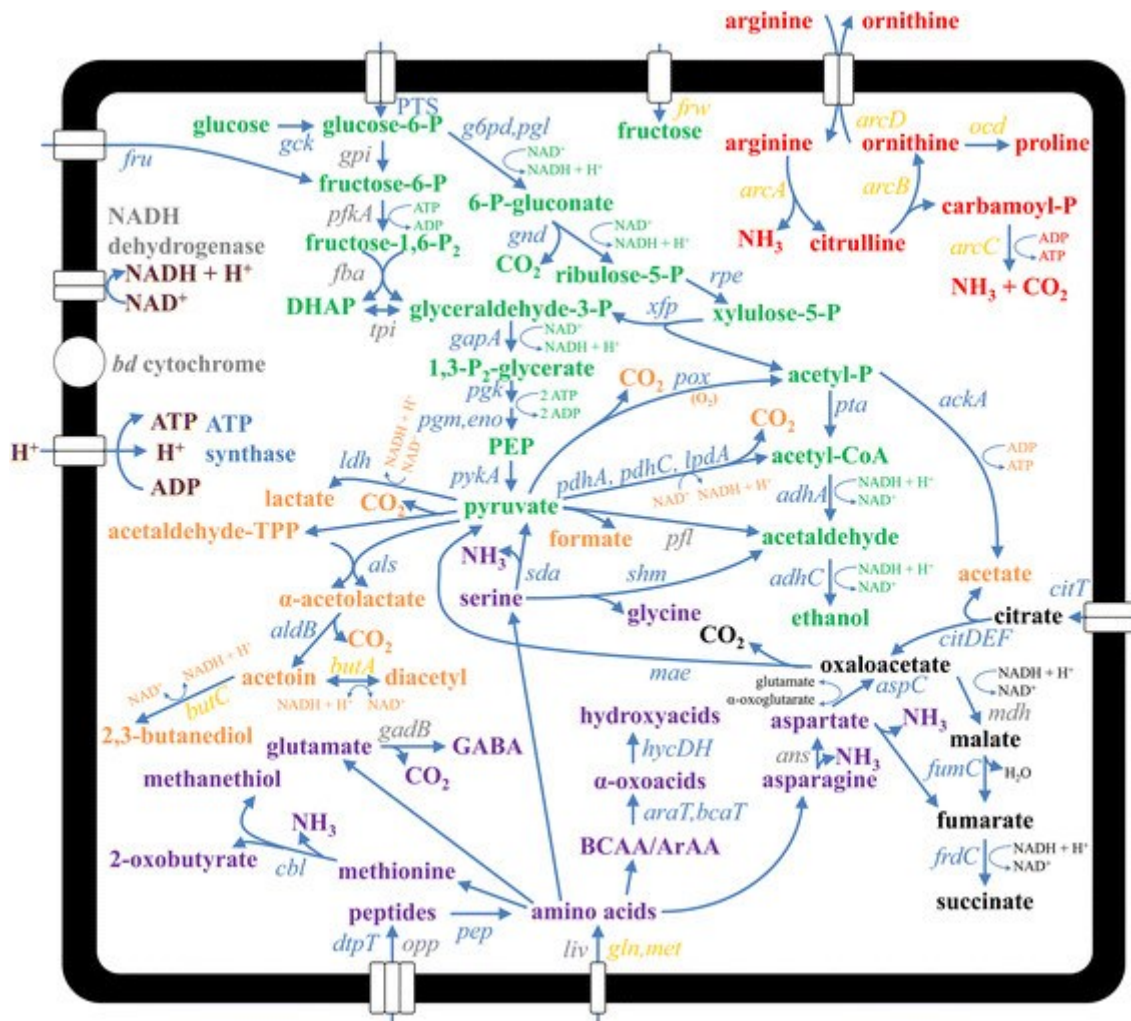


Рис. 2.3 Трансформація ростового субстрату всередині клітини представника роду *Lactobacillus* [12]

З рисунку бачимо, що у клітині синтезуються всі вихідні сполуки для синтезу нових клітин – власне процесу накопичення біомаси.

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

На сьогодні вже відомо, що одним із аспектів здоров'я та гарного самопочуття є правильне і раціональне харчування [13]. Тож необхідно у свій раціон включати різноманітні продукти окрім м'яса, овочів, фруктів, зернових. Таким продуктом може бути ацидофільні продукти – молочні продукти зброженні ацидофільними паличками.

Відомо багато «за» чому необхідно вживати продукти зброжені *Lactobacillus acidophilus*:

- 1) вживання таких продуктів зменшує рівень шкідливого холестеролу;
- 2) у комбінації з іншими пробіотичними продуктами сприяє попередженню і навіть лікуванню діареї;
- 3) зменшує певні симптоми Синдрому подразненого кишечника, такі як біль у животі та здуття;
- 4) запобігає і попереджує вагінальні інфекції;
- 5) сприяє зменшенню ваги тіла;
- 6) зменшує симптоми застуди та грипу, особливо у дітей;
- 7) сприяє зменшенню алергії на пилок у дітей;
- 8) попереджує та зменшує симптомів екземи;
- 9) покращує стан кишечника [14]

Одним із таких продуктів є Ацидофілін (ацидофільне молоко). Він рекомендуваний:

- новонародженим для формування правильної мікрофлори організму;

					НУХТ БТЕК 05.01.12 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бойко Ю.С.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.					19	7
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- людям будь-якого віку для нормалізації мікрофлори шлунково-кишкового тракту, обміну речовин, нормалізації процесів травлення, насичення організму необхідними вітамінами та мікроелементами;
- після антибіотико терапії для відновлення мікрофлори ШКТ, підвищення імунітету та інших захисних механізмів організму;
- для профілактики дизбактеріозу;
- для усунення гнильних процесів в кишечнику;
- людям з діабетом 1-го та 2-го типів для дієтичного харчування;
- людям з проблемами зайвої ваги та ожиріння [15]

### 3.2 Розрахунок потужності виробництва

Візьмемо, що ми будемо виробляти закваску для ацидофільного молока аби задовольнити потреби на рік людей з діабетом для забезпечення дієтичного харчування. Точна кількість хворих на цукровий діабет в Україні не встановлена, але за даними оприлюдненими у 2018 році ця цифра приблизно складає 1,3 млн [16].

Добова дозволена норма молочних продуктів при діабеті: 1 склянку (250 мл) нежирного молока чи 180 мл нежирного йогурта [17]. Будемо вважати, що за тиждень людина буде вживати в середньому 2,5 склянки ацидофільного молока – це  $250 \times 2,5 = 625$  мл молока на тиждень, візьмемо 600 мл (враховуючи що не кожен тиждень буде витримуватись бажана частота і норма).

Варто зазначити, що для приготування такого молока необхідна певна кількість закваски – 0,5 г закваски (з концентрацією клітин  $2 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>) на 1-3 л молока [18].

В Україні ринок заквасок представлений як закордонними так і українськими виробниками, наприклад серед найпопулярніших:

- VIVO – Україна

- ТМ «Zakvaskin» – Україна
- Genesis™ – Болгарія
- GOOD FOOD – Італія

Тож візьмемо, що наша закваска займе 5% ринку, тобто  $1,3 \text{ мл} \times 0,05 = 65$  тис осіб будуть купувати нашу закваску.

Враховуючи, що в середньому в тиждень будуть приймати 600 мл ацидофільного молока, то річна потреба у такому продукті складає

$$0,6 \text{ л} \times 52 \text{ тижні} \times 65 \text{ тис осіб} = 2028000 \text{ л/рік.}$$

А закваски необхідно:

$$0,5 \text{ г вологої закваски} - 3 \text{ л молока}$$

$$X \text{ г закваски} - 2028000 \text{ л молока}$$

$$X = (2028000 \times 0,5) / 3 = 338000 \text{ г або } 338 \text{ кг вологої закваски на рік.}$$

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

Для забезпечення людей хворих на діабет ацидофільним молоком необхідно виготовити 338 кг закваски (біомаси *Lactobacillus acidophilus*) в рік.

Розрахуємо, скільки саме культуральної рідини необхідно отримати за цикл ферментації, для того щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

З патенту [5] відомо, що після культивування *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7174 концентрація біомаси складає 3 г/л за 8 год культивування. Вміст сухих речовин в уже готовому продукті  $СР_{ГП}$  складає частку 0,95.

Для проведення наступних розрахунків візьмемо такі початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$T_{ЦФ} = T_{Ф} + T_{ПО} = 8 + 10 = 18 \text{ год,}$$

де  $T_{Ф}$  – час культивування;  $T_{ПО}$  – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год),

стерилізація (2 год), охолодження (1,5 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

$K_1$  – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) прийmemo  $K_1 = 1,1$ . Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка  $E_{CB} = 0,15$ .

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 100 ( $T_{рд}$ ).

При кількості трудоднів рівному 100, кількість продукту на добу ( $G_{нтд}$ ) становитиме:

$$G_{нтд} = \frac{G_{нт}}{T_{рд}} = \frac{338}{100} = 3,38 \text{ кг/добу}$$

Кількість продукту на добу з урахуванням втрат за виробничий цикл ( $E_B = 10\%$ ):

$$G_{пд} = \frac{G_{нтд}}{1 - E_{CB}} = \frac{3,38}{1 - 0,1} = 3,76 \text{ кг/добу}$$

Кількість біомаси за цикл:

$$G_{цк} = \frac{G_{пд} \times T_{цф}}{24} = \frac{3,76 \times 18}{24} = 2,82 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{кр} = \frac{K_1 \times G_{цк} \times CP_{ГП}}{P_{кр}} = \frac{1,1 \times 2820 \times 0,95}{3} = 982,3 \text{ л/цикл}$$

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

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$K_{ц} = \frac{G_{нт}}{G_{цк}} = \frac{338}{2,82} = 119,8 \text{ циклів}$$

Приймаємо 120 циклів.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які будуть становити 1%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\phi} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{982,3}{1 - 0,01} = 992,2 \text{ л}$$

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

$$V_{\text{гф}} = \frac{V_{\phi}}{K_{\text{зф}}} = \frac{992,2}{0,6} = 1654 \text{ л}$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер  $V_{\text{нф}} = 1,6 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення ферментера:

$$K_{\text{зф}} = \frac{V_{\phi}}{V_{\text{нф}}} = \frac{992,2}{1600} = 0,62$$

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

### 3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментаторі з робочим об'ємом  $V_{\phi} = 992,2$  л. Найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{нф}} = 1600$  л.

Згідно патенту [5], кількість посівного матеріалу для ферментера становить 5% від об'єму поживного середовища:

$$V_{\text{пс}} = \frac{V_{\phi}}{1 + X_{\phi}} = \frac{992,2}{1 + 0,05} = 945 \text{ л}$$

де  $X_{\phi}$  – доза посівного матеріалу для ферментера (0,05).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмф}} = V_{\phi} - V_{\text{пс}} = 992,2 - 945 = 47,2 \text{ л.}$$

Для одержання 47,2 л інокуляту в посівному апараті необхідно: враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{47,2}{1 - 0,01} = 47,7 \text{ л}$$

Кількість інокуляту  $V_{\text{па}} = 47,7$  л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{47,7}{0,6} = 79,5 \text{ л}$$

Замовляємо ферментер об'ємом  $V_{\text{нпа}} = 80$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{47,7}{80} = 0,59$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 5% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{47,7}{1 + 0,05} = 45,4 \text{ л}$$

де  $X_{\text{па}}$  – доза інокуляту для посівного апарату (0,05).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 47,7 - 45,4 = 2,3 \text{ л}$$

Для одержання 2,3 л інокуляту в посівному апараті необхідно: враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор які становлять від 1%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{па}} = \frac{V_{\text{пмф}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{2,5}{1 - 0,01} = 2,52 \text{ л}$$

Кількість інокуляту  $V_{\text{па}} = 2,52$  л можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{гпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{K_{\text{зпа}}} = \frac{2,52}{0,6} = 4,2 \text{ л}$$

Замовляємо ферментер об'ємом  $V_{\text{ппа}} = 4$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зпа}} = \frac{V_{\text{па}}}{V_{\text{гпа}}} = \frac{2,52}{4} = 0,63$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 5% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пспа}} = \frac{V_{\text{па}}}{1 + X_{\text{па}}} = \frac{2,52}{1 + 0,05} = 2,4 \text{ л}$$

де  $X_{\text{па}}$  – доза інокуляту для посівного апарату (0,05).

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 2,52 - 2,4 = 0,12 \text{ л}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у колбах. Для цього використовують колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,1$ .

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{120}{750 \times 0,1} = 1,6$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біомаси *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7174 у ферментері об'ємом 1600 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи.

## РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

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

Оптимальними умовами росту *L. acidophilus* IMB В-7174 є температура 39°C, та рівень рН 6,7 [5].

Можливі декілька варіантів проведення процесу культивування: глибинно і поверхнево. Розглянемо кожен з них.

При поверхневому культивуванні важливо збільшити власне площу зіткнення поживного середовища з повітрям. Такий тип культивування мікроорганізмів застосовується як в лабораторних умовах, так і в промислових масштабах. Недоліком поверхневого способу є необхідність встановлення кювет, роботу з якими важко механізувати та/або автоматизувати [19].

Глибинний спосіб культивування має ряд переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити ручну рутинну працю, спрощує механізацію/автоматизацію виробництва та робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування. При такому способі культивування збільшується питома площа контакту клітин продуцента зі складовими середовища культивування, що дає можливість отримувати препарати з більшою питомою активністю [19]. Також продуцент – факультативний анаероб, а для забезпечення безкисневих умов глибинний спосіб підходить краще ніж поверхневий.

Виходячи з усього вищесказаного, доцільно буде використовувати саме глибинний спосіб, що має ряд переваг у порівнянні з поверхневим: висока ефективність і ступінь використання компонентів поживного середовища, асептичність,

					НУХТ БТЕК 05.01.12 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бойко Ю.С.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акр.
Перевір.		Пенчук Ю.М.					26	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

можливість контролювати співвідношення компонентів поживного середовища.

Глибинний спосіб культивування, в свою чергу поділяється на періодичне і безперервне. Тому необхідно обрати саме який тип глибинного способу культивування ми будемо використовувати.

Власне при періодичному типі культивування клітини продуцента поміщають в закриту посудину певного об'єму з поживним середовищем, і задають певні початкові умови. Поступово збільшується щільність культури, знижується концентрація поживних речовин і накопичуються продукти обміну, тобто умови існування мікроорганізмів докорінно змінюються у порівнянні з початковими. Також періодичну культуру зазвичай розглядають як замкнуту систему, яка переживає різні фази розвитку. Під час періодичного процесу можна досягти більш повнішого споживання субстрату продуцентами, внаслідок того, що субстрат вноситься лише один раз і споживається мікроорганізмом протягом усього часу культивування [19].

Саме безперервне культивування дозволяє зафіксувати культуру в певній фазі росту (зазвичай експоненційній). При цьому способі склад середовища та умови росту залишаються незмінними. Цього досягають шляхом постійної подачі нових порцій поживного середовища й одночасним видаленням такої ж кількості середовища з клітинами та продуктами обміну. Подаючи свіже середовище та видалення частини суспензії відбувається з тією самою швидкістю, з якою росте культура. У цьому випадку встановлюється динамічна рівновага [19].

Виробництво пробіотичних препаратів є малотоннажним, тому доцільнішим буде використання саме періодичного способу культивування.

Цільовим продуктом є біомаса, тому передбачається асептичний спосіб культивування. Адже за даних оптимальних умов росту (39°C і слабо-кисле

pH) існує певний ризик контамінації середовища культивування сторонньою мезофільною мікрофлорою. Також варто відмітити високий вміст термолабільних сполук, що є основними джерелами азоту та вуглецю, і також можуть спричинити контамінацію сторонньою мікробіотою.

### **Обґрунтування вибору ферментера**

Вибір ферментера базується на особливостях способу культивування, які були зазначені раніше.

Основними вимогами до необхідного нам ферментатора є асептичність умов та можливість забезпечення безкисневих умов культивування.

Для забезпечення подачі інертного газу у нижній частині ферментера встановлюють спеціальний пристрій – барботер, а для вищого коефіцієнту масообміну апарат повинен бути обладнаний певним механічним перемішуючим пристроєм. Існує декілька типів таких перемішуючих пристроїв, проте одним з найефективніших є саме мішалки турбінного типу [120].

При використанні турбінної мішалки ймовірно виникнення кругового руху рідини в ферментері, в результаті чого утворюється воронка. У такому випадку в апараті на невеликій фіксованій відстані від стінок встановлюються відбивні перегородки, щоб уникнути утворення застійних зони при процесі перемішування.

Щоб задовольнити річну потребу необхідно підібрати ферментер об'ємом 1600 л. Обираємо ферментер фірми SYSBIOTECH [21] об'ємом 1.6 м<sup>3</sup>. Матеріал обраного нами ферментера – це сталь AISI 316L. Також варто зазначити, що ферментер уже облаштований необхідними нам датчиками – pH та датчиком оптичної густини.

#### **4.1.2. Обґрунтування стадій підготовки азоту для культивування**

Оскільки *L. acidophilus* IMB B-7174 по відношенню до кисню є факультативним анаеробом, то його культивування слід проводити в анаеробних умовах. Здійснення таких умов можна створити шляхом

продування середовища азотом. Для цього закупаємо балони з азотом та через спеціальні очищувачі (для забезпечення очистки газу від можливого пилу) подаємо його в ферментер, посівний апарат та інокулятор. Встановлюємо індивідуальний фільтр безпосередньо перед подачею азоту в апарати (перед ферментером, посівним апаратом та інокулятором).

У цеху на головному повітряному колекторі встановлюють головні фільтри заповнені набивним волокном. На цих фільтрах затримується приблизно 95% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, – до 99,999% мікроорганізмів.

УФ-лампи використовують для стерилізації повітря в боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом [22].

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

Для забезпечення асептичності процесу культивування продуцента перед початком процесу технологічне обладнання, що використовується, миють та/або дезінфікують. До мийних та дезінфікуючих засобів висувають наступні вимоги:

1. Широкий спектр антимікробної дії та пролонгованої дії;
2. Безпечні для людей, не пошкоджують шкіру і слизові оболонки;
3. Не мають запаху і властивостей барвників;
4. Не повинні псувати предмети, що підлягають дезінфекції;
5. Ціна й доступність.

Для вибору мийних та дезінфікувальних засобів враховують їх вартість, витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення та ефективність. На 1 м<sup>2</sup> витрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502) [23].

Кількість трудоднів становить 100, тому необхідно обрати мінімум 2 дезінфікуючих засоби з різними діючими компонентами, для попередження виникнення резистентності у можливих контамінантів.

Для підготовки обладнання, миття фільтрів, комунікацій та біореакторів різного об'єму використовують Каустичну соду (їдкий натрій, NaOH). Водні розчини цієї сполуки мають лужну реакцію. Добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи саме гарячі 1–2% розчини. При зниженні температури розчину мийні властивості засобу знижуються [23].

Рекомендується для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю використовувати саме 0,5% розчини каустичної соди із температурою  $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ , а для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій 1 та 2 % розчини із температурою  $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

Біомой – це мийний засіб, що містить в своєму складі синтетичні поверхово-активні речовини і також протеолітичні ферменти. Водні розчини засобу безбарвні, прозорі, виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості. Також легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються та не залишають нальоту. Розчини Біомою не пошкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми. Засіб належить до мало небезпечних речовин (4 клас безпеки), не виявляє кумулятивні, шкіряно-резорбтивні та алергенні властивості [24] – тобто є безпечними для людей.

Рекомендується для ручного миття устаткування, скляної і полімерної тари та інвентарю використовувати 0,5 % розчини Біомою з температурою  $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ , а для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари 0.15-0.3 % розчини температурою  $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

Необхідно проводити генеральне та щоденне прибирання для дотримання санітарно-гігієнічного стану виробництва. Необхідно

застосовувати універсальний миючий засіб який дозволить обробляти і мити різні поверхні на підприємстві для щоденного та генерального прибирань. Засоби варто змінювати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. На ринку України представлений широкий вибір миючих та дезінфікуючих засобів. Керуючись співвідношенням ціна – якість необхідно обрати два оптимальних миючих засобів. Такими засобами є Гембар, та Деконекс 50 ФФ [25, 26].

Гембар є нетоксичною гуанідиною полімерною сполукою. Має ряд переваг:

- добре розчинний у воді;
- пролонгована дія;
- низька токсичність (обслуговуючому персоналу при роботі з робочими розчинами не застосовувати традиційних засобів індивідуального захисту очей і слизових оболонок);
- стабільність робочих розчинів – що дозволяє зберігати розведені концентрати.

Деконекс 50 ФФ в якості активно діючої речовини містить гліюксаль, глутаровий альдегід, дидецилдиметиламоній хлорид. До складу засобу також входять гліколи, суміш ефірних олій і вода. Завдяки всім цим складовим добре розчинний у воді. Засіб відноситься до помірно небезпечних речовин (3 клас безпеки). У вигляді концентрованих розчинів подразнює шкіру, слизову оболонку очей і верхніх дихальних шляхів. Для приготування робочих розчинів деконексу 50 ФФ використовують тільки холодну воду (при застосуванні гарячої води можливе випаровування отруйних парів альдегідів). Не кородують об'єкти, виготовлені з металу скла полімерних матеріалів та гуми. Рекомендується використовувати 0.25-1.0 % розчини Деконекс 50 ФФ для дезінфекція поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), інвентарю та санітарно-технічного обладнання, а також

технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю і внутрішньо цехової тари [26].

Отже, через низьку вартість та ефективність миття застосовують розчин каустичної соди для миття обладнання. Треба зауважити, що при потраплянні на шкіру у персоналу можуть з'явитися опіки та подразнення. Тому при роботі необхідно використовувати захисні засоби: захисні окуляри, гумові рукавички, прорезинений хімічно стійкий одяг.

Для щоденного та генерального прибирань використовують миючі засоби Гембар та Деконекс 50 ФФ. Вони економічні і доцільні для використання їх на підприємстві. Обрані засоби не несуть прямої загрози персоналу на виробництві.

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

Культивування штаму В-7174 проводять у середовищі наступного складу (г/л): Панкреатичний гідролізат казеїну – 30; сухе знежирене молоко – 10; лактоза – 10; глюкоза – 5,0; дріжджовий екстракт – 5,0; натрій лимоннокислий – 5,0; натрій оцтовокислий – 3,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2 [5].

#### **Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в колбах на качалках**

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в колбах, становить 0,12 л. Стерилізація проходить в автоклаві. Розділяємо поживне середовище на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

**Композиція I:** глюкоза, лактоза, панкреатичний гідролізат казеїну, сухе знежирене молоко, дріжджовий екстракт, цистеїн (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

**Композиція II:** солі – натрій лимоннокислий, натрій оцтовокислий,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (умови стерилізації – 131 °С, 40 хв).

Окремо стерилізуються термолабільні компоненти та солі.

### **Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в посівному апараті об'ємом 4 л**

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті, становить 2,52 л. Поживне середовище ділимо на такі композиції:

**Композиція I:** глюкоза, лактоза, панкреатичний гідролізат казеїну, сухе знежирене молоко, дріжджовий екстракт, цистеїн (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

**Композиція II:** солі – натрій лимоннокислий, натрій оцтовокислий,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (умови стерилізації – 131 °С, 40 хв).

Окремо стерилізуються термолабільні компоненти та солі.

Для підтримки рН на рівні 6,7 простерилізоване середовище підтитрують стерильним 25% розчином аміаку.

### **Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 80 л**

Об'єм середовища, необхідний для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі, становить 47,7 л. Поживне середовище ділимо на такі композиції:

**Композиція I:** глюкоза, лактоза, панкреатичний гідролізат казеїну, сухе знежирене молоко, дріжджовий екстракт, цистеїн (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

**Композиція II:** солі – натрій лимоннокислий, натрій оцтовокислий,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (умови стерилізації – 131 °С, 40 хв).

Окремо стерилізуються термолабільні компоненти та солі.

Для підтримки рН на рівні 6,7 простерилізоване середовище підтитрують стерильним 25% розчином аміаку.

### **Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1600 л**

Об'єм середовища, необхідний для процесу біосинтезу в ферментері, становить 992,2 л. Поживне середовище ділимо на такі композиції:

**Композиція I:** глюкоза, лактоза, панкреатичний гідролізат казеїну, сухе знежирене молоко, дріжджовий екстракт, цистеїн (умови стерилізації – 112 °С, 30 хв).

**Композиція II:** солі – натрій лимоннокислий, натрій оцтовокислий,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (умови стерилізації – 131 °С, 40 хв).

Окремо стерилізуються термолабільні компоненти та солі.

Для підтримки рН на рівні 6,7 простерилізоване середовище підтитрують стерильним 25% розчином аміаку.

Отже, технологічна схема біосинтезу біомаси *Lactobacillus acidophilus* В-7174 передбачає наявність таких допоміжних робіт:

- Стерилізація 25% водного розчину аміаку;
- Приготування та стерилізація поживних середовищ.

Додаткове обладнання:

- Збірники з сорочкою для стерилізації 25% водного розчину аміаку;
- Збірники з сорочкою для приготування поживного середовища.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

### Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси *Lactobacillus acidophilus*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Р-1	Реактор-змішувач для приготування робочого миючого розчину	1	Реактор-змішувач об'ємом 2 м <sup>3</sup> , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
Н-2 Н-10 Н-14 Н-16 Н-19	Насос відцентровий	5	Насос відцентровий Debem MB 120. Продуктивність 25,0 м <sup>3</sup> /год, матеріал поліпропілен (PP/PVDF). Виробник: «Debem» (Україна). <sup>2</sup>
Б-3	Балон зі стисненим іназотом	1	Балон 400 л. Очищений, стиснений азот, робочий тиск становить 150-200 атм. Виробник : «Weldex» (Україна). <sup>3</sup>
ОЧ-4	Очищувач балонних газів	1	Очищувач балонних газів 11 ЧГМ-6-014. Містить нікелевий поглинач, цеоліт NaX, фільтр ЛФС-2. Виробник: «Призма» (Росія). <sup>4</sup>
Р-5	Реактор-змішувач для водного розчину аміаку	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (20-300 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
Ф-6 Ф-11 Ф-17	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтри (Р)–SRF N. Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США). <sup>5</sup>

НУХТ БТЕК 05.01.12 ДП ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Бойко Ю.С.		
Перевір.		Пенчук Ю.М.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
		Літ.	Арк.	Акрівів
			35	2
Кафедра БТМ				

Закінчення табл. 5.1

1	2	3	4
ФР-7	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 4 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$ , нержавіюча сталь 316L. Виробник: «Applikon Biotechnology» (Нідерланди) <sup>6</sup>
Р-8	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
Р-9	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 60 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
ФР-12	Посівний апарат	1	Ферментер об'ємом 80 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$ , матеріал 316 L. Виробник: («GEA Group» (Німеччина) <sup>7</sup>
Р-13	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 1 м <sup>3</sup> , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
Р-15	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 80 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
ФР-18	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 1600 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$ , матеріал 316 L. Виробник: («GEA Group» (Німеччина) <sup>7</sup>

**Примітка:** пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 1. <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», емінісне обладнання), 2. [www.debem.com.ua](http://www.debem.com.ua) («Debem», насоси), 3. <https://weldkiev.prom.ua/> («Weldex», балони зі стисненим газом), 4. <http://www.ooo-prizma.ru> («Призма», очищувач балонних газів), 5. <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря), 6. <https://www.applikon-biotechnology.com/> («Applikon Biotechnology», інокулятор 4 л), 7. <https://www.gea.com/> («GEA Group», посівний апарат 80 л, ферментер 1600 л).

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу біомаси *Lactobacillus acidophilus* В-7174 включає в себе допоміжні роботи (підготовка безкисневих умов, приміщень та титруючих агентів, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез).

Технологічну та апартурну схеми біосинтезу біомаси *L. acidophilus* В-7174 наведено у графічній частині проекту.

### **ДР 1. Санітарна підготовка виробництва**

Проведення саме санітарно-гігієнічного робіт є обов'язковою частиною з підготовчих робіт на виробничих підприємствах. Основними цілями санітарної підготовки виробництва є забезпечення мінімальної кількості контамінантів у всіх складових виробничого процесу: в поживному середовищі, на поверхнях обладнання, яке контактує з культуральною рідиною та забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика впливають на якісні показники продукції. Даний етап суттєво впливає на створення безпечних умов праці та забезпеченні охоронних заходів спрямованих для збереження здоров'я працівників підприємства. Санітарна підготовка виробництва реалізується за рахунок виконанням робіт по щоденному та генеральному прибиранні виробничих приміщень та централізованою підготовкою обладнання.

#### *ДР 1.1. Підготовка персоналу*

##### *ДР 1.1.1 Навчання персоналу*

Саме підприємство забезпечує і організовує навчання персоналу.

Існують наступні види навчань:

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

					НУХТ БТЕК 05.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Бойко Ю.С.			Літ.	Арк.	Акв.
Перевір.		Пенчук Ю.М.				37	13
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

2. Вхідне навчання: коли на певну посаду наймають нового співробітника, проводиться по мірі необхідності;
3. Подальше навчання: здійснюється систематично.

#### *ДР 1.1.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу*

Для забезпечення чистоти рук персоналу використовують мило господарське та мило туалетне.

#### *ДР 1.2. Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів*

##### *ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину Гембару*

У лабораторному приміщенні у емальованій переносній ємкості об'ємом 10 л готують робочий мийно-дезінфікувальний засіб Гембару концентрацією 0,25 %. Для цього змішують 100 мл 25% концентрату і 9,9 л питної води.

##### *ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину каустичної соди*

Необхідно приготувати 800 л робочого розчину каустичної соди концентрацією 2,0 %. У реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 1 м<sup>3</sup> об'ємно-ваговим дозатором вносять 16 кг каустичної соди і додають 784 л питної води. Для повного розчинення у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 55-60°C, і вмикають перемішуючий пристрій (100-500 об/хв).

#### *ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень*

##### *ДР 1.3.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень*

Один раз за зміну проводять миття підлоги, використовуючи робочий розчин Гембару (від ДР 1.2.1). Цим розчином протирають апаратуру ззовні і комунікації, змочують килимки при вході у всі приміщення. Виробництво триває 100 днів, тому необхідно забезпечитися альтернативним миючим засобом з іншою діючою речовиною. Через 2 місяці будемо використовувати Деконекс 50 ФФ.

### *ДР 1.3.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень*

Раз на місяць використовуючи робочий розчин Гембару (від ДР 1.2.1) проводять миття стін, вікон та дверей,. Протирають ззовні апаратуру і комунікації.

Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль (КУО < 800/см<sup>2</sup>).

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

#### *ДР 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій*

Для миття обладнання та комунікацій застосовують розчин каустичної соди у концентрації 2 % (від ДР. 1.2.2) підігрітого до температури 50-60 °С, а подаючи цей розчин від збірника (Р-1) за допомогою відцентрового насосу (Н-2) по комунікаціям до відповідних апаратів до заповнення 20% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Миття здійснюють протягом 1 год при ввімкненій мішалці. Відпрацьований розчин після миття йде на стадію знешкодження та утилізації (до ЗВ 7.1). Для ополіскування в апарати по комунікаціях подається питна вода до заповнення 50% об'єму апаратів, вмикають перемішуючий пристрій. Далі після зливу вода направляєється на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.1).

#### *ДР 1.4.2. Технічний огляд*

Після миття та ополіскування ємкісного обладнання проводять технічний огляд апаратів з метою виявлення можливих неущільнень та малих пошкоджень в комунікаціях та запірній арматурі. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань та місцеві налагоджувальні роботи.

#### *ДР 1.4.3. Перевірка на герметичність*

Закривають усю запірну арматуру, на ємкісному обладнанні, і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра та період витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не

перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. У протилежному випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа.

Тривалість операції становить 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

#### *ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання*

Для проведення процесу стерилізації в сорочку апарату подають пару і нагрівають сам апарат до температури 80–90 °С – це здійснюють для рівномірного нагрівання апарату. Далі відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарату комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат (через нижній спуск або барботер, в залежності від конструкції), при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні необхідної згідного регламенту температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення часу витримки парову арматуру закривають, подають безпосередньо в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску  $P = 0,003\text{--}0,005$  МПа. Охолодження здійснюють поступово для зменшення вірогідності деформації апарату.

### ***ДР 2. Підготовка азоту для культивування***

#### *ДР 2.1. Подача азоту*

Інертний газ подають від балонів (Б-3) через вентиль до очищувача балонних газів ЧГМ-06 (ОЧ-4). Ступінь очищення на данному етапу становить 95%.

### *ДР 2.2. Очищення газу в індивідуальному фільтрі*

Для очищення використовують індивідуальні фільтри, ступінь очищення яких становить 99,999 %, такі фільтри (Ф-6, Ф-11, Ф-17) встановлюють безпосередньо перед інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером (до ТП 5.4, 5.5, 6).

### **ДР 3. Стерилізація титруючих агентів**

#### *ДР 3.1. Стерилізація 25% водного розчину аміаку*

У збірник (Р-5) подають зі складу 25% водний розчин аміаку. Стерилізація титрувального агента відбувається у збірнику під тиском 0,15 МПа, температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль титруючого агента.

### **ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ**

*ДР 6.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках*

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 120 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 120 мл поживного середовища наведено в табл. 6.1.

*Таблиця 6.1*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 120 мл середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 120 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
панкреатичний гідролізат казеїну	30	3,6	I	100
сухе знежирене молоко	10	1,2		
лактоза	10	1,2		
глюкоза	5	0,6		
дріжджовий екстракт	5	0,6	II	20
натрій	5	0,6		

лимоннокислий				
натрій оцтовокислий	3	0,36		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	0,024		

*ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I*

На технічних вагах зважують 3,6 г панкреатичного гідролізату казеїну, 1,2 г сухого знежиреного молока, 1,2 г лактози, 0,6 г глюкози, 0,6 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 100 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

*ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах зважують 0,6 г натрію лимоннокислого, 0,36 г натрію оцтовокислого і 0,024 г кристалогідрату магній сульфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 50 мл, додають 20 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

*ДР 4.2. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в лабораторному інокуляторі об'ємом 4 л*

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 2,52 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 2,52 л поживного середовища наведено в табл. 6.2.

Для засіву поживного середовища в інокуляторі необхідно внести 120 мл рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композицій становить 2,4 л.

*Таблиця 6.2*

### Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,52 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,52 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
панкреатичний гідролізат казеїну	30	75,6	I	2000
сухе знежирене молоко	10	25,2		
лактоза	10	25,2		
глюкоза	5	12,6		
дріжджовий екстракт	5	12,6		
натрій лимоннокислий	5	12,6	II	400
натрій оцтовокислий	3	7,56		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	0,5		

#### *ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I*

На технічних вагах зважують 75,6 г панкреатичного гідролізату казеїну, 25,2 г сухого знежиреного молока, 25,2 г лактози, 12,6 г глюкози, 12,6 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 5 л, додають 2000 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

#### *ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах зважують 12,6 г натрію лимоннокислого, 7,56 г натрію оцтовокислого і 0,5 г кристалогідрату магній сульфату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 400 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

*ДР 4.3. Приготування поживного середовища для одержання інокуляту в посівному апараті об'ємом 80 л*

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 47,7 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 47,7 л поживного середовища наведено в табл. 6.3.

Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 2,52 л рідкого інокуляту, тому сумарна кількість води для композиції становить 41,1 л (так як стерилізація відбувається безпосередньо в ферментері, також враховують 10% конденсату).

*Таблиця 6.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 47,7 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 47,7 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
панкреатичний гідролізат казеїну	30	1431	I	35
сухе знежирене молоко	10	477		
лактоза	10	477		
глюкоза	5	238,5		
дріжджовий екстракт	5	238,5		
натрій лимоннокислий	5	238,5	II	6,1
натрій оцтовокислий	3	143,1		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	9,54		

*ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I*

На технічних вагах зважують 1431 г панкреатичного гідролізату казеїну, 477 г сухого знежиреного молока, 477 г лактози, 238,5 г глюкози, 238,5 г дріжджового екстракту і поміщають у збірник (Р-9) об'ємом 60 л. У цей же збірник (Р-9) за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 35 л

питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій. Приготовлену композицію за допомогою насосу (Н-10) подають у попередньо простерилізований посівний апарат (ФР-12).

Стерилізація композиції відбувається безпосередньо в посівному апараті (ФР-12) при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

#### *ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах зважують 238,5 г натрію лимоннокислого, 143,1 г натрію оцтовокислого і 9,54 г кристалогідрату магній сульфату. Наважки поміщають у збірник (Р-8) об'ємом 10 л, додають 6,1 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Стерилізація поживного середовища відбувається безпосередньо в збірнику (Р-8) під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

#### *ДР 4.4. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1600 л*

Для проведення стадії виробничого біосинтезу необхідно приготувати 992,2 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 992,2 л поживного середовища наведено в табл. 6.4.

Для засіву поживного середовища у ферментері необхідно внести 47,7 л рідкого інокуляту, тому сумарна кількість води для композиції становить 858,6 л (так як стерилізація відбувається безпосередньо в ферментері, також враховують 10% конденсату).

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 992,2 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 992,2 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
панкреатичний гідролізат казеїну	30	29,8	I	800
сухе знежирене молоко	10	9,9		
лактоза	10	9,9		
глюкоза	5	5		
дріжджовий екстракт	5	5		
натрій лимоннокислий	5	5	II	58,6
натрій оцтовокислий	3	3		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	198,44 г		

*ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції I*

За допомогою об'ємно-вагового дозатора у реактор (Р-13) об'ємом 1 м<sup>3</sup> вносять 29,8 кг панкреатичного гідролізату казеїну, 9,9 кг сухого знежиреного молока, 9,9 кг лактози, 5 кг глюкози, 5 кг та 800 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішувачий пристрій.

Приготовлену композицію за допомогою насоса (Н-14) подають у попередньо простерилізований ферментер (ФР-18).

Стерилізація композиції відбувається в ферментері (ФР-18) при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

*ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції II*

На технічних вагах зважують 5 кг натрію лимоннокислого, 3 кг натрію оцтовокислого і 198,4 г кристалогідрату магній сульфату. Наважки

поміщають у збірник (Р-15) об'ємом 80 л, додають 58,6 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника (Р-15) подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішуючий пристрій.

Стерилізація поживного середовища відбувається безпосередньо в збірнику (Р-15) під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

### ***ТП 5. Підготовка посівного матеріалу***

#### *ТП 5.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *L. acidophilus* В-7174 зберігають у пробірках зі скошеним MRS середовищі у холодильнику при температурі 4 °С. Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Усі роботи за колекційною культурою проходять строго в асептичних умовах.

#### *ТП 5.2. Одержання робочої культури *Lactobacillus acidophilus* В-7174 на агаризованому середовищі*

Робочу культуру штаму-продуцента отримують розсівами колекційної культури на чашки Петрі глибинним способом із агаризованим MRS середовищем в асептичних умовах. Культуру на чашці Петрі вирощують при температурі 37°C протягом 24 год.

Ізольовані колонії в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем. Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Для пересіву використовують колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 24 год при температурі 37°C.

#### *ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

У колбу об'ємом 200 мл із 100 мл розчину композиції I (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах вносять 20 мл розчину композиції II (від ДР 4.1.2). Розчин перемішують і розливають по 120 мл в одну стерильну качалочну колбу об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою культурою *L. acidophilus* В-7174, вирощену на MRS середовищі, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці при 37°C упродовж 24 год. Під час культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

*ТП 5.4 Вирощування посівного матеріалу в лабораторному інокуляторі об'ємом 4 л*

В інокулятор (ФР-7), об'ємом 4 л через засівну колбу вносять 2 л композиції I (ДР 4.2.1) та 0,4 л композиції II (ДР 4.2.2). Включають перемішувачий пристрій, зі збірника подають стерильний 25%-ий водний розчин аміаку (ДР 3.1) до досягнення рівня рН 6,7. Після досягнення необхідного значення рН мішалку вимикають.

Далі за допомогою засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 5.3). У рубашку інокулятора подають пару. Культивування здійснюють при температурі 39 °С впродовж 4 год.

*ТП 5.5 Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 80 л*

У посівний апарат (ФР-12), об'ємом 80 л, з простерилізаованою композицією I (ДР 4.3.1) самоплином вносять композицію II (ДР 4.3.2). Включають перемішувачий пристрій, зі збірника (Р-5) подають стерильний 25%-ий водний розчин аміаку (ДР 3.1) до досягнення рівня рН 6,7. Після досягнення необхідного значення рН мішалку вимикають.

Далі за допомогою труби перетискування з інокулятора (ФР-7) подають посівний матеріал (від ТП 5.4). У рубашку посівного апарату (ФР-12)

подають пару. Культивування здійснюють при температурі 39 °С впродовж 4 год.

### ***ТП 6. Біосинтез***

У ферментер (ФР-18) об'ємом 1600 л з композицією I (ДР 4.4.1) зі збірника за допомогою насосу (Н-16) подають композицію II (ДР 4.4.2). Включають перемішуючий пристрій, зі збірника (Р-5) подають стерильний 25%-ий водний розчин аміаку (ДР 3.1) до досягнення рівня рН 6,7. Після досягнення необхідного значення рН мішалку вимикають. Далі з посівного апарату (ФР-12) перекачують за допомогою труби перетискування посівний матеріал (від ТП 5.5) у ферментер (ФР-18). У рубашку ферментера (ФР-18) подають пару. Біосинтез здійснюють при температурі 39 °С впродовж 8 год.

У процесі культивування, кожні 4 год, відбирають проби для здійснення мікробіологічного контролю та контролю показників росту.

### ***ЗВ 7. Знешкодження відходів***

#### ***ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів***

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів від етапів ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1 йдуть на очисні споруди.

#### ***ЗВ 7.2. Знешкодження повітряних відходів***

Відпрацьоване повітря, що надходить з посівного апарату та ферментеру (від ТП 5.4, 5.5, ТП 6) відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Таблиця 7.1

### 7.1. Карта постадійного контролю біосинтезу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Підготовка робочого розчину Гембару	Концентрація робочого розчину Гембару	Хімічний метод	Після приготування робочого розчину	$C = 0,25 \%$
Кх 1.1.2 Підготовка робочого розчину каустичної соди	Концентрація робочого розчину каустичної соди	Хімічний метод	Після приготування робочого розчину	$C = 2\%$
Км 1.2.1. Щоденне прибирання	Підлога, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Км 1.2.2. Генеральне прибирання	Підлога, стіни, вікна, двері, чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний метод	Під час прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, $KУО < 800/см^2$

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій	Мийний розчин, обладнання, температура робочого розчину, тривалість, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	$t = 50-60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 60 \text{ хв}$ , чисте обладнання
Кт 1.3.2. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, перепад тиску	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,1-0,2 \text{ МПа}$ , $\tau = 30-60 \text{ хв}$ , $\Delta P < 0,01 \text{ МПа}$
Кт 1.3.4. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, надлишковий тиск визначають після проведення стерилізації	$P=0,15 \text{ МПа}$ ( $t = 130-135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), $\tau = 1 \text{ год}$ , $P = 0,003-0,005 \text{ МПа}$
Кт 2.1. Подача азоту	Газ на виході з балону, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту	Після подачі газу з балонів	$E = 95 \%$
Кт 2.2. Очищення газу в індивідуальному фільтрі	Газ на виході з індивідуального фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки газу в індивідуальному фільтрі	$E = 99,999 \%$ , тиск згідно паспорту

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.1. Стерилізація 25% водного розчину аміаку	Розчин аміаку, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$P=0,15$ МПа ( $t = 131$ °С), $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$t = 112$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$P=0,15$ МПа ( $t = 131$ °С), $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$t = 112$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$P=0,15$ МПа ( $t = 131$ °С), $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$P=0,15\text{ МПа}$ ( $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), $\tau = 40\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції I	Композиція I, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції II	Композиція II, тиск, час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається під час стерилізації, мікробіологічний контроль після	$P=0,15\text{ МПа}$ ( $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), $\tau = 40\text{ хв}$ , відсутність мікробіоти

Закінчення табл. 7.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.3. Вирощування інокуляти в колбах на качалках	Посівний матеріал, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 37^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.4. Вирощування інокуляту в лабораторному інокуляторі об'ємом 4 л	Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 2 год	$\text{pH} = 6,7$ , $t = 39^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 4$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 5.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 80 л	Посівний матеріал, рН, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту в посівному апараті і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 2 год	$\text{pH} = 6,7$ , $t = 39^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 4$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 6. Виробничий біосинтез	Культуральна рідина, рН, температура, швидкість перемішування, тривалість культивування, мікробіологічна чистота	Датчик рН та температури, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в ферментері і в кінці процесу. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	$\text{pH} = 6,7$ , $t = 39^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 8$ год, відсутність сторонньої мікробіоти

## **7.2. Мікробіологічний контроль**

Здійснення мікробіологічного контролю відбувається шляхом розсіву, відібраної на певних етапах процесу біосинтезу, культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами та подальшим мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають за допомогою петлі методом виснажувальних штрихів до ізольованих колоній. Посів здійснюють на чашки Петрі з різним агаризованим середовищем:

- м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій;
- сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар (ГКА) використовують для виявлення дріжджів та грибів [19].

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препаратів «роздавлена крапля». Препарат готують на попередньо знежиреному предметному склі, наносять на скло маленьку краплю культуральної рідини, після її накривають накривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом 40x без імерсійної системи та 90x з імерсійною системою. Наявність інших клітин, які будуть відрізнятися за формою та розмірами, може свідчити про наявність сторонньої мікробіоти. Саме мікроскопіювання використовують як експрес метод визначення наявності сторонніх мікроорганізмів.

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

### **7.3.1. Визначення кількості життєздатних клітин**

Так як наш продукт це закваска, нам необхідні саме життєздатні клітини продуцента. Для цього будемо застосовувати люмінесцентну мікроскопію, яка дозволяє вивчати клітини в живому стані і отримувати висококонтрастні кольорові зображення мікроорганізмів.

Суть явища люмінесценції полягає в тому, що певні молекули структурних елементів клітини (наприклад, пігменти, вітаміни, алкалоїди та ін.) здатні поглинати частину енергії падаючого світла певної заданої довжини хвилі, переходити в електронно-збуджений стан і випромінювати у відповідь світло з іншою довжиною хвилі. Джерелом збудження можуть бути

ультрафіолетові промені (300-400 нм) і видиме світло короткохвильової області спектра (400-460 нм).

Усім живим клітинам властива флуоресценція, яка має назву власної, або первинної. Вона є слабкою і тому частіше використовують так звану вторинну флуоресценцію, коли об'єкти попередньо обробляють спеціальними люмінесцентними барвниками - флуорохромами (акридиновий оранжевий, корифосфін О, тіазиновий червоний, ізотіоціанат флуоресцина та інш.). Промені світла від сильного джерела (зазвичай, ртутієвої лампи надвисокого тиску) пропускають через синьо-фіолетовий світлофільтр. Під дією цього короткохвильового випромінювання фарбовані флуорохромом клітини починають випромінювати червоне або зелене світло. Для того, щоб синє світло, яке викликає люмінесценцію, не заважало дослідженню, над окуляром виставляють блокуючий жовтий світлофільтр, який затримує сині, але пропускає жовті, червоні та зелені промені. Як наслідок, при спостереженні у люмінесцентному мікроскопі на темному фоні будуть спостерігатися клітини, що світяться жовтим, зеленим або червоним кольором[27].

### **7.3.2. Визначення концентрації біомаси**

Біомасу визначають за допомогою непрямого методу. За оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

Суть методу – вимірювання інтенсивності світла при проходженні його через суспензію мікроорганізмів. Клітини поглинають і розсіюють світло, при чому інтенсивність цих процесів залежить від кількості клітин і їх розмірів.

Методика визначення: відбирають проби культуральної рідини по 10 мл. За допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра вимірюють зміну інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин, обираючи певну довжину хвилі (зазвичай в інтервалі 540-650 нм), за

якої поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. Іноді відбувається вторинне розсіювання світла – це відбувається за високих концентрацій клітин в культуральній рідині, що призводить до отримання недостовірних результатів. Тому у разі високої концентрації клітин суспензію перед вимірюванням необхідно розводити водою. Розведення проб однієї і тієї ж культури різними рідинами неприпустимо, тому що набухання і стиснення клітин впливає на величину світлорозсіювання. Для побудови калібрувальної кривої вимірюють величину світлорозсіювання суспензій з різним вмістом клітин з певним кроком розведення і в кожній з них визначають кількість клітин або біомасу одним із застосовуваних методів. Отриману залежність виражають графічно у вигляді графіку, відкладаючи на осі ординат значення ФЕК, а на осі абсцис – кількість клітин, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л. Для кожного мікроорганізму слід будувати свою власну калібровану криву [28].

### **7.3.3. Визначення концентрації джерел вуглецю і азоту**

#### *Визначення концентрації джерела вуглецю*

Джерелом вуглецю в поживному середовищі є панкреатичний гідролізат казеїну та глюкоза. За допомогою глюкозооксидазного методу визначають глюкозу.

Принцип методу полягає в тому, що глюкоза в присутності певного ферменту (глюкозооксидази) окислюється киснем з утворенням перекису водню ( $H_2O_2$ ). Перекис водню в присутності пероксидази окислює ортотолідин з утворенням забарвленої сполуки, інтенсивність забарвлення якої пропорційна вмісту глюкози.

Методика визначення. Через пробовідбірник відбирають пробу культуральної рідини в певні етапи процесу біосинтезу. У пробірки для центрифуги вносять 1,1 мл розчину хлориду натрію, 0,4 мл розчину сульфату цинку і 0,4 мл 0,3 н розчину гідроксиду натрію, і перемішують. Далі вносять

0,1 мл відібраної культуральної рідини або калібрувального розчину, знову перемішують і через 10 хв центрифугують при швидкості 3000 об/хв протягом 10 хв.

Робочий реактив: у 80 мл ацетатного буфера додають 2 мг глюкозооксидази та 1 мг пероксидази, далі додають 1 мл 1%-ного розчину ортотолідину, перемішують і доводять об'єм до 100 мл буферним розчином.

До 1 мл надосадової рідини додають 3 мл робочого свідоприготованого реактиву і обережно перемішують. Поступово починає з'являтися забарвлення, яке при типовій кімнатній температурі досягає максимуму інтенсивності через 13-15 хв, а потім поступово зменшується. Фотометрують в кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см з червоним світлофільтром (довжина хвилі 625 нм) проти контролю, який ставлять одночасно з робочими пробами, але замість культуральної рідини використовують фізіологічний розчин хлориду натрію. При приготуванні калібрувального графіка замість проб досліджуваного розчину беруть 0,1 мл відповідного калібрувального розчину.

Розрахунок можна проводити за правилом пропорцій або за калібрувальним графіком, для побудови якого на одній осі відкладають концентрацію глюкози (ммоль/л), а на іншій – величину екстинкції [29].

#### *Визначення концентрації джерела азоту*

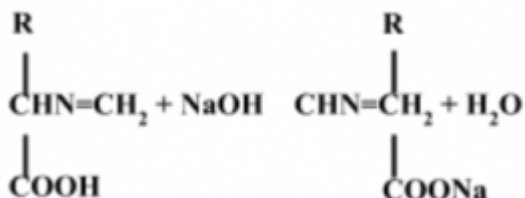
Джерелом азоту в середовищі є панкреатичний гідролізат казеїну, дріжджовий автолізат, цистеїн та амоній лимоннокислий.

Для визначення азоту амінокислот (які містяться у дріжджовому автолізаті, панкреатичному гідролізаті казеїну та цистеїні) використовуємо метод формольного титрування (або титрування по Серенсену).

Принцип методу ґрунтується на здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот:



При цій реакції аміногрупи втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу (гідроксиду натрію):



Під час реакції з формаліном утворювана метиламінокислота відтитровується 0,1 н розчином гідроксиду натрію. За кількістю витраченого на титрування лугу визначають кількість карбоксильних груп. Зазвичай число карбоксильних груп в амінокислотах приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для моноамінокислот, для діамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Методика визначення. До 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 9 мл води (рН кінцевого розчину має становити 7,0). При необхідності розчин нейтралізують (використовують 0,1 М розчин гідроксиду натрію або 0,1 М розчин хлоридної кислоти). Після закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду, перемішують і титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно титрують розчин, що замість культуральної рідини містить з дистильовану воду – контрольний дослід. Для розрахунку – 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту [30].

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Скроцька О.І., Кігель Н.Ф. Харчова біотехнологія: підручник – К: Видавництво Ліра-К, 2016. – 408 с.
2. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://molokija.com/directory/26>
3. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://milkua.info/uk/post/virobnictvo-molocnih-produktiv-u-2016-roci>
4. Квасников, Е. И. Молочнокислые бактерии и их использование / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко // М.: Наука, 2003. – С.23, 290–359.
5. Пат 91417. Штам бактерій *Lactobacillus acidophilus*, що використовується у виробництві заквашувальних культур для сичужних сирів // Шульга Н. М., Кігель Н. Ф. – Опубл. 26.07.2010.
6. Пат 105133 Склад йогурту // Кійко В. В., Курган Т. М., Курпілянська К. В. – Опубл. 10.03.2016.
7. Пат 104140 Функціональний кисломолочний напій // Курпілянська К. В., Арсеньєва Л. Ю. – Опубл. 12.01.2016.
8. *Linares D.M., Gómez C., Renes E., Fresno J.M., Tornadijo M.E., Ross R.P., Stanton C. Lactic acid bacteria and Bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods // Front Microbiol. – Vol. 8, Article 846. – 2017.*
9. Конспект лекцій до «Загальні технології харчової промисловості» / За авторством к.т.н., доц. Рибак О.М. – Тернопіль: 2014. – 98 с.
10. Пат 92287. Штам бактерій *Streptococcus thermophilus*, що використовується у виробництві бактеріальних концентратів для кисломолочних продуктів // Кігель Н. Ф., Науменко О. В., Рожанська О. М., Пасічнюк Є. Л. – Опубл. 11.10.2010
11. Определитель бактерий Берги. – 9-е изд. / Пер. под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2. – 800 с.
12. Illegheems K, De Vuyst L, Weckx S. Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* 222 and

- Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes. BMC Genomics. 2015;16:766.
13. *de Ridder D., Kroese F., Evers C., Adriaanse M., Gillebaart M.* Healthy diet: Health impact, prevalence, correlates, and interventions // Psychol Health. 2017 Aug;32(8):907-941. doi: 10.1080/08870446.2017.1316849.
14. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.healthline.com/nutrition/lactobacillus-acidophilus#section10>
15. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://3md.com.ua/about/news/atsidof%D1%96l%D1%96n-prirodnii-ts%D1%96litel>
16. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.unn.com.ua/uk/news/1762300-tsukroviy-diabet-v-ukrayini-epidemiya-bez-likiv-i-diagnoziv>
17. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.likar.info/endokrinologiya/article-78576-kak-pit-moloko-pri-diabete-rekomendatsii-vrachej/>
18. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.zakvaski.com/production/acidolakt-vivo.html>
19. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
20. *Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П.* Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування. Львів: «Інтелект-Захід», 2008. – 736 с.
21. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-1000-5000l/>
22. *Карлаш Ю.В.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Уклад.: Ю.В.Карлаш – К: НУХТ, 2013. – 143 с.

23. Міністерство охорони здоров'я [Електронний ресурс] // Методичні вказівки. – Режим доступу: [http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn\\_20011214\\_502.html](http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20011214_502.html)
24. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://farmakos.ua/bimoj.html>
25. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html>
26. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.neosepticaspb.com/catalog/dezinfekcziya-instrumentov/deconex-50-ff>
27. Люминесцентный метод микроскопии. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://microbiology.ucoz.org/index/ljuminiscentnaja\\_mikroskopija/0-23](http://microbiology.ucoz.org/index/ljuminiscentnaja_mikroskopija/0-23)
28. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія: Підручник. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ., 2010. – 632 с
29. *Карпищенко А.И., Алексеев В.В., Алипов А.Н.* Медицинские лабораторные технологии. Рук-во по клинической лабораторной диагностике. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 472 с.
30. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації «Фармацевтична хімія. Аналіз препаратів біотехнологічного виробництва» / За загальною редакцією професора В.А. Георгіянц. – Харків: 2013. – 215 с.