

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГРІНА Анастасія Сергіївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Leuconostoc mesenteroides* як компонента заквашувальної композиції для виробництва сиру

керівник роботи ГРЕГІРЧАК Наталія Миколаївна, к.т.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Leuconostoc mesenteroides* CMG713; цільовий продукт: суха біомаса, як компонент заквашувальної композиції; об'єм ферментера: 1 м³; коефіцієнт заповнення ферментера: 0,6.

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

1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 – 1 аркуш формату А1

Технологічна схема післяферментаційні етапи виділення сухої біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG 713 – 1 аркуш формату А4

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 – 11.03.24	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	12.03.24 – 18.03.24	
3	Техніко-економічне обґрунтування	19.03.24 – 25.03.24	
4	Біосинтез цільового продукту	26.03.24 – 01.04.24	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.24 – 08.04.24	
6	Специфікація обладнання	09.04.24 – 15.04.24	
7	Опис технологічної схеми	16.04.24 – 22.04.24	
8	Контроль виробництва	23.04.24 – 29.04.24	
9	Охорона довкілля	30.04.24 – 06.05.24	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	07.05.24 – 16.05.24	
11	Оформлення графічної частини	17.05.24 – 28.05.24	

Здобувач _____
(підпис)

Анастасія ГІРІНА _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Наталія ГРЕГІРЧАК _____
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	10
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	20
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	20
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	25
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	27
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	30
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	31
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	31
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	33
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.....	34
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	35
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	39
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	39
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	41
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	48
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	48
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	51
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	53
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	65
5.4.1 Підготовка та стерилізації підживлювального розчину сахарози.....	65
5.4.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	66
5.4.3. Підготовка і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	67

5.4.4. Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м ³	70
5.4.5. Підготовка і стерилізація розчинів для регуляції рН.....	71
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	73
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.....	77
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	90
8.1. Карта постадійного контролю.....	90
8.2. Мікробіологічний контроль.....	96
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	99
8.3.1. Концентрація біомаси.....	99
8.3.2. Концентрація цільового продукту.....	101
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	103
8.4. Показники якості готового продукту.....	106
РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля.....	114
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	114
9.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	116
9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	116
9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	120
9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	125
9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	126
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	128
ДОДАТКИ.....	139

РЕФЕРАТ

Робота присвячена проектуванню виробництва сухої біомаси молочнокислих бактерій *Leuconostoc mesenteroides* SMG713, що є компонентом заквашувальної композиції для виробництва твердого сиру. Розрахована потужність спроектованого підприємства становить 480 кг сухої біомаси на рік, що покриває 30% від загальної потреби українського ринку.

Технологія виробництва складається з допоміжних робіт, таких як: санітарна підготовка підприємства (підготовка персоналу, підготовка мийних та дезінфікуючих розчинів, санітарна підготовка обладнання та комунікацій), підготовка аераційного повітря, підготовка та стерилізація титрувальних агентів, підготовка та стерилізація 40%-го підживлювального розчину сахарози, підготовка та стерилізація поживного середовища; а також технологічного процесу: вирощування інокуляту у три стадії (у 5-ти колбах на качалках, інокуляторах об'ємом 15 л та 100 л) та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³. Розроблено технологічну та апаратурну схеми згідно з наведеними стадіями. Також розроблено карту контрольних точок доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу біомаси *Leuconostoc mesenteroides* SMG713 та зазначенно відповідні методики визначення концентрації біомаси, вмісту джерела вуглецевого та азотного живлення та мікробіологічного контролю.

Кваліфікаційна робота викладена на 139 сторінках, містить 12 рисунків, 15 таблиць, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (114 найменувань), технологічних (формат А1, 1 аркуш; формат А4, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: *Leuconostoc mesenteroides* SMG713, молочнокислі бактерії, заквашувальна композиція, суха закваска, біомаса, виробничий біосинтез.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the design of the production of dry biomass of lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, which is a component of the starter composition for the production of hard cheese. The calculated capacity of the enterprise is 480 kg of dry biomass per year, which covers 30% of the total demand of the Ukrainian market.

The production technology consists of auxiliary works, such as: sanitary preparation of the enterprise (personnel training, preparation of cleaning and disinfectant solutions, sanitary preparation of equipment and communications), preparation of aeration air, preparation and sterilisation of titration agents, preparation and sterilisation of 40% sucrose feed solution, preparation and sterilisation of the culture medium; and the technological process: inoculum cultivation in three stages (in 5 flasks on rockers, in 15-litre and 100-litre inoculators) and production biosynthesis in a 1-m³ fermenter. The technological and hardware schemes were developed in accordance with the above stages. A map of control points for pre-fermentation processes and production biosynthesis of *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 biomass was also developed, as well as appropriate methods for determining the biomass concentration, carbon and nitrogen nutrition source content, and microbiological control.

The qualification work is set out on 139 pages, contains 12 figures, 15 tables, consists of an introduction, nine chapters, a list of references (114 items), technological (A1 format, 1 sheet) and hardware (A1 format, 1 sheet of diagrams; A4 format, 1 sheet) diagrams.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, lactic acid bacteria, starter composition, dry starter, biomass, production biosynthesis.

ВСТУП

На сьогоднішній день молочна промисловість України є одним з провідних підкомплексів агропромислового комплексу країни, значну частину якого займає виробництво твердого сиру. Вироблена продукція задовольняє потреби населення[1], адже за рекомендацією МОЗ України річна норма споживання молока і молочних продуктів (у перерахунку на молоко) становить 390 кг на людину, з них 6,5 кг твердого сиру, що становить 13,5 % від загального споживання молока[2]. Користь твердого сиру важко переоцінити, адже в готовому продукті міститься велика кількість поживних речовин, таких як ліпіди, амінокислоти, вітаміни, а також білки, які в складі сиру засвоюються набагато краще організмом людини, ніж у складі молока. Вживання твердого сиру створює загальний позитивний вплив на організм людини, активізуючи імунну систему, відновлюючи м'язову тканину, зміцнюючи кісткову тканину, покращуючи зір, шкіру та волосся людини. Саме тому важливо вживати достатню кількість молочних продуктів, зокрема твердого сиру в своєму раціоні[3].

Одним з основних компонентів для виготовлення сиру є бактеріальна закваска. Проаналізувавши сучасний український ринок заквасок для виготовлення твердих сирів ми дійшли висновку, що весь представлений асортимент, в більшості є імпортованим закордонними виробниками. Найбільшу частину українського ринку займають закваски компаній Chr. Hansen, Dalton, Danisco та Sacco System. Дані показники не є позитивними, адже свідчать про недостатній рівень розвитку вітчизняної промисловості з виготовлення сухих бактеріальних заквасок та компонентів заквашувальних композицій для твердого сиру.

На сьогоднішній день проектування та розвиток власних підприємств з виробництва сухої бактеріальної закваски є актуальним враховуючи можливість виведення якісної української продукції на український та світовий ринки, що значно зменшить імпортозалежність України та збільшить її

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	ВСТУП					
<i>Розроб.</i>		<i>Гіріна А.С.</i>						<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>							<i>в</i>	<i>2</i>
<i>Консульт.</i>								Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>										
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

конкурентоспроможність на світовому ринку в галузі харчової промисловості. А також це надзвичайно важливо з точки зору можливості збільшення кількості робочих місць, що в перспективі покращить економіку країни та в цілому позитивно вплине на благополуччя нації[4].

В свою чергу, проаналізувавши потреби українських споживачів молочної продукції та слідкуючи за актуальними тенденціями, через які покупці надають перевагу певним харчовим продуктам, можна побачити, що на сьогоднішній день все більше споживачів надають перевагу харчовим продуктам з меншою кількістю харчових добавок. Відповідно до цього виробники намагаються мінімізувати використання синтетичних добавок у власній продукції. Отже, враховуючи це необхідно створювати готовий продукт з мінімальною кількістю стабілізаторів, барвників та інших харчових добавок[5].

Leuconostoc mesenteroides CMG713 – є перспективним штамом, який може використовуватись як компонент заквашувальної композиції для виготовлення сирів Голландської групи. Даний штам характеризується підвищеною здатністю до синтезу біомаси й декстрану[6]. Окрім цього *Leuconostoc mesenteroides* може входити до складу заквасок для виробництва м'яких, напівтвердих та твердих сирів. Перевагою використання даного штаму як компонента заквашувальної композиції є його підвищена здатність до синтезу екзополісахариду – декстрану, який слугує природнім згущувачем та стабілізатором при виробництві молочних продуктів, що дає змогу зменшити кількість хімічних стабілізаторів, тим самим збільшивши прихильність споживачів. Також екзополісахарид позитивно впливає на структуру та органолептичні властивості готового продукту[7].

Новизною даної роботи є використання як біологічного агенту штаму молочнокислих бактерій *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, який характеризується швидшим та більшим накопиченням біомаси, що може знизити витрати на виробництво та збільшити його обсяги, а також здатність даного штаму до підвищеного синтезу екзополісахариду – декстрану, що виступає стабілізатором у молочних продуктах, та в перспективі може зменшити кількість використаних синтетичних харчових добавок у готовому продукті.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Цільовим продуктом виробничого біосинтезу є біомаса молочнокислих бактерій *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, здатних до підвищеного синтезу екзополісахариду декстрану, що використовується у складі сухих заквасок для виробництва сиру.

Бактерії роду *Leuconostoc* широко розповсюджені у природі, наприклад у воді чи ґрунті, а також часто зустрічаються у ферментованих молочних продуктах. Рід *Leuconostoc* відноситься до гетероферментативних молочнокислих бактерій, типовим представником якого є вид *Leuconostoc mesenteroides*. *L. mesenteroides* є мезофільними мікроорганізмами, з оптимальною температурою культивування 22 – 30 °С та нейтральним значенням рН.[8] *L. mesenteroides* є факультативним анаеробом[9]. Також бактерії даного виду відносять до грампозитивних бактерій, які мають сферичну, дещо витягнуту форму клітин, розміром 0,5-0,7 x 0,7-1,2 мкм. Вони є нерухомими, а також не утворюють спори. Зазвичай, клітини *Leuconostoc mesenteroides* розміщуються на поживному середовищі довгими ланцюгами з клітин. Однак, залежно від умов культивування клітини можуть розташовуватись попарно, або подвійними ланцюгами [10]. Умови культивування, а саме склад і консистенція поживних середовищ, значною мірою можуть впливати на морфологію клітин *Leuconostoc mesenteroides*. При культивуванні на молоці, або на поживному середовищі з додаванням молока клітини будуть мати кокоподібну форму і будуть вишиковуватись в ланцюжки. Саме з такою морфологією клітини зустрічаються в заквасках для виробництва молочних продуктів (рис.1.1). Якщо ж проводити культивування в бульйоні – клітини можуть подовжуватись і навіть можуть набувати вигляду паличок[8]

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата			
Розроб.		Гіріна А.С.			Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Грегірчак Н.М.				10	10
Консульт.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

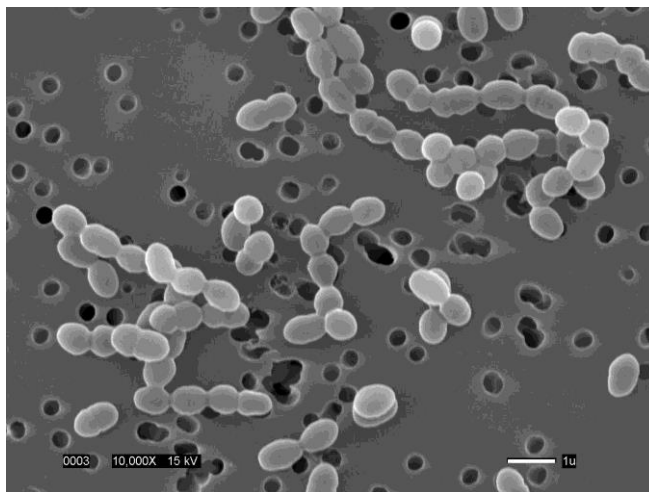


Рис 1.1. *Leuconostoc mesenteroides*: форма клітин під електронним мікроскопом, збільшення $\times 10000$ [11]

Однією з ключових особливостей, яка відрізняє *Leuconostoc mesenteroides* від інших бактерій цього роду – є те, що *Leuconostoc mesenteroides* є продуцентом декстрану. В останні роки декстран, як і інші екзополісахариди бактеріального походження, в особливості серед продуктів метаболізму молочнокислих бактерій, стали об'єктом підвищеної уваги, обговорень та досліджень, що призвело до їх активнішого використання у різних галузях, особливо підвищення використання екзополісахаридів спостерігається у харчовій промисловості. Бактеріальні екзополісахариди мають унікальні фізико-хімічні, біологічні та функціональні властивості, завдяки яким здатні змінювати реологічні властивості готового молочного продукту, там самим підвищуючи його стійкість, покращуючи смак та текстуру. Також вони здатні виступати у ролі стабілізаторів та консервантів, що особливо цінуються споживачами у сучасному світі, де все частіше обирають продукти з меншою кількістю харчових добавок, а виробники намагаються мінімізувати використання синтетичних добавок. Також поширюється використання бактеріальних екзополісахаридів, або молочнокислих бактерій у складі заквашувальної культури, здатних до синтезу екзополісахариду, у тих країнах, де надто жорстко регламентується використання харчових добавок[5].

Декстран — це екзополісахарид, який синтезується молочнокислими бактеріями або їх ферментами в присутності сахарози[9]. Відповідно до якісного складу декстран відносять до гомоекзополісахаридів, що складаються з моносахаридів одного типу[5]. Це складний α -глюкан, утворений головним ланцюгом d-глюкоз, з'єднаних α -(1 \rightarrow 6) зв'язками з можливими гілками d-глюкоз з

α -(1→4), α -(1→3), α -(1→2) зв'язками (рис.1.2.). В залежності від штаму бактерій та умов культивування утворюється велика кількість різних варіацій молекул з різною молекулярною масою, типом зв'язків і видом їх розгалужень. Також на кількість розгалуджень та молекулярну масу впливає температура, при якій відбувається культивування бактерій. При культивуванні, яке відбувається при температурі більшою за 25 °С виробляється декстран з більшою кількістю розгалужень, а якщо при температурі нижчою за 25 °С, відповідно, виробляється декстран з більшою молекулярною масою. Однак, декстрини синтезовані штамами *L.mesenteroides* мають лише α -(1→6) і α -(1→3) зв'язки з відсотковим вмістом від 52% до 97% і від 3% до 48 % відповідно. Декстрини поділяються на дві категорії, в залежності від довжини ланцюгів та їх молекулярної маси: з молекулярною масою понад 40 кДа – просто декстрини, а з молекулярною масою до 40 кДа – олігодекстрини[12].

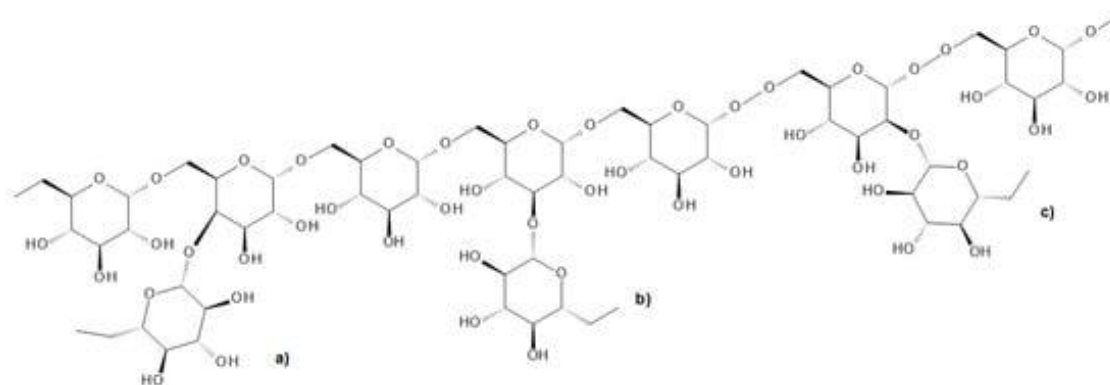


Рис.1.2. Структурна формула декстрану. Основний ланцюг утворений одиницями d-глюкози з α -(1→6) зв'язками; розгалудження: а) α -(1→4), б) α -(1→3), в) α -(1→2)[13].

Якщо виділити декстран, він є гігроскопічною твердою речовина білого кольору, при високій молекулярній масі може утворювати кристали. Так як декстран – це полісахарид, який може мати різну молекулярну масу та хімічну структуру, то і температура плавлення у різних випадках буде відрізнятись. В загальному, декстран плавиться при високих температурах, а точка плавлення становить більше 254°С [13].

За своєю структурою декстран існує у вигляді спіралі, що розширюється, у розчині, головним чином завдяки гнучкому α (1,6)-глікозидному зв'язку (рис.1.3.).

Декстран має високу розчинність у воді та багатьох органічних розчинниках, таких як: метилсульфоксид, формаїд, етиленгліколь, гліцерин, 4-метилморфолін-4-оксид і гексаметилфосфорамід [14].

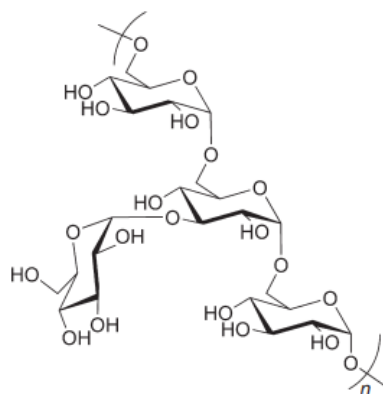


Рис 1.3. Хімічна структура декстрану[14].

Розчинність декстрану обумовлена тим, що він у своїй структурі має більше α -(1,6)-зв'язків, які надають йому такої властивості, на відміну від α (1,3)-зв'язків, адже чим більше α -(1,6)-зв'язків у молекулі, тим краще вона розчиняється у воді. При розчиненні у воді декстриани утворюють колоїдні розчини. Також декстран має низьку антигенність і високу біологічну стабільність, що дозволяє йому зберігати свої властивості та ефективність протягом тривалого часу, не піддаючись дії навколишнього середовища, чи системи, в якій він знаходиться[15].

В'язкість декстрану безпосередньо залежить від його молекулярної маси: чим більша молекулярна маса – тим більша в'язкість, що пов'язано з –ОН групами, які легко взаємодіють з іншими молекулами за допомогою водневих зв'язків. Також в'язкість декстрану пов'язана з його концентрацією: при малих концентраціях він утворює ньютонівську рідину, при високих концентраціях – неньютонівську[14].

Саме через структуру та фізико-хімічні властивості декстрану він знайшов широке застосування в різних сферах, таких як: медицина, фармацевтична промисловість, лабораторні дослідження, косметологія, харчова промисловість, навіть фотоіндустрія та інші[16]. У всіх сферах декстран використовують з різною метою і, безсумнівно, його використання в даних сферах є надзвичайно важливим, однак, в даній роботі ми детально розглянемо саме використання молочнокислих

бактерій, здатних до синтезу екзополісахариду, що використовуються у складі заквасок. На сьогоднішній день використання таких культур, як *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 в складі заквасок для виробництва сиру, чи інших молочних та кисломолочних продуктів стає надзвичайно важливим та необхідним, враховуючи сучасні тенденції розвитку біотехнології, харчової промисловості та, відповідно до цього, запитів споживачів. Виробники використовують такі штами молочнокислих бактерій, зазвичай в складі комбінованої закваски, для поліпшення текстури, реології та функціональності продукту, для підвищення виходу готової продукції. Особливо широко такі культури використовують в заквасках для виготовлення йогуртів та твердого сиру. Показники йогурту, у складі закваски якого використовують молочнокислі бактерії, здатні до синтезу екзополісахариду – декстарну, характеризуються більшою клейкістю та в'язкістю текстури продукту, а також кращими показниками аромату та смаку. Також проводячи мікроспопівування текстури за допомогою електронного мікроскопу було виявлено, що мікротекстура йогурту є компактнішою, що додатково підтверджує позитивний вплив молочнокислих бактерій, здатних до синтезу екзополісахариду, у складі закваски[7].

Використання *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, що характеризується підвищеною здатністю до синтезу біомаси та екзополісахариду, у сухих заквасках для виробництва сиру, також має ряд позитивних властивостей для готового продукту: покращення органолептичних властивостей сиру, покращення утримання вологи, за рахунок водозв'язуючих властивостей екзополісахариду, що збільшує масову частку вологи в продукті, покращення зберігання та смакових якостей, аромату і зовнішнього вигляду сиру, а також покращується структура сиру та підвищується вихід готового продукту[5, 17].

Отже, використання молочнокислих бактерій, здатних до синтезу екзополісахаридів, у складі заквасок, має позитивні наслідки, ключовими з яких є: покращення властивостей готового продукту, можливість знизити кількість харчових добавок у складі продукту, замінивши їх на декстран, що синтезується бактеріями, тим самим завоювавши більшу прихильність споживачів, що також є вигідним з економічної точки зору.

Молочнокислі бактерії роду *Leuconostoc* використовують у заквасках для виробництва сиру. Такі закваски дають змогу легко приготувати сир з приємним смаком, ароматом та текстурою, а також підходять як для домашнього виробництва сиру, так і для виробництва у великих промислових масштабах. Їх можна придбати у вільному доступі та у необмеженій кількості. *Leuconostoc mesenteroides* використовують у заквасках для виготовлення твердих сирів голландської групи, таких як: Голландський, Едам, чи Гауда, а також для м'яких сирів із різного молока: Альметте, чи козячий Шевре.

Бактеріальні закваски складаються з різних видів і штамів молочнокислих бактерій, які використовуються під час виробництва сирів та інших кисломолочних продуктів. Наприклад, до заквасок для виготовлення твердих сирів голландської групи, до яких входять бактерії *Leuconostoc mesenteroides*, які приймають участь здебільшого в утворенні смаку та консистенції сиру, також входять бактерії роду *Lactococcus*, які приймають участь в утворенні смаку та структури сиру. Тобто дані закваски є комбінованими. Закваски додають в молоко безпосередньо після його теплової обробки, яка знищує більшу частину, як правило, патогенної мікрофлори молока та погіршує якість сиру, тому її присутність є недопустимою у готовому продукті[18].

Закваски, для виготовлення сирів голландської групи, до складу яких входять бактерії *Leuconostoc mesenteroides*, відносять до мезофільних заквасок, які використовують для виготовлення сирів з низькою температурою нагрівання. Температура заквашування при цьому має становити 25–35 °C[19]. Для таких заквасок використовують сухі бактерії, відповідно, закваска є сухого типу. Перевагами такого типу заквасок є їх висока стійкість, завдяки чому можливе їх транспортування на великі відстані та зберігання протягом довгого часу[18]. В середньому, при належному дотриманні умов зберігання заквасок, їх строк придатності становить: 3 місяці при кімнатній температурі зберігання; 1 рік при температурі + 4°C; 2 роки при температурі -20 °C[19].

Кількість життєздатних клітин у заквасці, до якої входять бактерії *Leuconostoc mesenteroides*, для виготовлення твердих сирів, має становити не менше 10^8 КУО/г[20].

На українському ринку представлений широкий асортимент молочнокислих заквасок різних виробників. Однак, проаналізувавши закваски для виробництва твердих сирів можна побачити, що всі вони імпортовані. Компанії Chr. Hansen, Dalton, Danisco та Sacco System є найбільшими імпортерами заквасок, саме їх продукція займає найбільшу частину ринку. Отже, детальніше розглянемо склад заквасок для виготовлення сирів Голландської групи іноземних виробників, представлених на українському ринку(табл.1.1).

Таблиця 1.1

Склад заквасок іноземних виробників, які представлені на українському ринку та займають більшу його частину

Компанія	Країна виробник	Склад закваски	Використана література
Chr. Hansen	Данія	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremori</i> ; <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> .	Мезофільна закваска CHN-19, Хансен. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://dom-gastronom.com.ua/uk-ua/zakvaski-i-pleсени-dlja-sirodelija/zakvaski-hansen--hansen--dlja-sira/mezofilnaja-zakvaska-chn-19-hansen--50u
Dalton	Італія	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ; <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis subsp. lactis var. diacetylactis</i> .	Закваска для сиру Гауда [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://milkservis.com/ua/p4210947-zakvaska-dlya-syra.html

Danisco	Франція	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis subsp. diacetylactis</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Lactobacillus helveticus</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i> .	Мезо-термофільна закваска ALCE LYOVAC DHC 10U на 1000 літрів [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1895065530-mezo-termofilnaya-zakvaska.html
Sacco System	Італія	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> ; <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis ssp. diacetylactis</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i> .	Мезофільна закваска Lyofast MW 030 (MW 036) [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://dom-gastronom.com.ua/uk-ua/zakvaski-i-plezeni-dlja-sirodelija/zakvaski-sacco/mezofilnaja-zakvaska-lyofast-mw-030

Одним з найбільших виробників заквасок для твердих та напівтвердих сирів є “Chr. Hansen”, країна виробник Данія. У них представлена мезофільна закваска CHN-19, яка є універсальною та може бути використана на заміну будь-якої іншої мезофільної закваски. На прикладі даної закваски можна розібрати особливості заквасок з бактеріями роду *Leuconostoc*.

Склад закваски: *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*.

Володіє високою аромоутворювальною та газоутворювальною здатністю, має гарну вологоутримуючу здатність, забезпечує високий вихід готового продукту та сприяє легкому відділенню сироватки.

Кількість одиниць активності: 50 U, цієї кількості вистачить для переробки 500 л різного виду молока . Рекомендоване дозування становить 0,25 г закваски на 10 л молока.

Закваски пакуються в герметичні саше пакети (рис.1.4), що виключають контакт із навколишнім середовищем. Перевагою такого пакування є те, що при короткочасному порушенні умов зберігання, до двох тижнів, наприклад при транспортуванні, активність штамів не змінюється і закваска не втрачає своїх властивостей[21].



Рис.1.4 Пакування заквасок “Chr. Hansen”у герметичні саше пакети [21]

Закваска CHN-19 використовується для виробництва сирів з низькою температурою другого нагрівання. Підходить як для домашнього використання, так і для використання в промислових масштабах. Закваска є універсальною та підходить для виробництва м’яких сирів з коров’ячого чи козячого молока, таких як: Шевре (з козячого молока), чи Філадельфія. Також дану закваску використовують для виробництва напівтвердих сирів, таких як: Гауда, Едем, Лієдамер та інші. Також підходить для виробництва твердих сирів, однак лише в комбінації з термофільною закваскою, та може бути використана замість будь-якої мезофільної закваски.

Також є певні рекомендації щодо використання закваски, а саме: зберігати у сухому місці, при температурі менше 4 °С, в місці без прямого потрапляння сонячного проміння; якщо закваска зберігалась при температурі меншій за 0 °С, перед використанням слід залишити її при кімнатній температурі на 60 хв; перед використанням впевнитись, що культура знаходиться в розсипчастій гранульованій формі; додавати закваску необхідно прямо в молоко, не допускаючи утворення піни,

для цього слід розпилити необхідну кількість закваски на поверхні нагрітого до потрібної температури молока та почекати декілька хвилини, щоб закваска ввібралася і потім перемішати. Після цього залишити молоко сквашуватись на необхідний термін, зазначений в рецепті, в залежності від виду сиру[21].

Закваска є прямого внесення, тобто її одразу вносять безпосередньо в ванну з молоком. Перевагами заквасок прямого внесення є відсутність необхідності використання спеціального обладнання для проведення розведення закваски, зниження ризику атаки бактеріофагами та гнучкість при використанні.

Сухі бактеріальні закваски прямого внесення для виробництва сиру випускаються в двох формах: у вигляді порошку та гранул. [22].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Leuconostoc mesenteroides – це молочнокислі бактерії роду *Leuconostoc*, які використовують в молочних заквасках при виробництві сиру. Особливістю *Leuconostoc mesenteroides*, яка відрізняє даний вид мікроорганізмів від інших мікроорганізмів роду *Leuconostoc* є можливість синтезу декстрану [23]. Він впливає на органолептичні властивості сиру, покращує утримання вологи, зберігає смакові якості і зовнішній вигляд, а також впливає на структуру сиру [17].

Наразі *Leuconostoc mesenteroides* використовують в більшості заквасок для виготовлення сиру голландської групи, тому постійно проводяться дослідження для знаходження альтернативних штамів, які будуть синтезувати більшу кількість біомаси, при використанні недорогих поживних середовищ, що може знизити витрати виробництва, та, відповідно, вартість готової продукції[24]. Отже, порівняємо три штами *Leuconostoc mesenteroides*, які можуть синтезувати достатню кількість біомаси та декстрану: PCSIR- 4, AA1, CMG713 (табл. 2.1).

Як ми бачимо, склад поживного середовища для культивування мікроорганізмів майже однаковий, але концентрація біомаси та декстрану різна: *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 – 9,6 г/л та 4,78 г/л відповідно; *Leuconostoc mesenteroides* AA1 – 8,4 г/л та 4,89 г/л; *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 – 24 г/л та 6,5 г/л (табл. 2.1). Проте для використання мікроорганізму в промислових масштабах слід враховувати, на скільки економічно вигідно буде використовувати певний штам. Для цього слід розрахувати вартість 1 л поживного середовища та умовну вартість 1 г цільового продукту.

Так як поживне середовище для культивування трьох штамів схоже, то і вартість майже однакова (табл. 2.2.). Та це дає нам можливість краще

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Гіріна А.С.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Перевір.</i>		Грегірчак Н.М.					20	11
<i>Консульт.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.						

проаналізувати умовну вартість 1 біомаси, так як культивування штамів проводиться в схожих умовах, а концентрація біомасу значно відрізняється. Як видно з даних, наведених у табл. 2.3, вигідніше використовувати штам *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, так як концентрація біомаси найбільша, серед інших штамів – 24 г/л, а умовна вартість 1 г цільового продукту становить 3,3 грн/г, що дешевше, ніж при культивуванні інших двох штамів, де умовна вартість 1 г цільового продукту становить 7,2 грн/г та 8,3 грн/г відповідно. До того ж, у *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 спостерігається підвищена здатність до синтезу екзополісахариду – 6,5 г/л.

Таблиця 2.1

Особливості одержання біомаси *Leuconostoc mesenteroides* на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація декстрану, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	Концентрація, г/л					
1	2	3	4	5		6	7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PCSIR- 4	Сахароза K ₂ HPO ₄ дріжджовий екстракт пептон CaCl ₂ NaCl MgSO ₄ ×7H ₂ O MnCl ₂ ×H ₂ O	100 15 5 5 0,05 0,01 0,01 0,01	18	4,78	9,6	В поживне середовище вносили 10% посівного матеріалу, культивували при температурі 26 °С, початкове значення рН= 7,5.	Shah Ali Ul Qader, Lubna Iqbal, Afsheen Aman, Erum Shireen, Abid Azhar . Production of Dextran by Newly Isolated Strains of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> PCSIR-4 and PCSIR-9 // Turk.J.Biochem. – 2006. – Vol. 31. – № 1. – P. 21-26
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AA1	Сахароза K ₂ HPO ₄ пептон дріжджовий екстракт CaCl ₂ NaCl MgSO ₄ ×7H ₂ O MnCl ₂ ×H ₂ O	100 15 5 5 0,1 0,01 0,01 0,01	18	4,89	8,4	Культивували при температурі 25°С, протягом 18 год, початкове значення рН = 7,5.	Afsheen Aman, Nadir Naveed Siddiqui, Shah Ali Ul Qader. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by <i>Leuconostoc mesenteroides</i> AA1 / Carbohydrate Polymers –2012. – Vol.87.–№1.–P.910-915

Закінчення табл. 2.1

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CMG713	Сахароза	150	20	6,5	24	Культивують при температурі 30°C, протягом 20 год, початкове значення рН = 7,0.	Farwa Sarwat ¹ , Shah Ali Ul Qader, Afsheen Aman, Nuzhat Ahmed. Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CMG713. <i>International Journal of Biological Sciences</i> – 2008. – Vol. 4. – № 6. – P. 379-386
	K ₂ HPO ₄	15					
	пептон	5					
	дріжджовий екстракт	5					
	NaCl	0,05					
	CaCl ₂	0,05					
	MnCl ₂ ×H ₂ O	0,01					

Вартість поживних середовищ для культивування *Leuconostoc mesenteroides*

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PCSIR- 4	Сахароза	100	180	18	1
	K ₂ HPO ₄	15	156	2,34	1
	пептон	5	1350	6,75	1
	дріжджовий екстракт	5	8442	42,2	2
	CaCl ₂	0,05	38,4	0,0019	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	23,10	0,0002	1
	MnCl ₂ ×H ₂ O	0,01	186	0,0019	1
	NaCl	0,01	58,5	0,0006	1
Вартість 1 л середовища – 69,297 грн					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AA1	Сахароза	100	180	18	1
	K ₂ HPO ₄	15	156	2,34	1
	пептон	5	1350	6,75	1
	дріжджовий екстракт	5	8442	42,2	2
	CaCl ₂	0,1	38,4	0,004	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,01	23,10	0,0002	1
	MnCl ₂ ×H ₂ O	0,01	186	0,0019	1
	NaCl	0,01	58,5	0,0006	1
Вартість 1 л середовища – 69,295 грн					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CMG713	Сахароза	150	180	27	1
	K ₂ HPO ₄	15	156	2,34	1
	пептон	5	1350	6,75	1
	дріжджовий екстракт	5	8442	42,2	2
	CaCl ₂	0,05	38,4	0,0019	1
	MnCl ₂ ×H ₂ O	0,01	186	0,0019	1
	NaCl	0,05	58,5	0,0029	1
	Вартість 1 л середовища – 78,298 грн				

Примітка* 1– <https://www.systopt.com.ua/>; 2– <http://lab-mir.com/>.

Умовна вартість 1 г біомаси *Leuconostoc mesenteroides*, синтезованого на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PCSIR- 4	9,6	18	0,54	69,3	7,2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AA1	8,4	18	0,47	69,3	8,3
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CMG713	24	20	1,2	78,3	3,3

2.2. Розрахунок складу поживного середовища.

Розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Leuconostoc mesenteroides* CMG713.

Тривалість культивування 20 год, концентрація декстрану в культуральній рідині становить 6,5 г/л, а концентрація біомаси – 24 г/л.

Для того, щоб провести даний розрахунок необхідно мати конкретну хімічну формулу декстрану. Враховуючи той факт, що його хімічна формула, структура та молекулярна маса може змінюватись в залежності від умов культивування, чи штама, то як стали формулу для нашого розрахунку візьмемо формулу декстрану 40 (одного з видів синтезованого декстрану, який активно використовують в різних галузях): $C_{18}H_{32}O_{16}$.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення.

Потреби для синтезу декстрану. За наведеними даними, як джерело вуглецю для одержання декстрану використовується сахароза. Вміст вуглеводів в сахарозі становить 100 %.

Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 6,5 г декстрану. Молекулярна маса $C_{18}H_{32}O_{16}$ становить 504. Отже, у 504 г декстрану міститься 216 г Карбону, а в 6,5 г декстрану, відповідно: $(216 \times 6,5) / 504 = 2,9$ г Карбону.

Далі розрахуємо, у скількох грамах вуглеводів міститься 2,9 г Карбону. Для цього необхідно розрахувати вміст Карбону у вуглеводах сахарози. Хімічна формула сахарози: $C_{12}H_{22}O_{11}$, тоді відсотковий вміст Карбону становить: $(12/45) \times 100\% = 27\%$. Отже, у 100 г вуглеводів міститься 27 г Карбону, а у 2,9 г Карбону міститься $(2,9 \times 100) / 27 = 10,7$ г вуглеводів.

Оскільки в сахарозі міститься 100 % вуглеводів, то для одержання 6,5 г декстрану, вміст сахарози у середовищі повинен бути 10,7 г, або 1,07 %. Якщо враховувати той факт, що при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах, тобто на субстратах що містять наприклад глюкозу чи сахарозу, близько 40% субстрату окиснюється до CO_2 , для отримання енергії, яка йде на конструктивного метаболізм. Отже, враховуючи це, вміст сахарози в середовищі має бути: $(10,7 \times 0,4) + 10,7 = 15$ г/л = 1,5 %.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься близько 50% Карбону. Отже, вміст Карбону у 24 г біомаси буде становити: $24 \times 0,5 = 12$ г. Ця кількість Карбону міститься в $(12 \times 100) / 27 = 44,4$ г вуглеводів.

У перерахунку на сахарозу отримаємо 88,8 г. Тут також необхідно враховувати, що 40% субстрату окиснюється до CO_2 , для отримання енергії, яка йде на конструктивного метаболізм. Тому, для одержання 24 г/л біомаси необхідно ввести в середовище $(88,8 \times 0,4) + 88,8 = 124,3$ г/л сахарози, або 12,4%.

Отже, загальний вміст сахарози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (24 г/л) та декстрану (6,5 г/л), становить $15 + 124 = 139$ г/л, або 13,9 %.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.

Для потреби синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10% Нітрогену. Таким чином, у 24 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 2,4 г. Для одержання декстрану в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело Нітрогену: пептон та дріжджовий екстракт.

Отже, з 10 г джерел азотного живлення (5 г/л пептону та 5 г/л дріжджового екстракту в складі поживного середовища) ми отримаємо $10 \times 0,1 = 1$ г Нітрогену. Отже, як видно з розрахунків концентрація джерел азотного живлення в поживному

середовищі має бути трохи більша: 12 г/л пептону та 12 г/л дріжджового автолізу, тоді $24 \times 0,1 = 2,4$ г, чого було б достатньо для біосинтезу біомаси.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі.

У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом Р). Отже, для синтезу 24 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $24 \times 0,03 = 0,7$ г/л. У даному поживному середовищі джерелом фосфору є K_2HPO_4

Відсотковий вміст Фосфору у K_2HPO_4 становить: $(31/174) \times 100\% = 18\%$. Ця кількість Фосфору міститься в $(0,7 \times 100) / 18 = 3,8$ г K_2HPO_4 .

Для одержання 24 г/л біомаси необхідно ввести в середовище $(3,8 \times 0,4) + 3,8 = 5,32$ г/л K_2HPO_4 .

Інші компоненти середовища.

Джерелами інших необхідних елементів, які входять до складу бактеріальної клітини, таких як Сульфур, Натрій, Калій, Кальцій, Магній та Хлор є $NaCl$, $CaCl_2$, $MnCl_2 \times H_2O$, а також пептон та дріжджовий екстракт.

Наведені вище розрахунки щодо складу поживного середовища можна подати у вигляді табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Склад поживного середовища для культивування біомаси *Leuconostoc mesenteroides*

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л
Сахароза	140
Пептон	12
Дріжджовий екстракт	12
K_2HPO_4	5,3

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

Leuconostoc mesenteroides відноситься до роду *Leuconostoc*, а отже, даному мікроорганізму притаманні всі характерні ознаки, що притаманні роду *Leuconostoc*. *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 – це грампозитивні бактерії, які мають сферичну, дещо витягнуту форму клітин, розміром 0,5-0,7 x 0,7-1,2 мкм. (рис. 2.1.)

Бактерії даного роду є нерухомими, не утворюють спори[8].



Рис. 2.1. *Leuconostoc mesenteroides*: морфологія клітин при рості у базовому культуральному середовищі MRS, збільшення $\times 100$ [25]

На поживному середовищі клітини бактерій розміщуються утворюючи ланцюги з клітин. Однак, залежно від умов культивування клітини можуть розташовуватись попарно, або подвійними ланцюгами(рис 2.1.)[10].

Слід зазначити, що умови культивування, а саме склад і консистенція поживних середовищ, впливають на морфологію *Leuconostoc mesenteroides*. При культивуванні на молоці, або на поживному середовищі з додаванням молока клітини мають кокоподібну форму і зазвичай вишиковуються в ланцюжки. Якщо проводити культивування в бульйоні – клітини можуть подовжуватись, чи навіть набувати вигляду паличок.

Також умови культивування значним чином впливають на зовнішній вигляд колоній *Leuconostoc mesenteroides*. На щільних середовищах молочнокислі бактерії утворюють досить дрібні, до 1 мм в діаметрі, гладкі круглі сірувато-білі колонії. При використанні бульйону в якості поживного середовища, спостерігається рівномірне помутніння середовища в процесі розвитку макроорганізмів, в той час як клітини утворюють осад. При цьому не залежно від умов культивування та типу поживних

середовищах, культивування *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 проводять не менше ніж 20 год для того, щоб спостерігати утворення колоній бактерій[8].

Leuconostoc mesenteroides CMG713 є факультативними анаеробами, тобто бактерії можуть жити і розмножувати як в присутності кисню, так і за його відсутності. Також бактерії даного роду є мезофільними мікроорганізмами[9], оптимальні температурні межі для їх росту становить 22 – 30 °С. Мінімальна температура, при якій *L. mesenteroides* здатні вижити становить 5 °С, при нижчій температурі їх життєдіяльність неможлива та клітини гинуть. При зростанні в рідкому середовищі з глюкозою кінцеву рН доводять до 4,0 – 5,0[8].

Бактерії даного роду є хемоорганотрофами [8], тобто джерелом енергії у них є окисно-відновні реакції, а донором електронів – органічні сполуки[26]. До того ж, у них наявна облігатна потреба в зброджуваному вуглеводі. Вони можуть ферментувати глюкозу з утворенням кислоти і газу, також основними продуктами бродіння є етанол і деякі ароматичні речовини, такі як: діацетил, ацетоїн і 2,3-бутиленгліколь[8].

Leuconostoc mesenteroides здатні утворювати ароматичні речовини, такі як: ацетоїн і діацетил. В значних кількостях ці речовини здатні утворюватися лише у деяких представників роду *Leuconostoc*, в тому числі і у *Leuconostoc mesenteroides*, однак, це можливо лише при значенні рН менше 6,0, тобто при накопиченні високої концентрації молочної кислоти[8]. Через дану особливість бактерії роду *Leuconostoc mesenteroides* досить часто використовують в складі заквасок в комбінації з іншими бактеріями[9].

Основну масу діоксиду вуглецю *L. mesenteroides* здатні виробляти з лимонної кислоти, тому при додаванні її в молоко чи інше поживне середовище середовище для культивування бактерій – це може сприяти активнішому утворенню CO₂. Крім того, бактерії роду *Leuconostoc* здатні утворювати CO₂ за допомогою гетероферментативного розщеплювання молочного цукру.

Хоч *Leuconostoc mesenteroides*, відносять до молочнокислих бактерій, однак, вони не володіють протеолітичною активністю. Також не утворюють індол та аміак, не здатні відновлювати нітрати[8].

При дослідження клітинної стінки *Leuconostoc mesenteroides* було встановлено, що її безазотний вуглеводневий склад буде однаковим навіть за різних умов культивування бактерій. Глюкоза та рамноза є єдиними відновлюючими цукрами, що наявні у клітинній стінці. Основними амінокислотами є глютамінова кислота, лізин та аланін, а основними аміноцукрами, які були виявлені, є мурамова кислота та глюкозамін. Також у клітинній стінці наявні тейхоєві кислоти, що є характерною ознакою грампозитивних бактерій. За типом поліолу, що входить до складу полімеру, у клітинній стінці *Leuconostoc mesenteroides* наявні саме гліцеролтейхоєві кислоти[27].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента.

Сучасна класифікація для *Leuconostoc mesenteroides* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій. У даному визначнику представлена актуальна філогенетична систематика, що відображає еволюційні зв'язки між організмами[28].

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Firmicutes*

Клас – *Bacilli*

Порядок – *Lactobacillales*

Родина – *Leuconostocaceae*

Рід – *Leuconostoc*

Вид – *Leuconostoc mesenteroides*

Штам – *Leuconostoc mesenteroides* CMG713.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті.

На сьогоднішній день молочна промисловість України є одним з основних та провідних підкомплексів агропромислового комплексу країни, а вироблена продукція у даній галузі забезпечує задоволення інтересів виробників та споживачів, так як молочна продукція займає значну частину раціону населення. В середньому витрати населення України на молочні продукти складає близько 15 % від загальних витрат на харчові продукти[1]. В той час як у 2019 році загальні витрати на харчові продукти досягли позначки у більше ніж 40%, що є одним з найвищих показників у світі[18]. Проаналізувавши стан молочної промисловості України можна помітити негативні тенденції її розвитку. Так, у 1991 рік молочна промисловість України займала 6 місце в світі, а вже у 2020 році займала 18 місце, чи навіть 32, якщо враховувати деякі інші підрахунки, що враховували попередню неточність. За роки незалежності України виробництво молока скоротилось у 2,5 рази, кількість переробленого молока зменшилась у 5 разів, а кількість підприємств скоротилась у 3,3 рази[1].

Значну частину молочної промисловості України складає саме виробництво твердого сиру, який виготовляється з молока та закваски, яка становить собою суміш різних видів молочнокислих культур. Молочнокислі бактерії роду *Leuconostoc mesenteroides* є компонентом заквасок для виробництва твердих сирів голландської групи[29].

За рекомендацією МОЗ України річна норма споживання молока і молочних продуктів (у перерахунку на молоко) становить 390 кг, на людину, з них 6,5 кг твердого сиру, що становить 13,5 % від загального споживання молока[2]. Більша частина сирів, які виготовляються на українських підприємствах – сири голландської групи. Це обумовлено певними історичними факторами, коли ще за часів Радянського Союзу технологи зробили свій вибір саме на користь технології

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Розроб.</i>		Гіріна А.С.					31	8
<i>Перевір.</i>		Грегірчак Н.М.				Кафедра БТМ		
<i>Консульт.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.						

виробництва сирів даної групи, через її надійність та відносну легкість[4]. На сьогоднішній день 2/3 українських виробництв займаються виготовленням саме твердих сирів[30]. М'яких сирів на українських підприємствах виготовляється досить мало, близько 1 т на місяць, в той час як об'єм виробництва твердих сирів досягає 300–400 т на місяць[31]. Дані Державної служби статистики України свідчать, що за останні 4 роки середньорічні обсяги виготовлення твердого сиру в Україні становлять 64276,7 т[32].

Для статистичних даних було враховуючи чисельність постійного населення України на 1 лютого 2022 року, що становило 41 млн осіб[32], річну норму споживання твердого сиру на душу населення – 6,5 кг[2], в Україні на власних виробництвах має виготовлятися близько 266500 т ($41 \text{ млн осіб} \times 6,5 \text{ кг} = 266500 \text{ т}$) твердого сиру задля забезпечення річної норми споживання твердого сиру населенням. Проте продукція, що виготовляється на проєктованому підприємстві може реалізовуватись не лише на внутрішньому ринку, де є багато можливостей враховуючи наявні на території України великі підприємства та крафтові сироварні, а й на зовнішньому ринку.

Однак, необхідно врахувати такі важливі економічні фактори, як: імпорт частини продукції зокордонних виробників на ринку України, а також обсяги експорту сиру, що в 2023 році становили 8,88 тис тон готової продукції. Сир є однією з основних експортних категорій України в грошовому еквіваленті (рис.3.1). Виручка з експорту сиру до країн Європи, Близького сходу та Африки становить близько 40 млн дол. за 2023 рік. При цьому найбільша кількість сирів (49%) була експортована до Молдови, 19% до Казахстану, 15% було експортовано до країн ЄС, а близько 6% продукції до країн Африки та Близького Сходу[33].



Рис. 3.1. Структура експорту молочних продуктів в грошовому еквіваленті за 2023 рік [33]

Також необхідно враховувати той факт, що за останні роки відбулось значне скорочення споживання молока та молочної продукції[18], внаслідок чого українці споживають твердого сиру менше рекомендованої річної норми. Тому розрахунок потреби у цільовому продукті будемо проводити опираючись на дані Державної служби статистики України щодо середньорічного об'єму виготовленого сиру в Україні за останні роки – 64276,7 т.

Для виготовлення твердого сиру голландської групи використовують закваски сухого типу. Кількість сухої біомаси *Leuconostoc mesenteroides* в таких заквасках становить близько 25% від загального об'єму. На 1000 л молока використовують 10 г закваски, відповідно, в даній кількості закваски міститься 2,5 г сухої біомаси *Leuconostoc mesenteroides*[19]. Стандартний вихід готової продукції становить 1:10, тобто з 10 л молока отримують 1 кг твердого сиру[34].

10 г закваски на 1000 л молока → 100 кг сиру;

6427700 г закваски на 642770000 л молока → 64277000 кг сиру.

Отже, для виготовлення 64277000 кг твердого сиру необхідно 642770000 л молока та 6427700 г (6,4 т) закваски. Відповідно, вміст сухої біомаси *Leuconostoc mesenteroides* у 6,4 т закваски буде становити 1,6 т.

3.2. Розрахунок потужності виробництва.

Проаналізувавши сухі бактеріальні закваски для виробництва твердого сиру, що представлені на українському ринку, можна побачити, що всі вони є імпортованими. Найбільшими іноземними виробниками заквасок є Chr. Hansen,

Dalton та Danisco. Саме вони імпортують до України найбільшу кількість заквасок сухого типу[35].

Опираючись на попередні розрахунки (див. п.3.1), за рік загальна потреба в заквасці для виготовлення твердого сиру становить 6,4 т, з яких 1,6 т – вміст сухої біомаси *Leuconostoc mesenteroides*.

Враховуючи, що на даний момент в Україні не виробляють в промислових масштабах закваски саме для твердих сирів, пропонуємо виробляти та покривати 30% від загальної потреби ринку, а саме:

$$G_{\text{гп}} = 1,6\text{т} \times 0,3 = 480 \text{ кг закваски}$$

Концентрація біомаси обраного біологічного агента *Leuconostoc mesenteroides* SMG713 становить 24 г/л (кг/м³)[6]. Отже, об'єм культуральної рідини, необхідної для отримання 480 кг закваски, становить:

$$24 \text{ кг} - 1 \text{ м}^3$$

$$480 \text{ кг} - X \text{ м}^3$$

$$X = 19,2 \text{ м}^3$$

Також необхідно врахувати приблизні витрати цільового продукту під час центрифугування, сушіння та пакування[36], які становлять 10%[37]. З їх врахуванням необхідно отримати так кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 19,2 \times 1,1 \approx 21 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.

Для забезпечення річної потреби у біомасі *Leuconostoc mesenteroides*, для виробництва сиру, потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 21 м³ культуральної рідини.

Приймемо, що кількість трудоднів становить ($T_{\text{рд}}$) 70 днів.

Для обрахунку циклу роботи ферментера ($T_{\text{цф}}$) необхідно розрахувати час наступних підготовчих робіт ($T_{\text{пр}}$): миття та огляд апарату – 1,5 год; перевірка на герметичність – 1 год; підігрів апарату – 0,5 год; стерилізація апарату – 1 год; охолодження апарату – 1 год; завантаження середовища – 2 год; засів – 0,5 год;

вивантаження культуральної рідин – 1 год. Отже, загальна тривалість підготовчих робіт становить 8,5 год.

Часу культивування T_k становить 20 год. Тоді цикл роботи ферментера ($T_{цф}$):

$$T_{цф} = T_k + T_{пр} = 20 + 8,5 = 28,5 \text{ год}$$

На основі попередньо розрахованої кількості культуральної рідини за рік $V_{кр}$, кількості робочих днів на рік $T_{рд}$, часу циклу роботи ферментера $T_{цф}$, визначаємо об'єм культуральної рідини за цикл $V_{цк}$:

$$V_{цк} = (K_1 \times V_{кр} \times T_{цф}) / T_{рд} \times 24, \text{ де}$$

K_1 – коефіцієнт запасу, який враховує втрати цільового продукту від нестерильних операцій, які визначаються величиною, $V_{кр}$ – кількість культуральної рідини за рік, $T_{цф}$ – тривалість циклу роботи ферментера, $T_{рд}$ – кількість робочих днів на рік.

$$V_{цк} = (1,5 \times 21 \times 28,5) / 70 \times 24 = 897,75 / 1680 = 0,54 \text{ м}^3/\text{цикл} = 540 \text{ л/цикл}$$

Визначивши об'єм культуральної рідини за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{г} = V_{цк} / K_{зап} = 0,54 / 0,6 = 0,9 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, за геометричним об'ємом обираємо ферментер $V_{ф} = 1 \text{ м}^3$, який відповідає вимогам до об'єму ферментара для біосинтезу біомаси молочнокислих бактерій для заквасок.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 0,54 / 1 = 0,54 \text{ – не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

За один виробничий цикл отримують $0,54 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Також необхідно врахувати втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), що становлять від 10–15%.

Отже, врахувавши покриття 10% втрат об'єму поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становить:

$$V_{роб.1} = V_{кр} \times (1 + E_{ф}) = 0,54 \times 1,1 = 0,6 \text{ м}^3,$$

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

Отже, робочий об'єм ферментера – $0,6 \text{ м}^3$. За вибраного коефіцієнта заповнення $0,6$ геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\phi} = 0,6 / 0,6 = 1 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст}1} = 1 \text{ м}^3$

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{31} = 0,6 / 1 = 0,6$ – не перевищує норми ($0,5-0,7$), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Розрахуємо кількість посівного матеріалу, необхідного для засіву $V_{\text{роб.1}} = 0,6 \text{ м}^3$ середовища:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} \times X_{\phi} = 0,6 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу,}$$

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

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 0,6 - 0,06 \approx 0,6 \text{ м}^3$$

Також необхідно врахувати втрати культуральної рідини, під час одержання $0,065 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті, в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, що становлять 10% .

Отже, врахувавши покриття 10% втрат, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} \times (1 + E_{\phi}) = 0,06 \times 1,1 \approx 0,07 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $0,07 \text{ м}^3$ при заданому коефіцієнті заповнення $0,6$ можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{\text{па2}} = 0,07 / 0,6 = 0,1 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ст}2} = 0,1 \text{ м}^3$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{32} = 0,07 / 0,1 = 0,7$ – не перевищує норми ($0,5-0,7$), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить $5-10\%$ від об'єму поживного середовища. Розрахуємо кількість посівного матеріалу, необхідну для засіву $V_{\text{роб.2}} = 0,07 \text{ м}^3$:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} \times X_{\phi} = 0,07 \times 0,1 = 0,007 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу,}$$

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

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 0,07 - 0,007 = 0,063 \text{ м}^3 \approx 0,06 \text{ м}^3$$

Також необхідно врахувати втрати культуральної рідини, під час одержання $0,007 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті, в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, що становлять 10%.

Отже, врахувавши покриття 10% втрат, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} \times (1 + E_{\phi}) = 0,007 \times 1,1 = 0,0077 \text{ м}^3 \approx 0,008 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $0,008 \text{ м}^3$ при заданому коефіцієнті заповнення 0,6 можна отримати в посівному апараті об'ємом: $V_{па3} = 0,008 / 0,6 = 0,013 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом апарат $V_{ст3} = 0,02 \text{ м}^3$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення: $K_{з3} = 0,008 / 0,02 = 0,04$ – виходить за задані межі. Так як стандартними є об'єми посівних апаратів: $0,01 \text{ м}^3$ та $0,02 \text{ м}^3$, які не підходять нам для даного процесу, необхідно замовити у виробника посівний апарат об'ємом $0,015 \text{ м}^3$, який буде задовольняти потреби виробництва.

Отже, об'єм посівного апарату: $V_{ст3} = 0,015 \text{ м}^3$; $K_{з3} = 0,008 / 0,015 = 0,53$ – не перевищує норми, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить 10% від об'єму поживного середовища. Розрахуємо кількість посівного матеріалу, необхідну для засіву $V_{роб.3} = 0,008 \text{ м}^3 = 8 \text{ л}$:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} \times X_{\phi} = 8 \times 0,1 = 0,8 \text{ л посівного матеріалу,}$$

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

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 8 - 0,8 = 7,2 \text{ л}$$

Таку кількість посівного матеріалу $V_{пм3} = 0,8 \text{ л}$ (800 мл) для засіву інокулятора, можна одержати під час культивування в колбах на качалках об'ємом 750 мл, в яких міститься 150-200 мл поживного середовища, $K_{зк} = 0,2$. Тоді кількість колб становить:

$$N_{колб} = V_{пм3} / (V_{колб} \times K_{зк}) = 800 / (750 \times 0,2) = 5 \text{ колб}$$

Отже, за результатами розрахунків для біосинтезу біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 необхідно встановити ферментер об'ємом 1 м³, інокулятори об'ємом 0,1 м³ та 0,015 м³, та 5 колб об'ємом 750 мл.

Для зручності всі проведені розрахунки та висновки стосовно кількості стадій підготовки посівного матеріалу представимо у вигляді таб. 3.1.

Таблиця 3.1

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

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$, м ³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{роб.}$, м ³ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, м ³ (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, м ³
I	2	3	4	5	6	7
IV	0,54	0,6	0,06	0,6	0,6	1
III	0,065	0,07	0,007	0,06	0,6	0,1
II	7,3	8 л	0,8 л	7,2 л	0,6	0,015
I	0,8	0,8	–	0,8	0,2	5 колб (750 мл)

* З урахуванням Еф;

**Об'єм культуральної рідини за один виробничий цикл, значення розраховано у п.3.3

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.

Ростовим субстратом для біосинтезу препарату на основі біомаси бактерій *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 є сахароза [6]. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes основним шляхом катаболізму ростового субстрату у *L. mesenteroides* є шлях Ембдена – Мейергофа – Парнаса, інша назва якого – гліколіз [38]. Отже наводимо схему катаболізму ростового субстрату відповідно до існуючих даних (Рис.4.1).

Спершу сахароза перетворюється на сахарозу-6-фосфат за участі ферменту фосфоррансфераза (КФ 2.7.1.211), потім сахароза-6-фосфат перетворюється на фруктозу за допомогою фермента бета-фруктофуранозидази (КФ 3.2.1.26), а фруктоза перетворюється на фруктозу-6-фосфат за участі ферменту фруктокінази (КФ 2.7.1.4), де остання, під дією фермента глюкозо-6-фосфатна ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на глюкозо-6-фосфат[39]. В свою чергу, фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2) активує перетворення глюкозо-6-фосфат на фруктозо-6-фосфат, а фосфотрикіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення останнього на фруктозо-1,6-дифосфат. Ферментативна дія фруктозо-бисфосфатальдолази, клас II, (КФ 4.1.2.13) на фруктозо-1,6-дифосфат зумовлює її перетворення на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат, який під дією ферменту тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Під дією гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогенази (фосфорилуючої) (КФ 1.2.1.12) гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, який, в свою чергу, під дією ферменту фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцерат мутази (КФ 5.4.2.11) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат, який під дією енолази (КФ 4.2.1.11) перетворюється на фосфоенолпіруват. Заключним етапом є перетворення фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40) на піруват [38].

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата				
Розроб.		Гіріна А.С.			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					39	9
Консульт.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

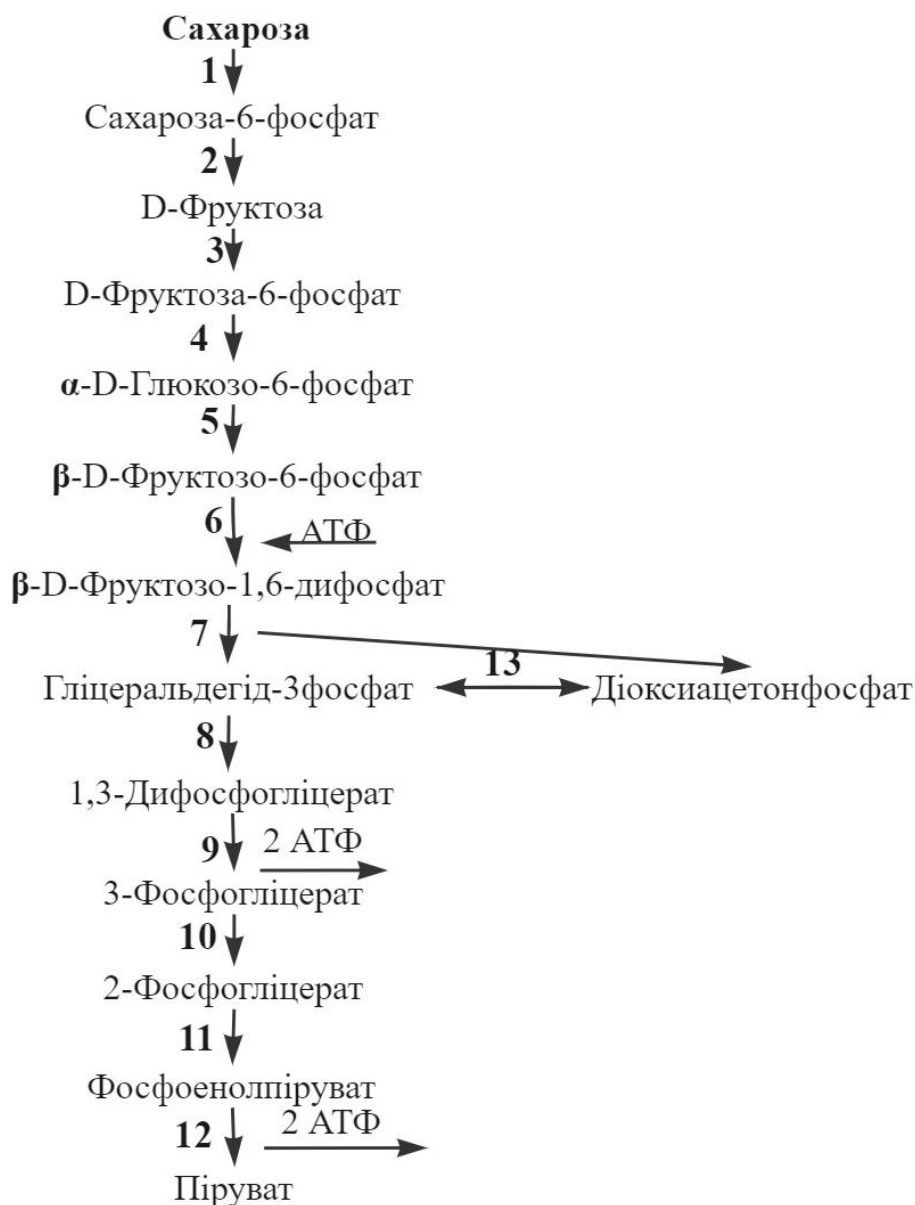


Рис.4.1. Шлях катаболізму сахарози у *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Шлях Ембдена – Мейергофа – Парнаса [38]

Ферменти: 1 – фосфоррансфераза (КФ 2.7.1.211), 2 – бета-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26); 3 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 4 – глюкозо-6фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9); 5 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – фосфотруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 7 – фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II, (КФ 4.1.2.13); 8 – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилююча) (КФ 1.2.1.12); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 10 – 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.11); 11 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 13 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.

Цільовим продуктом біосинтезу є біомаса *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, отже біосинтез включає синтез основних органічних сполук, що входять до складу клітини: нуклеїнових кислот, білків, полісахаридів і ліпідів.

Біосинтез нуклеїнових кислот. Попередником піримідинових нуклеїнових кислот є карбомоїлфосфат та аспартат. Карбомоїласпартат утворюється під дією аспартаткарбомоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2). Під дією дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3) карбомоїласпартат перетворюється на 4,5-дигідрооротат, який під дією дигідрооротатдегідрогенази (фумарат) (КФ 1.3.98.1) перетворюється на оротат. Під дією оротатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10) оротат перетворюється на оротидин-5-фосфат. При біосинтезі пуринових нуклеотидів утворюється 5-фосфорибзил-1-пірофосфат. Під дією ферменту оротидин-5-фосфатдекарбоксилази (КФ 4.1.1.23) оротидин-5-фосфат і 5-фосфорибзил-1-пірофосфат утворюють УМФ. Останній під дією уридилаткінази (КФ 2.7.4.22) перетворюється в УДФ. Під дією нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6) УДФ переходить в УТФ, а УТФ під дією СТР-синтаза (КФ 6.3.4.2) синтезує ЦТФ [40].

Синтез пуринових нуклеїнових кислот починається з рибозо-5-фосфат, який утворюється у Пентозофосфатному циклі. Під дією рибозо-фосфат-пірофосфокінази (КФ 2.7.6.1) вона перетворюється у 5-фосфорибози-1-пірофосфат, який також приймає участь у синтезі піримідинових нуклеотидів. Фосфорибозиламін-гліцинлігаза (КФ 6.3.4.13) індукує перетворення 5-фосфорибози-1-пірофосфату у 5-фосфорибози-1-амін, який під дією 5-(карбоксиаміно)імідазолрибонуклеотидсинтази (КФ 6.3.4.18) перетворюється на імідазольний нуклеотид. Останній під дією фосфорибозиламіноімідазол-сукцинокарбоксамідсинтази (КФ 6.3.2.6) перетворюється на інозинмонофосфат. На цьому етапі шлях синтезу пуринових нуклеотидів розходиться. Під дією гіпоксантинфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.8) з інозинмонофосфату утворюється гіпоксантин, який під дією відповідних ферментів перетворюється на аденін, який перетворюється на АМФ, останній перетворюється на АДФ і під дією нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6) АДФ перетворюється на АТФ. Але також з

інозинмонофосфату під дією ІМР дегідрогенази (КФ 1.1.1.205) утворюється ксантилова кислота, яка під дією відповідних ферментів перетворюється на ГМФ, який перетворюється на ГДФ, а останній, під дією – нуклеозиддифосфаткінази (КФ 2.7.4.6) вже перетворюється на ГТФ[41].

Біосинтез білків. Для синтезу білків необхідні амінокислоти, які синтезуються з певних попередників. Такими попередниками є: піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат, 5-фосфорибозил-1-пірофосфат + АТФ [42].

Так Оксалоацетат є попередником аспартату, аспарагіну, метіонін, лізину, треоніну та ізолейцину. Під дією аспараттрансамінази (КФ 2.6.1.1) оксалоацетат перетворюється на аспартат, який під дією аспаргінсинтази (КФ 6.3.1.1) перетворюється на аспаргін. Аспартат під дією аспартаткінази (КФ 2.7.2.4) перетворюється аспартил-4-фосфат, останній перетворюється на напівальдигід аспартанової кислоти, під дією аспартат-напівальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.11) [43]. Під дією 4-гідрокси-тетрагідродипіколінатсинтази (КФ 4.3.3.7) напівальдигід аспартанової кислоти переходить в дигідропіколінову кислоту, яка перетворюється в піперидикарбонової кислоту під дією сукциніл-діамінопімелатдесукцинілази (КФ 3.5.1.18). Остання перетворюється на діамінопімелінову кислоту під дією діамінопімелатепімерази (КФ 5.1.1.7). А діамінопімелінова кислота за участі діамінопімелатдекарбоксілази (КФ 4.1.1.20) утворює лізин [44]. Також напівальдигід аспартанової кислоти за участі ферменту гомосериндегідрогенази (КФ 1.1.1.3) утворює гомосерин, який може перетворюватись на О-сукцинілгомосерин за участі гомосерин ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.31), або на гомосеринфосфат за участі гомосеринкінази (КФ 2.7.1.39). О-сукцинілгомосерин переходить у цистатіонін під дією цистатіонін-гамма-синтази (КФ 2.5.1.48), яка перетворюється на гомоцистеїн під дією оксоглутараттрансамінази (КФ 2.6.1.7). Останній перетворюється на метіонін, за участі гомоцистеїнметилтрансферази (КФ 2.1.1.13)[9]. Гомосеринфосфат перетворюється на треонін під дією треонінсинтетази (КФ 4.2.3.1) [46]. Треонін утворює 2-оксибутират під дією аміотрансферази (КФ 1.6.42), останній утворює ізолейцин під дією аміотрансферази (КФ 1.6.42) [47].

2-Оксалоглутарат є попередником глутамату, глутаміну, аргініну і проліну. Під дією глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) 2-оксалоглутарат перетворюється на глутамат, який під дією глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) перетворюється на глутамін [43]. Також під дією відповідних ферментів глутамат перетворюється на пролін та аргінін [48].

Піруват є попередником аланіну, валіну у лейцину. Наприклад, під дією аланіндегідрогенази (КФ 1.4.1.1) з пірувату утворюється аланін [43]. Валін та лейцин також утворюються з пірувату під дією відповідних ферментів [47].

3-Фосфогліцерат є попередником серину, гліцину та цистеїну. Під дією відповідних ферментів утворюється серин, з якого під дією 3-фосфогліцератдегідрогенази (КФ 1.1.1.95) утворюється гліцин [46]. Також з серину, під дією певних ферментів утворюється цистеїн [45].

Фосфоенопіруват та еритрозо-4-фосфат є попередниками фенілаланіну, тирозину та триптофану. А фосфорибозил-пірофосфат за участі однієї молекули АТФ та відповідних ферментів перетворюється на гістидин [49].

Біосинтез полісахаридів. Так як *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 є грампозитивною бактерією, основним компонентом клітинної стінки є пептидоглікан, вміст якого становить близько 70% [6].

Синтез пептидоглікану починається з фруктозо-6-фосфату, який під дією глутамін-фруктозо-6-фосфат трансамінази (КФ 2.6.1.16) перетворюється на глюкозамін-6-фосфат. За участі фосфоглюкозамінмутази (КФ 5.4.2.10) глюкозамін-6-фосфат перетворюється на глюкозамін-1-фосфат, який утворює N-ацетилглюкозамін-1-фосфат за участі глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.157). Останній перетворюється на УДФ-N-ацетилглюкозамін під дією біфункціональна UDP-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилази (КФ 2.7.7.23), який за участі УДФ-N-ацетилмураматдегідрогенази (КФ 1.3.1.98) утворює УДФ-N-ацетилмурамову кислоту, з якої і синтезується пептидоглікан [50].

Біосинтез ліпідів. Попередником є 3-фосфогліцерин і жирні кислоти. Попередником жирних кислот Ацетил-КоА, який під дією ацетил-КоА-карбоксилази (КФ 6.3.4.14) перетворюється на малоніл КоА, який за участі маліл-

переносного білоку (трансилази) (КФ 2.3.1.39) утворює малоніл КоА АПБ. Останній за участі енол-АПБ-редуктази (КФ 1.3.1.9) утворює жирні кислоти, які входять до складу ліпідів [51].

Анаплоретичними реакціями є: карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату під дією ферменту піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1) та карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату під дією ферменту фосфоенолпіруваткарбоксилази (КФ 4.1.1.31) [52].

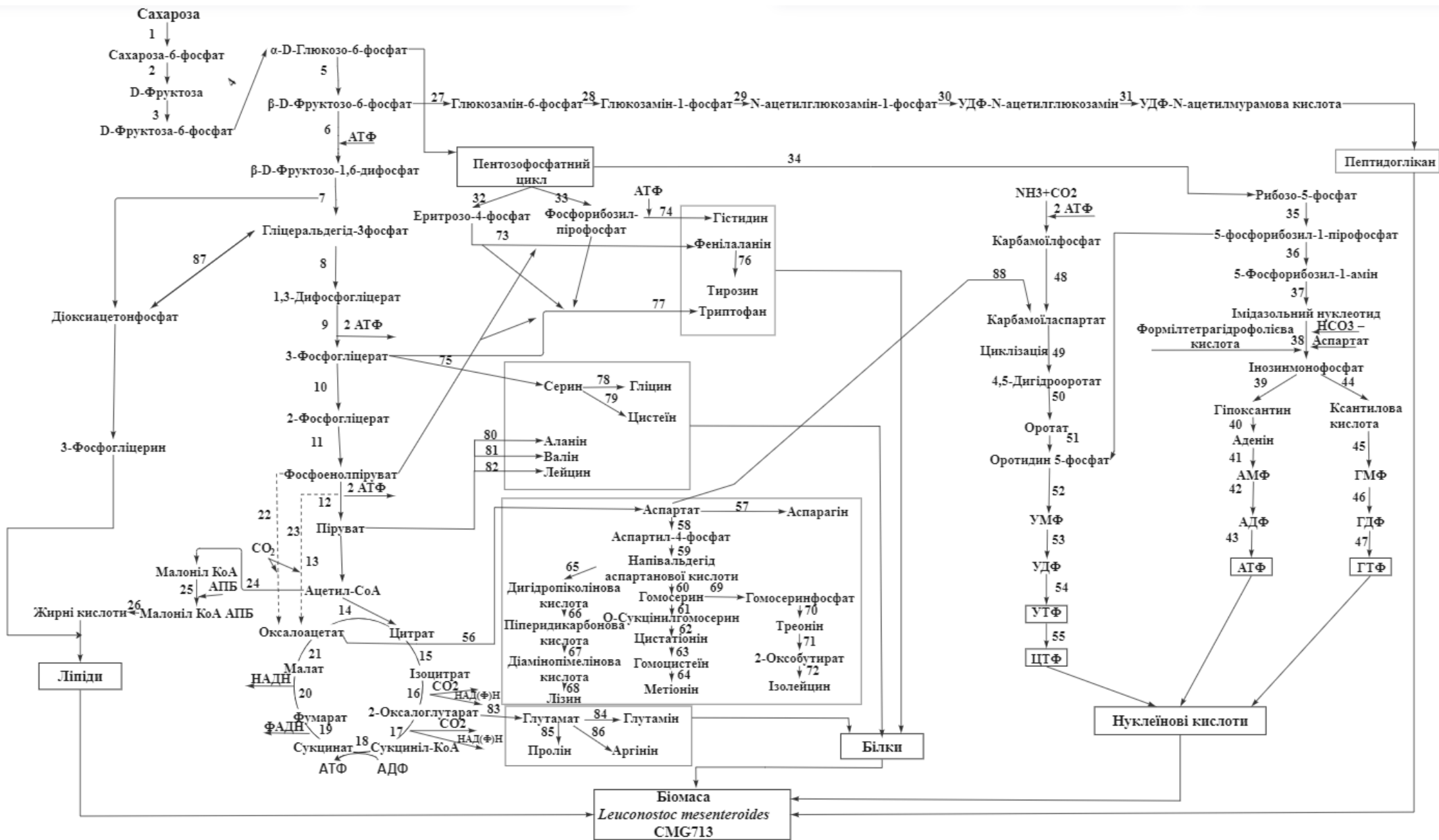


Рис. 4.2. Схема біосинтезу біомаси бактерії *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 при рості на сахарозі

Умовні позначення: суцільні лінії – основний шлях метаболізму; штрихові лінії – анаплеротичні реакції.

Ферменти: 1 – фосфоррансфераза (КФ 2.7.1.211), 2 – бета-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26); 3 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 4 – глюкозо-6-фосфатна ізомераза (КФ 5.3.1.9); 5 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 7 – фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II, (КФ 4.1.2.13); 8 – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (фосфорилуюча) (КФ 1.2.1.12); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 10 – 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.11); 11 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 13 – компонент піруватдегідрогенази E2 (дигідроліпоамід ацетилтрансфераза) (КФ 2.3.1.12); 14 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 15 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 16 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 17 – дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 18 – сукциніл-КоА синтетаза, альфасубодиниця (КФ 6.2.1.5); 19 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.2.4); 20 – фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 21 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 22 – фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31); 23 – піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1); 24 – ацетил-КоА-карбоксилаза (КФ 6.3.4.14); 25 – маліл-переносний білок (трансилаза) (КФ 2.3.1.39); 26 – енол-АПБ-редуктаза (КФ 1.3.1.9); 27 – глютамін-фруктозо-6-фосфат трансаміназа (ізомеризація) (КФ 2.6.1.16); 28 – фосфоглюкозамінмутаза (КФ 5.4.2.10); 29 – глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.157); 30 – біфункціональна UDP-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилаза (КФ 2.7.7.23); 31 – УДФ-N-ацетилмураматдегідрогеназа (КФ 1.3.1.98); 32 – транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 33 – рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 34 – рибоза-5-фосфат-ізомераза A (КФ 5.3.1.6); 35 – рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 36 – фосфорибозиламін-гліцинлігаза (КФ 6.3.4.13), фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза 1 (КФ 2.1.2.2), фосфорибозилформілгліцинамідин (FGAM) синтаза (КФ 6.3.5.3); 37 – 5-(карбоксиаміно)імідазол рибонуклеотидсинтаза (КФ 6.3.4.18), 5-(карбоксиаміно)імідазол рибонуклеотидмутаза (КФ 5.4.99.18); 38 – фосфорибозиламіноімідазол-сукцинокарбоксамідсинтаза (КФ 6.3.2.6), аденілосукцинатліаза (КФ 4.3.2.2), ІМФ

циклогідролаза (КФ 2.1.2.3, 3.5.4.10); 39 – гіпоксантинфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.8); 40 – аденіндезаміназа (КФ 3.5.4.2); 41 – аденінфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.7); 42 – аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 43 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 44 – ІМР дегідрогеназа (КФ 1.1.1.205); 45 – GMP синтаза (гідролізуюча глютамін) (КФ 6.3.5.2); 46 – гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8); 47 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 48 – аспараткарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 49 – дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3); 50– дигідрооротатдегідрогеназа (фумарат) (КФ 1.3.98.1); 51– оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10); 52 – оротидин-5-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23); 53 – уридилаткіназа (КФ 2.7.4.22); 54 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 55 – СТР-синтаза (КФ 6.3.4.2); 56 – аспараттрансаміназа (КФ 2.6.1.1); 57 – аспаргінсинтаза (КФ 6.3.1.1); 58 – аспараткіназа (КФ 2.7.2.4); 59 – аспарат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 60 – гомосериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.3); 61 – гомосерин ацетилтрасфераза (КФ 2.3.1.31); 62 – цистатіонін-гамма-синтаза (КФ 2.5.1.48); 63 – оксоглутараттрансаміназа (КФ 2.6.1.7); 64 – гомоцистеїнметилтрансфераза (КФ 2.1.1.13); 65 – 4-гідрокси-тетрагідродипіколінатсинтаза (КФ 4.3.3.7); 66 – сукцинілдіамінопімелатдесукцинілаза (КФ 3.5.1.18); 67 – діамінопімелатепімераза (КФ 5.1.1.7); 68 – діамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 69 – гомосеринкіназа (КФ 2.7.1.39); 70 – треонінсинтетаза (КФ 4.2.3.1); 71 – треонінаміноліаза (КФ 4.3.1.19); 72 – аміотранфераза (КФ 1.6.42); 73 – 3-дезоксид-7-фосфоептулонат синтаза (КФ 2.5.1.54); 74 – АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17); 75 – 3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95); 76 – гістидинолдегідрогеназа (КФ 1.1.1.23); 77 – триптофансинтаза (КФ 4.2.1.20); 78 – фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 79 – серинацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30), уридинкіназа (КФ 2.7.4.22); 80 – аланіндегідрогеназа (КФ 1.4.1.1); 81 – трансаміназа В (КФ 2.6.1.42); 82 – лейцинтрансфераза (КФ 2.6.1.6); 83 – глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.2); 84 – глутамінсинтетаза (КФ 6.3.1.2); 85 – пролінкарбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 86 – аргініносукцинатліаза (КФ 4.3.2.1); 87 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 88 – глюкозамінацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.4).

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Оскільки *Leuconostoc mesenteroides* є мезофільними мікроорганізмами, з оптимальною температурою культивування 25–35 °С (в нашому способі культивування *L. mesenteroides* CMG713 температура становить 30°C) та нейтральним значенням рН[8], то присутній ризик контамінації під час культивування сторонніми мезофільними або нейтрофільними мікроорганізмами. Для запобігання цьому необхідно створити асептичні умови культивування, які передбачають використання глибинного культивування, при цьому даних умов неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Також асептичні умови досягаються стерилізацією поживного середовища та обладнання, в якому безпосередньо проводиться культивування.

L. mesenteroides є факультативним анаеробом, однак найкращий ріст спостерігається саме за аеробних умов [9]. Слід враховувати, що асептичні умови культивування досягаються також за рахунок стерилізації аераційного повітря, яке подається в ферментер. Також для запобігання контамінації створюють надлишковий тиск в ферментері .

Так як *L. mesenteroides* має підвищену здатність до синтезу екзополісахариду –декстрану, який є вторинним метаболітом, його біосинтез може проводитись як при безперервному, так і при періодичному культивуванні. Біосинтез декстрану відбувається паралельно з ростом продуцента, однак максимальна швидкість біосинтезу декстрану відбувається саме в стаціонарній фазі росту мікроорганізму [53]. Отже, слід надавати перевагу періодичному культивування, як і наведено в табл. 2.1. “Особливості одержання біомаси *Leuconostoc mesenteroides* на суміші ростових субстратів”(п.п.2.1.), так як продуктивність культивування даним способом буде вище. До того ж, при використанні методу безперервного

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ			
Змн.	Арк.А	№ докум.№	ПідписПід	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМ	Літ.	Арк.	Акрцшів
Розроб.	Гіріна А.С.						48	25
Перевір.	Грегірчак Н.М.							
Консульт.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.					Кафедра БТМ		

культивування екзополісахаридів можливі біосинтез цільового продукту зі зміненими реологічними характеристиками, що не є добре, так як реологічні властивості декстрану є одним з його основних характеристик та переваг, які використовуються в багатьох галузях[54].

Так як існує велика кількість ферментерів, необхідно підібрати саме той, який підійде для культивування нашого штаму мікроорганізму: *Leuconostoc mesenteroides* SMG713.

Leuconostoc mesenteroides є факультативним анаеробом, при цьому найкращий ріст спостерігається саме за аеробних умов, відповідно необхідно створити аеробні умови його культивування, за рахунок ведення кисню в ферментер на протязі всього періоду[9]. Тому обраний ферментер має бути оснащений мішалкою, за рахунок якої буде здійснюватися перемішування, барботером, трубкою, через яку в середину ферментеру буде подаватись кисень, а також датчиками контролю кисню, рН та температури.

Для кращої аерації та інтенсифікації масообмінних процесів необхідно враховувати особливість синтезу екзополісахаридів, а саме підвищення в'язкості середовища, що може призвести до та погіршення аерації. Для уникнення цього, впродовж культивування слід підвищувати швидкість обертання мішалки починаючи з малої швидкості обертання на початку культивування, та поступово підвищувати швидкість обертання до кінця культивування, в міру підвищення в'язкості середовища в результаті біосинтезу екзополісахаридів [12].

Враховуючі всі особливості процесу культивування можемо дійти висновку, що ми маємо використовувати ферментер для глибинного культивування періодичної дії з відкритою турбінною мішалкою. Це найкращий тип мішалок, який можна використовувати при культивуванні молочнокислих бактерій, здатних до біосинтезу екзополісахаридів, які підвищують в'язкість поживного середовища. Диска відкрита турбінна мішалка, за рахунок своєї конструкції, створює радіальний потік рідини та зменшує в'язкість середовища, що веде до поліпшення диспергування кисню, який подається в ферментер та, відповідно, кращої аерації.

Також збільшення диспергування повітря досягається за рахунок розміщення мішалок безпосередньо над барботером.

Враховуючи об'єм ферментера: 1 м^3 – необхідно встановити два яруси мішалок даного типу, для забезпечення достатньої інтенсивності перемішування у всьому об'ємі середовища.

Ознайомившись з ферментерами, наявними на ринку України та Європи, для проведення культивування за заданими параметрами, а саме у ферментері об'ємом 1 м^3 та коефіцієнтом заповнення 0,6, тобто на 60% та всім вищезазначеним даними, можна використати ферментер виробника BTS Engineering на 1 м^3 (рис.5.1). Це українська багатопрофільна компанія, яка постачає своє обладнання по Україні та всій Європі. Ферментер виготовляється зі сталі, що забезпечує його довговічність та стійкість до дії зовнішнього середовища, а також легкість в обслуговуванні, митті та стерелізації. Бродильний апарат оснащується перемішуючим пристроєм різних видів, в залежності від потреб та особливостей культивування, рубашкою охолодження або виносним теплообмінником, циркуляційним насосом, всіма необхідними датчикам, та виготовляється на замовлення після проведення конструктивного розрахунку [55].

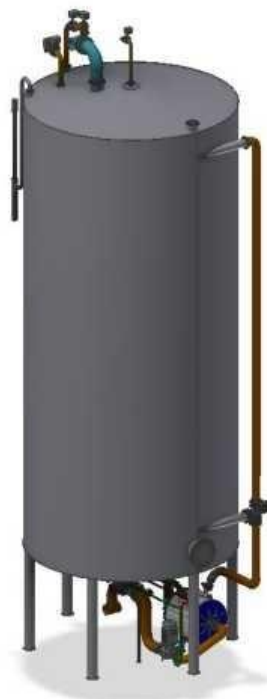


Рис.5.1. Ферментер на 1 м^3 , виробник BTS Engineering [55]

Отже, для проведення виробничого біосинтезу біомаси молочнокислих бактерій *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, з підвищеною здатністю до синтезу декстрану, у ферментері об'ємом 1 м³ необхідно попередньо провести конструктивний розрахунок та замовити виготовлення ферментера на замовлення.

5.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.

Leuconostoc mesenteroides є мезофільними мікроорганізмами, оптимальна температура культивування становить 22 – 30 °С при нейтральному значенні рН[8], то присутній ризик контамінації під час культивування сторонніми мезофільними або нейтрофільними мікроорганізмами. Для запобігання цьому необхідно створити асептичні умови культивування.

Leuconostoc mesenteroides є факультативним анаеробом, при цьому краще накопичення біомаси відбувається за аеробних умов[9]. Відповідно необхідно створити аеробні умови, за рахунок ведення кисню в ферментер на протязі всього періоду.

Повітря, яке подається в ферментер має бути стерильним, стисненим та мати температуру близьку до температури культивування *Leuconostoc mesenteroides* (30 °С). Для досягнення даних умов культивування необхідно передбачити наступні стадії підготовки аераційного повітря:

Збір атмосферного повітря. Збір атмосферного повітря здійснюється за допомогою повітрязбірника. Для цього його встановлюють на висоті 3 м від найвищої точки виробничого приміщення[37].

Попередня очистка атмосферного повітря. Попередню очистку атмосферного повітря від механічних домішок здійснюють за допомогою фільтрів попередньої очистки, які встановлюють перед компресором. Це є найпростішим способом очищення повітря. Ступінь очищення повітря після цього етапу становить 80-85%.

У вітчизняній промисловості широко використовуються фільтри касетного типу, які можуть бути заповнені різними фільтруючими матеріалами. Найчастіше використовують мінеральні волокна, тому обираємо скловолокно, яке є одним з найдоступніших фільтруючих матеріалів на ринку, при цьому має високу

продуктивність очищення. Також перевагою даного фільтруючого матеріалу є можливість його стерилізації гострою парою. Товщина волокон становить 1,5-21 мкм. Волокна укладаються у готові спресовані фільтруючі шари з щільністю упакування близько 0,1 від об'єму[56].

Компресування попередньо очищеного повітря. При компресуванні повітря стискають до 0,14 МПа, для подолання опору в системі підготовки повітря, подолання тиску стовпа води та створення надлишкового тиску в ферментері. Під час компресування повітря нагрівається до температури 120-250 °С.

Виділення зайвої вологи з повітря. Повітря переохолоджують у теплообмінному апараті до температури 25-45 °С внаслідок чого виділяється зайва волога.

Нагрівання повітря. Повітря нагрівають у теплообміннику до температури 70 °С для попередження утворення пари на волокнах фільтр[53].

Очищення повітря на головному фільтрі. Повітря подається на головний фільтр, де відбувається основне очищення аераційного повітря від забруднень, які потрапили в систему після проходження попередніх етапів очищення. Ступінь очищення повітря становить 94-97%. Такі фільтри являють собою багат шарову конструкцію, утворену фільтруючим матеріалом розміщеного в певній послідовності: шар активованого вугілля близько 800 мм, над та під шаром активованого вугілля викладають шар скловати товщиною близько 150 мм та діаметром 21 мкм. Скловату в даному типі фільтрів використовують для уникнення просторового переміщення частинок активованого вугілля[56].

Фільтри необхідно змінювати мінімум 2 рази на рік, або в міру їх забруднення[53].

Очищення повітря на індивідуальному фільтрі. На цьому етапі відбувається очищення повітря від забруднень, які були пропущені на попередніх етапах очищення, або випадково потрапили в систему. Ступінь очищення повітря – максимальний 99,99%. Індивідуальні фільтри встановлюються перед кожним ферментером. Матеріалом в індивідуальних фільтрах є скловата, діаметром до 2 мкм[53].

В промислових масштабах технологічно та економічно вигідно використовувати фільтри саме з волокнистих та пористих матеріалів, адже вони є доступними за ціною політикою, завдяки ним можливо досягнути ступінь очищення повітря 99,99%, а також вони піддаються стерилізації гострою парою.

Очищення відпрацьованого повітря. Враховуючи об'єми виробництва та цільовий продукт біосинтезу, необхідно очищати та знешкоджувати відпрацьоване повітря. Для цього, за допомогою колекторів повітря надходить на аналогічні головні фільтри, де проходить етап очистки[37].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.

Для розрахунку необхідної кількості мийних та дезінфікуючих засобів необхідно розрахувати необхідну площу обробки.

Проектоване виробництво працює протягом 70 робочих днів. Протягом цього періоду передбачена підготовка такого обладнання: ферментер об'ємом 1 м^3 , інокулятори об'ємом 15л та 100 л, реактори об'ємом 15 л, 50 л, 300 л та 800 л, колби на качалках та лабораторне устаткування. Враховуючи специфікацію обладнання, його габаритні розміри та вимоги до проектування виробничих приміщень, можемо розрахувати оптиміальні проці виробничих приміщень.

Також при проектуванні біотехнологічного підприємства варто враховувати, що виробничий біосинтез здійснюється з використанням ферментера об'ємом 1 м^3 . В даному випадку рекомендована стандартна ширина будівля від 12 м, при цьому вона має бути кратною 6, враховуючи ширину стандартних будівельних плит, які використовуються при будівництві.

Отже, виробництво цільового продукту має наступні основні приробничі приміщення:

- Приміщення для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу, в якому розташовується основне виробниче обладнання: ферментер, інокулятори та реактори-змішувачі.
- Приміщення для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.
- Мікробіологічна лабораторія.

Висота стін приміщень становить 4 м.

Кількість робочих днів становить 70. З метою санітарної підготовки підприємства проводять щоденне генеральне прибирання, яке включає в себе обробку підлоги, а також раз на місяць проводять генеральне прибирання, з обробкою підлоги, стін, тощо. Таким чином оптимальна площа приміщень наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Розрахунок оптимальної площі виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м²	Площа стін, м²	Загальна площа приміщень, м²
Приміщення для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу	48 (6 × 8)	112	160
Приміщення з качалками	8 (2×4)	48	56
Мікробіологічна лабораторія	16 (4×4)	64	80
Загальна площа	72	224	296

Згідно з специфікацією загальний об'єм апаратів становить:

$$15 + 50 + 800 + 300 + 15 + 100 + 1000 = 2280 \text{ л} = 2,28 \text{ м}^3$$

Кількість виробничих циклів становить 39. Тоді кількість циклів миття обладнання становить 40, враховуючи що миття обладнання здійснюють перед кожним виробничим циклом, а також враховуючи одне додаткове миття вкінці всіх виробничих циклів. Таким чином загальний об'єм миття обладнання складе:

$$2,28 \times 40 = 91,2 \text{ м}^3$$

Проаналізувавши дезінфікуючі засоби, зареєстровані в Україні і дозволені для використання на підприємствах харчової та біотехнологічної промисловості, та наведені в Державному реєстрі дезінфекційних засобів 2023 р., їх характеристику, витрати, вартість – можна виділити декілька засобів, що найкраще підходять для

санітарної підготовки виробництва. У табл. 5.2 наведена узагальнена характеристика мийних та дезінфікуючих засобів, що були детально розглянуті[57].

Таблиця 5.2

Узагальнена характеристика мийних та дезінфікуючих засобів

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/ або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л концентрованого препарату, грн/л	Вартість 1 л робочого розчину, грн/л	Літературне джерело
Засіб чистильний низькопінний з дезінфікуючим ефектом “DESOVER FN2” (ЧАС*)	Поверхні приміщень та обладнання	2	107	2,14	[57, 58]
Засіб дезінфікуючий з мийними властивостями “ДЕЗолайт” (ЧАС*)	Поверхні приміщень та обладнання	1	438	4,38	[57, 59]
Засіб дезінфікуючий «VASEPT ultra» (ЧАС*)	Поверхні приміщень та обладнання	0,5	363	18,5	[57, 60]
Засіб дезінфікуючий «VASEPT forte» (спирт)	Поверхні приміщень, предметів та обладнання, руки пресоаналу	Готовий до застосування	230	230	[57, 61]
Засіб дезінфекційний універсальний “SANDEZ” (спирт)	Поверхні приміщень, предметів та обладнання, руки пресоаналу	0,5	250	1,25	[57, 62]

Шкірний антисептик «БіоЛонг» (бензалконію хлориду; н-октодецилдиметил (ЧАС, ПАВ)	руки персоналу	Готовий до застосування	180	180	[57, 63]
Дезінфікуючий безспиртовий засіб "Септофан Форте" (полігексаметиленгуанідин гідрохлорид)	Руки персоналу	Готовий до застосування	100	100	[57, 64]
Засіб дезінфекційний та антисептичний "СЕПТАНОЛ Екстра" (спирт)	Руки персоналу	Готовий до застосування	130	130	[57, 65]

Примітка: *ЧАС – четвертинні амонієві сполуки.

Мийні та дезінфікуючих засоби для санітарної підготовки приміщень та устаткування

Засіб чистильний низькопінний з дезінфікуючим ефектом “DESOVER FN2”, ТОВ «Техно-ойл», Україна.

Засіб призначений для обробки та дезінфекції різних поверхонь, обладнання на підприємствах харчової промисловості, хіміко-фармацевтичних, біотехнологічних підприємств.

Засіб має високу бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну дію до 99,9%.

Склад: на основі ЧАС, д.р. n-пропанол - 40%, 2-пропанол (ізопропиловий спирт) - 30%, бензалконія хлорид - 1.5%.

Токсичність. За параметрами гострої токсичної дії згідно з ГОСТ 12.1.007-76 належить до 3 класу помірно небезпечних речовин при введенні в шлунок, до 4 класу мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру та при парентеральному введенні[58].

Засіб дезінфікуючий з мийними властивостями “ДЕЗОлайт”, ТОВ «ГІГІЄНА ДЕЗ», Україна.

Засіб призначений для знезараження поверхонь під час проведення дезінфекції на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, біотехнологічної, харчової, парфумерно-косметичної промисловості, в аптечних закладах, включно з "чисті". Призначений для дезінфекції поверхонь приміщень (полу, стіни, зокрема з плитковим покриттям), обладнання та устаткування.

Робочі розчини засобу мають мийні властивості, не викликають корозії виробів із металу, не пошкоджують об'єкти; не фіксують білкові забруднення на поверхні виробів медичного призначення, добре змиваються, не залишають нальоту на знезаражувальних об'єктах, гомогенізують мокроту та інші біологічні виділення, не знебарвлюють тканини. Розчини видаляють жирові та інші забруднення, біологічних рідин із поверхонь, що піддаються знезараженню.

Склад засобу: активними речовинами засобу є комплекс четверткових амонійних з'єднань — $13,0 \pm 2\%$, зокрема алкілдиметилбензиламмоній хлорид — $6,0-7,0\%$, дидецилдиметиламмоній хлорид — $7,0 \pm 8\%$; (неіонногенна ПАВ) — $3,0 \pm 0,5\%$; інші складники: лютензол $0,3-0,4\%$, (етилендіамінтетраоцетату — $3,0 \pm 0,5\%$; натрій метасиліка 5-водного — $0,3\%$; духмяка — $0,2\%$), вода — до 100% [59].

Засіб дезінфікуючий «VASEPT ultra», ТОВ «Владасепт», Україна.

Концентрат на основі ЧАСів, призначений для проведення поточної та заключної дезінфекції, генеральних прибирань, передстерилізаційного очищення, дезінфекції суміщеної з передстерилізаційним очищенням, дезінфекції та стерилізації виробів з різних матеріалів одноразового та багаторазового застосування.

Склад засобу. Діючі речовини: алкілдиметилбензиламмоній хлорид $9,5-10,5\%$, октилдидецилдиметиламмоній хлорид $7,1-7,9\%$, дидецилдиметиламмоній хлорид

3,6-3,9 %, діоктилдиметиламоній хлорид 3,6-3,9 %, етанол 3,0-3,3%. Допоміжні речовини: інгібітор корозії, вода до 100%.

Спектр антимікробної дії. Засіб має антимікробну активність до грам-негативних та грампозитивних бактерій (включаючи туберкульоз, небезпечних та особливо небезпечних (чуми, холери, туляремія, черевний тиф, клостридії, легіонельоз), збудників внутрішньо лікарняних інфекцій, дифтерії, скарлатини, коклюшу, менінгіту, дизентерії, паратифів, інших сальмонельозів, *Listeria monocytogenes*, мультирезистентний стафілокок (MRSA), ентерогеморагічну кишкову паличку (*Escherichia coli*), синьогнійну паличку (*Ps.Aeruginosa*), тощо), має бактерицидні (включаючи збудників туберкульозу, сальмонельозів, шигельозів та умовно патогенних мікроорганізмів — збудників внутрішньолікарняних інфекцій, у т. ч. ешерихіозів, викликаних ентерогеморагічною кишковою паличкою та МК.8А), віруліцидні (включаючи віруси поліомієліту, гепатитів В, С, ВІЛ типу 1 і типу 2, герпесу, атипової пневмонії" (SARS), грипу та парагрипу, у т.ч. "пташиного", викликаного вірусом H5N1 та "свинячого", викликаного вірусом H1N1, рота-, корона-, вакциніявіруси, тощо), та інших гострих респіраторних інфекцій (паповавіруси, аденовіруси, норовіруси, ентеровіруси, ротавіруси, вакциніявіруси, тощо), фунгіцидні (щодо грибів роду *Candida* і *Aspergillus* патогенних дерматофітів, та збудників поверхневих дерматомикозів), спороцидні властивості.

Токсичність. За параметрами гострої токсичності відповідає 4 класу небезпеки — малонебезпечна речовина. Препарат не володіє кумулятивними, сенсібілізуєчими, тератогенними, мутагенними властивостями, не подразнює шкіру, не володіє шкірно-резорбтивними властивостями.

Термін зберігання – 3 роки[60].

Засіб дезінфікуючий «VASEPT forte», ТОВ «Владасепт», Україна.

Склад засобу. Діючі речовини: спирт ізопропиловий 70-80 %, комплекс четвертинних амонійних 0,16±0,02% (алкілдиметилбензиламоній хлорид 0,07%, дидецилдиметиламоній хлорид 0,028%, октилдещилдиметиламоній хлорид 0,044%, діоктилдиметиламоній хлорид 0,018%). Допоміжні речовини: інгібітор корозії, вода до 100%.

Даний засіб є комбінованим, тобто до його складу входять декілька діючих речовин, що робить його ефективнішим в порівнянні з однокомпонентними засобами, саме тому при виборі слід надавати перевагу саме таким засобам.

Призначення засобу досить широке. Він призначений для дезінфекції та очищення невеликих за розміром або важкодоступних поверхонь приміщень, предметів та обладнання, виробів медичного призначення, виготовлених із різних матеріалів (гуми, скла, металу та пластмаси), нечутливих до дії спиртів; на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфумерно-косметичної, хімічної, біотехнологічної, мікробіологічної, харчової і переробної промисловості; у закладах охорони здоров'я, медичних, лікувально-профілактичних організаціях; на станціях швидкої і невідкладної медичної допомоги, донорських пунктів та пунктах переливання крові, аптеках та аптечних закладах; закладах та об'єктах МО та МВС; для просочування серветок одноразового використання для очищення і антисептичної обробки шкіри рук і тіла; і тд.

Засіб володіє мийно-дезінфікуючими та очищувальними властивостями, призначений для поверхонь що є нечутливими до дії спиртів, не пошкоджує поверхню, не залишає плям, після обробки поверхні не фіксує забруднення органічного походження.

Спектр антимікробної дії. Засіб дезінфікуючий «VASEPT forte», має антимікробну активність до грамнегативних та грампозитивних бактерій, включаючи туберкульоз, небезпечних та особливо небезпечних (чумі, холери, туляремія, черевний тиф, клостридії, легіонельоз), дифтерії, скарлатини, коклюшу, менінгіту, дизентерії, паратифів, інших сальмонельозів, *Listeria monocytogenes*, мультирезистентний стафілокок (MRSA), ентерогеморагічну кишкову паличку (*Escherichia coli*), синьогнійну паличку (*Ps.Aeruginosa*), тощо), бактерицидну (включаючи збудників туберкульозу, *Staphylococcus aureus*, мікобактерії B5, *Candida albicans*, сальмонельозів, шигельозів та умовно патогенних мікроорганізмів — збудників внутрішньолікарняних інфекцій, в т. ч. ешерихіозів, викликаних ентерогеморагічною кишковою паличкою та МК.8А), віруліцидні (включаючи віруси поліомієліту, гепатитів В, С, ВІЛ типу 1 і типу 2, герпесу, атипової

пневмонії" (SARS), грипу та парагрипу, у т. ч. "пташиного", викликаного вірусом H5N1 та "свинячого", викликаного вірусом H1N1, рота-, корона-, вакцинїявіруси, тощо), та інших гострих респіраторних інфекцій (паповавіруси, аденовіруси, норовіруси, ентеровіруси, ротавіруси, вакцинїявіруси, тощо), фунгіцидні (щодо грибів роду *Candida* і *Aspergillus* патогенних дерматофітів, трихофітій та збудників поверхневих дерматомікозів), спороцидні властивості.

Токсичність та безпечність засобу. За параметрами гострої токсичності відповідно до ГОСТ 12.1.007-76 належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру та при введенні в шлунок (4 клас небезпеки); не виявляє шкірно-подразнюючої та сенсibiliзуючої дії; подразнює слизову оболонку очей та верхні дихальні шляхи (при зрошенні). Випробування проведені відповідно до вимог ДСТУ ISO/IEC 17025:2006[61].

Засіб дезінфекційний універсальний "SANDEZ" , ТОВ «Екопласт Штанцл Україна», Україна.

Засіб використовується для професійного застосування при дезінфекції великих площ та обладнання на підприємствах харчової та біотехнологічної промисловості.

Склад,%: Ізопропіловий спирт – 60,0-72,0; Гліцерин – 0-1,5; Перекис водню – 1,0-3,0; ЧАС – 1,0-1,5[62].

Отже, при виборі засобів для санітарної обробки приміщень та обладнання на підприємстві необхідно звертати особливу увагу на склад засобу та його призначення для забезпечення необхідного рівня очищення поверхонь їх асептичності та безпечного використання, особливо при безпосередньому контакті з готовим продуктом. Також надзвичайно важливо дотримуватись послідовності етапів миття обладнання, устаткування та інвентарю для забезпечення належного очищення.

Миття обладнання та інвентарю проводять у послідовні етапи:

1. Миття обладнання теплою водою з механічним очищенням;
2. Обробка робочим розчином для дезінфекції;

3. Ополіскування очищеною або пом'якшеною водою для видалення залишків дезінфекційного розчину.

Стерилізація устаткування при виробничому процесі в асептичних умовах настільки ж важлива, яка і миття устаткування і є невід'ємним етапом загальної підготовки обладнання. Основним методом стерилізації обладнання, яким користуються на підприємствах у всьому світі та який гарантує необхідний рівень асептичності – є обробка устаткування насиченою водяною парою при температурі при 125-145°C при надлишковому тиску.

Після завершення циклу біосинтезу в посівних апаратах та ферментері і видаленню з них біомаси, їх відкривають та промивають гарячою водою, очищаючи від залишків біомаси. Барботер продувають повітрям. Після чого обладнання закривають та разом з іншим обладнанням стерилізують гострою та глухою парою, відповідно до прописаних режимів стерилізації[56].

Таким чином, всі вищенаведені засоби дозволені для використання на біотехнологічному підприємстві та, відповідно, можуть бути використаними на проектуваному підприємстві. Однак, враховуючи кількість циклів виробництва, доцільно обрати два основних засоби для санітарної обробки та змінювати їх кожні 2-3 місяці для уникнення утворення стійких штамів. Згідно з табл. 2.1 найдешевшими, проте ефективними засобами є: “DESOVER FN2” (на основі ЧАС) та “SANDEZ” (на основі спирту). Перевагою мийного засобу з дезінфікуючим ефектом “DESOVER FN2” серед інших засобів є те, що він є низькопінним, відповідно треба значно менше часу під час санітарної обробки для того, щоб змити засіб, адже немає потреби чекати поки піна осяде. “SANDEZ” є універсальними дезінфікуючим засобом, діючою речовиною якого є спирт.

Отже, обрані засоби мають різні діючі речовини, що дозволяє мінімізувати ризик розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Також дані засоби є досить дешевими, в порівнянні з аналогічними засобами, що характеризуються аналогічними властивостями. Відповідно використання цих засобів є економічно вигідним та може значно знизити витрати виробництва на закупівлю мийно-дезінфікуючих засобів.

Також при проведенні миття та дезінфекції обладнання необхідно пам'ятати про його хімічний та мікробіологічний контроль після проведення обробки. Це є одним з критичних етапів забезпечення якості готового продукту, адже мийно-дезінфікуючі засоби згубно впливають не лише на патогенні мікроорганізми, а й на біль чутливі корисні мікроорганізми, які є біологічним агентами на виробництві. Саме тому необхідно забезпечити ретельний змив мийно-дезінфікуючих засобів та проведення хімічного та мікробіологічного контролю після останньої промивки від залишків засобу, у останній промивній воді.

Хімічний контроль включає аналіз останньої промивної води на наявність там залишків мийно-дезінфікуючих засобів та їх діючі речовини, чи інших хімічних речовин. Для цього використовуються різні методи хімічного аналізу, наприклад хроматографія та спектрофотометрія. Отримані значення порівнюють з показниками води, що використовується як промивна вода. Порівняння проводиться з метою визначення відповідності отриманих результатів до вимог безпеки та якості, що регламентуються у відповідних стандартах.

Під час мікробіологічного контролю проводять визначення кількості мікроорганізмів в останній промивній воді. Для цього використовують метод мембранних фільтрів, через потенційно низьку кількість мікроорганізмів в аналізованому зразку, з подальшим висівом на відповідні поживні середовища[66].

Мийні та дезінфікуючі засоби для санітарної підготовки персоналу (обробки рук)

Окрему увагу під час санітарної підготовки підприємства необхідно звертати на підготовку персоналу, адже взуття, одяг та руки персоналу є одними з основних джерел контамінації на підприємстві. Персонал має бути проінформований про правила гігієни на підприємстві, дотримуватись та не порушувати їх, пройти медичний огляд та бути допущеним до роботи на підприємстві, використовувати захисний одяг для чистих приміщень, ретельно мити та обробляти руки відповідними дезінфікуючими засобами відповідно до встановлених вимог. Для обробки рук та шкіри персоналу можливо використовувати наступні засоби: шкірний антисептик «БіоЛонг», дезінфікуючий безспиртовий засіб "Септофан Форте", засіб

дезінфекційний та антисептичний "СЕПТАНОЛ Екстра"(табл.5.1), змінюючи їх між собою.

Засіб дезінфікуючий – шкірний антисептик «БіоЛонг» ТОВ «ВП «БІОЛОНГ», Україна.

Склад: діючі речовини: 1,0-1,8% - бензалконію хлориду; 0,1 - 0,4% - н-октодецилдиметил (3-триметоксиселіл)пропіл амонію хлорид; 1,1-2,0% - ізопропілового спирту).

Призначення: для дезінфекції шкіри рук робітників підприємств харчової, фармацевтичної, біотехнічної, косметичної промисловості.

Застосування: нанести 3 мл засобу та ретельно втерти в шкіру.

Засіб є прозорою безбарвною рідиною, володіє бактерицидною дією у відношенні грамнегативних та грампозитивних бактерій, вірулоцидною дією, фунгіцидними та спороцидними властивостями. При багаторазовому використанні не порушує ліпідний баланс шкіри – шкіра зберігає свої захисні властивості. Має пролонговану антимікробну дію, що зберігається протягом 5 годин після нанесення на шкіру[63].

Дезінфікуючий безспиртовий засіб "Септофан Форте" ТОВ «Українські Хімічні Технології ЛТД», Україна.

"Септофан Форте" – це рідкий, прозорий, безбарвний антисептичний засіб для дезінфекції шкіри рук з комплексом догляду за шкірою, що не містить спирт.

Склад: полігексаметиленгуанідін гідрохлорид-1%, гліцерин.

Призначення: для дезінфекції шкіри рук робітників підприємств харчової, фармацевтичної, біотехнічної, косметичної промисловості. Засіб забезпечує антисептичну дію, знищує мікроби за допомогою бактерицидного комплексу. Не викликає подразнення шкіри. Має високу бактерицидну та вірулецидну активність.

Засіб спеціально розроблено для дезінфекції рук працівників. Засіб володіє віруліцидною (також гепатит В,С, ВІІ), фунгіцидною, бактерицидною, туберкуліцидною активністю. Також містить комплекс догляду за шкірою захищає руки від сухості та подразнень, підтримує природний баланс та еластичність.

Дозування: антисептична обробка 3мл протягом 30сек[64].

Засіб дезінфекційний та антисептичний "СЕПТАНОЛ Екстра", ТОВ "ФЛЕКСОРЕС". Україна.

Засіб призначений для гігієнічної обробки рук персоналу біотехнологічної, мікробіологічної, фармацевтичної, парфумерно-косметичної, харчової та переробної промисловості.

Склад: Спиртовмісні речовини 75%, вода очищена, перекис водню, гліцерин.

Спосіб застосування: нанести на шкіру рук 3-4 мл. і ретельно обробити.

Термін придатності 24 місяці[65].

Дані засоби для дезінфекційної обробки шкіри рук персоналу є ефективними, вони володіють широким спектром антимікробної, фунгіцидної, віруліцидної та бактерицидної дії. Також дані засоби не потребують додаткового розведення, а одразу готові для використання, що економить час працівників. Однак, враховуючи вартість розглянутих засобів та діючі речовини, для проєктованого підприємства доцільно обрати наступні засоби: "Септофан Форте" та "СЕПТАНОЛ Екстра". Вони є найбільш економічно вигідними. В основі дезінфекційного засобу "СЕПТАНОЛ Екстра" йде спирт, що при тривалому використанні може пересушувати шкіру рук персоналу. Саме тому другим засобом був обраний дезінфікуючий безспиртовий засіб "Септофан Форте", що містить комплекс догляду для захисту рук персоналу від подразнень та сухості при частому використанні засобу.

Відповідно, при виборі засобів для обробки рук персоналу необхідно звертати додаткову увагу на те, чи подразнює даний засіб шкірні покриви, адже за аналогічну вартість можна придбати не менш ефективний, але більш комфортний для регулярного використання дезінфекційний засіб. Також при виборі дезінфікуючих засобів для обробки рук персоналу варто пам'ятати про важливість використання засобів з різними діючими речовинами, та їх періодичній зміні.

При правильному підборі мийних та дезінфекційних засобів, дотриманні правил їх використання, дозування, зміні засобів через певний проміжок часу для уникнення утворенню резистентних штамів – можна гарантувати ефективність санітарної підготовки підприємства і, відповідно, готової продукції.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.

Виробничий біосинтез біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 проводять у ферментері об'ємом 1 м³, а інокулянт отримують у три етапи: у 5-ти колбах на качалках та інокуляторах об'ємом 0,015 м³ та 0,1 м³.

Для виробничого біосинтезу біомаси *L. mesenteroides* CMG713 використовується поживне середовище наступного складу (г/л):

Сахароза – 150;

K₂HPO₄ – 15;

Пептон – 5;

Дріжджовий екстракт – 5;

NaCl – 0,05;

CaCl₂ – 0,05;

MnCl₂×H₂O – 0,01 [6].

Як ми бачимо, концентрація сахарози (джерела вуглецю) в середовищі становить 150 г/л, відповідно, необхідно передбачити приготування і стерилізацію підживлювального розчину сахарози, адже початкова концентрація джерела вуглецю не може бути вища за 60 г/л.

5.4.1. Підготовка та стерилізації підживлювального розчину сахарози.

Концентрація у середовищі для біосинтезу біомаси *L. mesenteroides* становить 150 г/л. На початку біосинтезу вносять 50 г/л субстрату, а решту 100 г/л (150 – 50 = 100 г/л) вносять у вигляді підживлювального розчину сахарози.

Враховуючи об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу, який становить 600 л, розрахуємо загальну кількість сахарози (X) для приготування підживлювального розчину:

100 г сахарози міститься в 1 л середовища;

X г глюкози міститься в 600 л середовища.

$X = (600 \times 100) / 1 = 54000 \text{ г} = 60 \text{ кг}$.

Далі розрахуємо необхідний об'єм 40%-го підживлювального розчину (V), який містить 60 кг сахарози:

40 кг сахарози в $0,1 \text{ м}^3$ розчину,

60 кг сахарози в $V \text{ м}^3$ розчину.

$V = (60 \times 0,1) / 40 = 0,15 \text{ м}^3$ розчину.

Враховуючи об'єм підживлювального розчину – $0,15 \text{ м}^3$, стерилізацію будемо проводити в окремому реакторі при $112 \text{ }^\circ\text{C}$, протягом 30 хв. Час виробничого біосинтезу *L. mesenteroides* CMG713 становить 20 год, тому підживлюючий розчин будемо вносити в два етапи, щоб мікроорганізм встиг його засвоїти: 50% підживлювального розчину будемо вносити через 6 год після початку біосинтезу, інші 50% підживлювального розчину будемо вносити на 12 годині біосинтезу.

5.4.2. Підготовка і стерилізація поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1 л поживного середовища, г/л	Композиції	Об'єм композиції, мл
Сахароза	50	50	А	860
Пептон	5	5		
Дріжджовий екстракт	5	5		
Вода		800 (мл)		
NaCl	0,05	0,05	Б	55,11
CaCl ₂	0,05	0,05		
MnCl ₂ ×H ₂ O	0,01	0,01		
Вода		55 (мл)		

K_2HPO_4	15	15	В	85
Вода		70 (мл)		
Всього				1000 мл

Проаналізувавши склад поживного середовища, ділимо його на три композиції в залежності від умов стерилізації:

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

Композиція Б: NaCl, CaCl₂, MnCl₂×H₂O (режим стерилізації: 130 °С, 40 хв).

Композиція В: K₂HPO₄ (режим стерилізації: 130 °С, 40 хв).

Такий поділ обумовлений тим, що вуглеводи, амінокислоти та дріжджовий екстракт, які входять до композиції А, є термолабільними компонентами їх необхідно стерилізувати при нижчих температурах, ніж інші компоненти середовища. Декілька термолабільних компонентів можна стерилізувати в одній композиції. Солі композиції Б стерилізуються при стандартних для солей температурах, а фосфатну сіль K₂HPO₄ будемо стерилізувати окремо, як композицію В, для уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію[67]. Стерилізацію всіх компонентів по окремоті будемо проводити в автоклаві, так як їх об'єм невеликий, згідно с наведеними режимами стрилізації.

5.4.3. Підготовка і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.

Вирощування в інокуляторі об'ємом 0,015 м³.

Розрахунок ненобхідної кількості компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,015 м³ наведений у табл. 5.4.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,015 м³ (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 9 л поживного середовища, г/л	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	50	450	А	7
Пептон	5	45		
Дріжджовий екстракт	5	45		
Вода		6,4 л		
NaCl	0,05	0,45	Б	2
CaCl ₂	0,05	0,45		
MnCl ₂ ×H ₂ O	0,01	0,09		
K ₂ HPO ₄	15	135		
Вода		1,9 л		
Всього				9 л

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

Композиція Б: K₂HPO₄, NaCl, CaCl₂, MnCl₂×H₂O (режим стерилізації: 130 °С, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

В цьому випадку всі солі будемо стерилізувати в одній композиції Б, так як перед стерилізацією рН розчину солей будемо доводити до 4 - 4,5 нестерильним 6% розчином соляної кислоти. Приготування та стерилізація розчину солей відбувається в інокуляторі, так як він обладнаний датчиком рН. Після стерилізації та вистигання композиції необхідно додати стерильний розчин NaOH для підлуження середовища.

Композицію А, так як її об'єм більший, ніж був на попередньому етапі, будемо готувати і стерилізувати в реакторі.

Вирощування в інокуляторі об'ємом 0,1 м³.

Розрахунок неюбхідної кількості компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,1 м³ наведений у табл. 5.5.

Таблиця 5.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 0,1 м³ (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 100 л поживного середовища, г/л	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	50	5000	А	46
Пептон	5	500		
Дріжджовий екстракт	5	500		
Вода		40 л		
NaCl	0,05	5	Б	14
CaCl ₂	0,05	5		
MnCl ₂ ×H ₂ O	0,01	1		
K ₂ HPO ₄	15	1500		
Вода		12,49 л		
Всього				60 л

Композиції та умови стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,1 м³ будуть аналогічними до композицій та умов стерилізації для інокулятора об'ємом 0,015 м³:

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

Композиція Б: K_2HPO_4 , NaCl, $CaCl_2$, $MnCl_2 \times H_2O$ (режим стерилізації: 130 °С, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Композиція А готується та стерилізується в реакторі, враховуючи її об'єм (46 л). В той час, як змішування та стерилізація композиції Б відбувається у інкуляторі, так як він обладнаний датчиком рН і немає потреби додатково встановлювати реактор та дороговартісний датчик. Перед початком стерилізації композиції Б рН розчину солей будемо доводити до 4 - 4,5 нестерильним розчином соляної кислоти, а після стерилізації та вистигання композиції будемо додавати стерильний розчин NaOH для підлучення середовища.

5.4.4. Підготовка і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері, об'ємом 1 м³, наведений у табл. 5.6.

Таблиця 5.6

Композиції стерилізації компонентів виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³ (Кз = 0,6)

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1000 л поживного середовища, г/л	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	50	50000	А	460
Пептон	5	5000		
Дріжджовий екстракт	5	5000		
Вода		400 л		
NaCl	0,05	50	Б	140
$CaCl_2$	0,05	50		
$MnCl_2 \times H_2O$	0,01	10		

K_2HPO_4	15	1500		
Вода		124,9 л		
Всього				600 л

При проведенні розрахунків слід врахувати, що на початку виробничого біосинтезу в середовище вноситься лише 50 г/л, а решту 100 г/л вносять у вигляді підживлювального розчину сахарози.

Враховуючи аналогічні компоненти поживного середовища та їх умови стерилізації – маємо аналогічні композиції:

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

Композиція Б: K_2HPO_4 , NaCl, $CaCl_2$, $MnCl_2 \times H_2O$ (режим стерилізації: 130 °С, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Композиція А готується та стерилізується в реакторі, враховуючи її об'єм (46 л). В той час, як змішування композиції Б відбувається в реакторі, а стерилізація композиції Б буде проводитись у ферментері, так як він обладнаний датчиком рН і немає потреби додатково встановлювати цей дороговартісний датчик у реакторі. Перед початком стерилізації композиції Б рН розчину солей будемо доводити до 4 - 4,5 нестерильним розчином соляної кислоти, а після стерилізації та вистигання композиції будемо додавати стерильний розчин NaOH для підлучення середовища.

5.4.5. Підготовка і стерилізація розчинів для регуляції рН та піногасника.

Враховуючи особливості стерилізації композиції солей в ферментері необхідно врахувати використання розчинів для регуляції рН, а саме: 6%-й розчин соляної кислоти та 6%-й розчин гідроксид натрію. Це обумовлено тим, що перед початком стерилізації композиції солей, рН розчину необхідно довести до значення 4,5-5,0, за допомогою розчину соляної кислоти, для запобігання випадення осаду фосфорних солей. Через те, що 6%-й розчин соляної кислоти ми додаємо безпосередньо перед початком стерилізації – він не потребує стерилізації.

6%-й розчин NaOH використовують після завершення стерилізації композиції солей для стабілізації рН середовища, а також на етапі виробничого біосинтезу, для доведення значення рН поживного середовища до 7,0. Стерилізацію 6%-го розчину NaOH проводять у реакторі при температурі 131° С, протягом 40 хвилин, 0,15 МПа[67].

Необхідно розрахувати кількість титрувальних агентів, потрібних на різних етапах вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних агентів

Об'єм середовища, л	NaOH (6 %)		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
9	18	у колбі на 50 мл	4*	у колбі на 50 мл
60	120	у колбі на 200 мл	28*	у колбі на 50 мл
600	1200	у колбі на 2 л	280*	у колбі на 500 мл

*об'єм 6%-го розчину хлоридної кислоти розраховували, виходячи з об'єму композиції солей перед стерилізацією – 2 л, 14 л та 140 л відповідно.

Враховуючи, що поживне середовище містить у своєму складі компоненти, які спричиняють піноутворення: сахароза та пептон, необхідно врахувати додавання піногасника, для зменшення рівня піноутворення й підвищення економічності технологічного процесу та якості цільового продукту біосинтезу. Останні роки все частіше використовують саме синтетичні піногасники, а саме силікони. Тому в якості піногасника будемо використовувати “Диметикон”, який поширений у багатьох країнах. При додаванні 0,5%-го розчину Диметикону він проявляє властивості піногасника. Стерилізація проводиться впродовж 2-х год, при температурі 160° С у мірниках з внутрішнім змішувачем, які встановлені біля основного ферментеру[56]. Стерилізація великої кількості Диметикону в автоклаві не рекомендується, враховуючи його особливості[68].

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Відповідно до розробленої апаратурної схеми технологічного процесу в табл. 6.1 наведена специфікація обладнання, зображеного на схемі та використаного на проектуєваному підприємстві.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник типу АІІ серії 5.903-20 ("ПРОМТРУБОПРОВОДКОМПЛЕКТ") Тиск до 0,6 МПа[69].
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Панельний фільтр для грубого очищення повітря, клас фільтрації G4 ("Alter Air", Україна). Фільтрувальний матеріал може бути різним: целюлоза, голкопробивні неткані волокна, скло і мікроскловолокно; E=90%; фільтр може бути виготовлений на замовлення по відповідним габаритним розмірам[70].
К-3	Компресор	1	Поршневий компресор серії DKT («Dalgakiran», ТОВ "Далгакиран компресор Україна"). Продуктивність: 205 л/хв, потужність: 1,1 кВт, максимальний тиск: 8 бар, габарити: 1150x420x900 мм[71].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач <i>Консульт.</i>	1	Промисловий осушувач повітря Hankison рефрижераторного типу («Dalgakiran», ТОВ "Далгакиран компресор Україна"). Продуктивність: 20–1700 м ³ /год, потужність: 0,24–5,7 кВт, робочий тиск – до 16 атмосфер, габарити: 390x344x320 мм[72].

НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата
Розроб.		Гіріна А.С.		
Перевір.		Грегірчак Н.М.		
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.
				73
			Акрцшів 4	
			Кафедра БТМ	

Р-5	Ресивер	1	Ресивер КП 1000-11 (“Пневмат” Україна). Об’єм: 1000 л, максимальний тиск: 11 бар, діаметр ємності: 0,9 м[73].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач НКВ 600x300-4 («Vents», Україна). Максимальний робочий тиск: 1,6 МПа, максимальна робоча температура води +100°C, габаритні розміри: 600x300 мм[74].
Ф-7	Головний фільтр	1	Кишенькові фільтри F9 (“NEW FILTER”). Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; E>95%; температура до 80 °C; фільтр може бути виготовлений на замовлення по відповідним габаритним розмірам [75]
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр очищення повітря SPFs-007/ Фільтруючий матеріал: боросилікатне мікрволокно; E=99,99%; робочий тиск: до 16 бар; діапазон робочих температур: від -20 до +150°C (короткочасно, до 20 хв, +200°C); фільтр може бути виготовлений на замовлення по відповідним габаритним розмірам [76]
ДЗ-9 ДЗ-13 ДЗ-19	Об’ємно-ваговий дозатор	1	Ваговий дозатор FlexWX (“FlexMash”, Україна). Межі дозування, до 30 кг; робоча температура до +85°C; матеріал: нержавіюча сталь[77]
Р-10	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор серії А3133 (“Amar Equipments”, Індія), об’ємом 15 л. Оснащений мішалкою з 2-ступеневий суцільним валом з 6-лопатевою турбінною мішалкою: 750 об/хв[78].
ІФ-11 ІФ-15 ІФ-22	Індивідуальний фільтр очистки повітря	1	Індивідуальний фільтр Ultra, клас U16 (“ТЕКА”). E=99,999%; розмір, мм: 337 x 230 x 100 (або може бути виготовленим на замовлення по індивідуальним розмірам)[79].
І-12	Інокулятор	1	Інокулятор Biostat Cplus об’ємом 15 л. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 304, 316L; містить сорочку, мішалку; швидкість обертання мішалки 20-1000 об/хв; датчики рН, рО ₂ , температури, манометр. Габаритні розміри, мм: 1900 x 1020 x 750[80].

P-14	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор серії А3403 (“Amar Equipments”, Індія), об’ємом 50 л. Оснащений сорочкою, температурним датчиком, мішалкою з 2-ступеневий суцільним валом з 6-лопатевою турбінною мішалкою: 500 об/хв. Габаритні розміри мм: 355 x 558[78].
I-16	Інокулятор	1	Інокулятор BR500-M2 об’ємом 100 л (“Labfirst Scientific Instruments”, США). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь SS304 і SS316L; швидкість обертання мішалки: 5 - 1000 об/хв; містить датчики контролю: температури, швидкості перемішування, рН, розчиненого кисню, піногасіння, потоку повітря, тиску у резервуарі, кількість подачі[81].
ДЗ-17	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Вагаовий дозатор (“АгроТех”, Україна) для реактора-змішувача об’ємом 0,8 м ³ . Межі дозування: 0,1-60 кг; потужність: 2200 Вт[82]
P-18	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор об’ємом 800 л (ТОВ "БК" "Енергопром", Україна). Матеріал: нержавіюча сталь AISI316L; матеріал, не контактуючий з продуктом сталь AISI304; Оснащений сорочкою, мішалкою; швидкість обертів мішалки: 30-80 об/хв. Реактор комплектується гомогенізатором з продуктивністю до 200 л/хв. Діаметр днища реактора, мм: 900[83].
P-20	Реактор-змішувач для приготування 40-% піджилювального розчину сахарози	1	Реактор TRVA-R2 (“Арасо AG”, Нідерланди). Об’єм: 300 л; матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою, мішалкою; швидкість обертів мішалки: 20-60 об/хв; габаритні розміри, м: 0,83 x 0,83 x 3; потужність 3 кВт[84].
H-21	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний TAPFLO T100. Максимальна продуктивність: 125 л/хв; максимальний тиск: 8 бар; максимальна робоча температура: 100 °С; габаритні розміри, мм: 200×214×320 [85]

Закінчення табл. 6.1

ФР-23	Ферментер	1	Промисловий ферментер OLT-1000JS об'ємом 1 м ³ ("OLLITAT technology", Китай). Матеріал: нержавіюча сталь 316L; Оснащений сорочкою, мішалкою, датчиками рН, рО ₂ , температури, тиску, подачі піногасника, пробовідбірником, манометром. Швидкість обертів мішалки: 50-1000 об/хв; потужність: 75 кВт; габаритні розміри, мм: діаметр– 1100, висота – 3200[86].
Н-24	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос моноблочний CS 50-160 D3 ("Speroni", Італія). Потужність: 4,8 кВт, максимальний тиск: 10 бар; максимальна висота подачі: 25 м; максимальна температура: 90 °С; матеріал корпусу: чавун; матеріал валу: нержавіюча сталь AISI 304; габаритні розміри, мм: 680 x 317 x 498[87]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка підприємства

У сучасній організації біотехнологічного виробництва, де кожен етап виробничого процесу має вирішальне значення для якості та безпеки цільового продукту, санітарна підготовка підприємства відіграє одну з ключових ролей. Проведення санітарно-гігієнічної підготовки є однією з обов'язкових частин підготовки підприємства. Вона спрямована на забезпечення максимальної стерильності виробничого процесу та мінімізації ризиків контамінації на всіх його етапах. Санітарна підготовка виробництва включає в себе роботи з підготовки персоналу, миючих та дезінфікуючих розчинів, приміщень, обладнання й устаткування та аераційного повітря.

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Окрему увагу під час санітарної підготовки підприємства необхідно звертати на підготовку персоналу, адже взуття, одяг та руки персоналу є одними з основних джерел контамінації на підприємстві. Дана стадія включає в себе проведення навчання та необхідних інструктажів для персоналу при прийомі на роботу, а також в подальшому проведення навчання для підвищення кваліфікації не рідше одного разу на рік; після проходження навчання та інструктажу складання працівниками іспиту, що підтверджує їх кваліфікацію та засвоєння пройденого матеріалу (наприклад, у форматі тестів, письмової роботи чи усної співбесіди); проходження медогляду перед прийомом працівника на роботу, а також не рідше разу на рік під час роботи; санітарно-гігієнічну підготовку персоналу, відповідно до правил належної виробничої практики, що діють на біотехнологічному підприємстві; а також належну підготовку технологічного одягу.

Персонал має бути проінформований про правила особистої гігієни, дотримуватись їх згідно з протоколами та не порушувати їх. Перед початком виробничого процесу та одяганням технологічного одягу, яким має бути

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Розроб.</i>		Гіріна А.С.					77	13
<i>Перевір.</i>		Грегірчак Н.М.				Кафедра БТМ		
<i>Консульт.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.						

забезпечений кожен працівник, працівники зобов'язані ретельно вимити руки протягом 2 хв, використовуючи відповідні мийні та дезінфікуючі засоби. Після цього працівник одягає технічний одяг, який відповідає класу чистоти в якому він працює та виконуваним операціям. Одяг має бути чистим, а в разі необхідності простерилізованим та носитись протягом нормованого часу, задля зниження ризику контамінації. Використовувані маски та рукавички мають регулярно змінюватись та стерилізуватись. Особлива увага особистій гігієні та технологічному одягу висувається до працівників, що працюють у “чистих” приміщеннях.

Також важливо контролювати імунологічний статус персоналу. В разі різкого погіршення самопочуття, працівник має припинити роботу в виробничому приміщенні для уникнення можливого погіршення якості продукції, а також з міркування імунологічної безпеки інших працівників.

ДР 1.2. Підготовка мийних та дезінфікуючих засобів

ДР 1.2.1. Підготовка засобу чистильного низькопінного з дезінфікуючим ефектом “DESOVER FN2”

Засіб використовують за призначенням для обробки та дезінфекції поверхонь приміщень, обладнання та інвентарю на біотехнологічному підприємстві. Час активації на поверхні становить 30 секунд. Для приготування робочого розчину концентрацією 2% засіб розводять з водою у співвідношенні 1:50. Для оброблення поверхонь приміщення додатково використовують тару з розпилювачем для рівномірного нанесення розчину на поверхню.

ДР 1.2.2. Підготовка засобу дезінфекційного універсального “SANDEZ”

Засіб призначений для професійного застосування при дезінфекції великих площ та обладнання на підприємствах харчової та біотехнологічної промисловості. Концентрація робочого розчину становить 0,5% для обробки гладких поверхонь та 2% для посиленої дезінфекції. Для приготування робочого розчину необхідного розвести 5 мл або 20 мл відповідно концентрованого засобу в 1 л води.

ДР 1.3. Санітарна підготовка приміщень

Санітарна підготовка приміщень включає в себе проведення генеральних та щоденних прибирань згідно з графіком та встановленого регламенту. Метою

санітарної підготовки приміщень є зведення до мінімуму забруднень (механічних, хімічних чи мікробіологічних) кінцевого продукту біосинтезу.

Інвентар для прибирання маркують та зберігають лише у відведеному для цього місці, для уникнення контамінації у виробничих приміщеннях.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання проводиться на всіх виробничих ділянках після кожної зміни. Прибирання проводять вологим способом в певній послідовності: з приміщення видаляють готову продукцію; за необхідності прибирають виробничі відходи, розсипані порошки та інші механічні відходи, пролиті рідин; після цього вносять в приміщення, де проводять вологе прибирання, необхідний для цього інвентар та мийно-дезінфікуючі розчини; проводять вологе прибирання стін, підлоги, дверей та всіх поверхонь, що є в приміщенні, за необхідності також обробляють стелю; промивають теплою водою та проводять дезобробку; проводять УФ-опромінення за відсутності людей у приміщенні.

Щоденне прибирання проводять в спеціальному технічному одязі: чоботах, фартусі та гумових рукавицях для уникнення взаємодії шкіри працівників з засобами. Для вологого прибирання поверхонь використовують паралонові губки.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять кожного тижня або негайно в той же день, в разі виявлення бактеріальної контамінації.

Генеральне прибирання приміщень включає в себе миття вікон теплою водою з використанням мийного засобу та миття підлоги теплою водою з використанням мийного засобу після чого проводять її дезобробку, починаючи з найвіддаленішої від дверей точки приміщення. Також проводять відповідну підготовку технологічного обладнання та устаткування. Для миття використовують паралонові губки та безворсові серветки, встановлені державним стандартом, а для миття підлоги використовують ганчірки виготовлені з сурових тканин світлого кольору.

Після вологої обробки приміщень проводять дезінфекційну обробку відповідними розчинами.

ДР 1.4. Санітарна підготовка обладнання і комунікацій

Для забезпечення необхідної чистоти технологічного обладнання та комунікацій та збереження належного санітарно-гігієнічного стану на виробництві необхідно проводити регулярне миття та періодичне зовнішнє дезінфікування обладнання та комунікацій згідно з встановленими нормами на підприємстві та державних стандартів. Санітарну підготовку обладнання та комунікацій проводять до початку або після завершення технологічної операції. У деяких випадках також допускається проведення підготовки в кінці зміни. Підготовка обладнання складається з декількох послідовних етапів.

Правильна санітарна підготовка устаткування дозволить мінімізувати ризик контамінації цільового продукту, а також знизити небезпеку для персоналу в разі виявлення несправності обладнання під час його огляду.

ДР 1.4.1. Миття обладнання і комунікацій

Перед початком миття обладнання відключають від електричного струму. Обробку проводять теплою водою $(45\pm 5)^{\circ}\text{C}$ з мийним засобом (“DESOVER FN2”). Обробку обладнання проводять протягом 20-30 хв для виділення білково-жирових забруднень, або забруднень неорганічного походження.

Зовнішню частину обладнання оброблять так само, як і виробничі приміщення.

ДР 1.4.2. Дезінфекція та ополіскування обладнання і комунікацій

На наступному етапі проводять дезінфекцію та ополіскування обладнання. Ополіскування проводять питною водою $(70\pm 5)^{\circ}\text{C}$ для видалення залишків мийного засобу і висушують, або протирають обладнання насухо.

ДР 1.4.3. Технічний огляд

Перед подальшою підготовкою обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення технічних пошкоджень та несправностей, що можуть нести загрозу для працівників або становити ризик контамінації продукції. В разі виявлення дефектів обладнання або комунікацій необхідно терміново їх усунути.

ДР 1.4.4. Перевірка на герметичність

Перед стерилізацією обладнання, що підлягає стерилізації (інокулятори та ферментер), його перевіряють на герметичність. Для цього апарати закривають та

подають в апарат аераційне повітря. Апарат вважається герметичним, якщо тиск в ньому не змінюється протягом 30 хв. В разі виявлення виходу повітря в місцях з'єднання та зниження тиску в апараті протягом 30 хв, необхідно виявити та усунути дефект перед початком стерилізації. Зазвичай для цього необхідно підтягнути різьбове з'єднання.

Найпростішим способом виявлення місця виходу повітря з апарату, де порушена герметичність – є нанесення на місця з'єднання кришки, вентилів тощо, мильних розчинів. Після цього в апарат подається аераційне повітря. В разі виникнення в цих місцях невеликих бульбашок повітря, це місце фіксують та усувають дефект.

ДР 1.4.5. Стерилізація обладнання

Стерилізація обладнання разом з комунікаціями здійснюється гострою парою температурою $130\pm 5^{\circ}\text{C}$ та тиском $0,3\pm 2$ МПа протягом 60 хв. Початком стерилізації вважається час досягнення необхідно температури стерилізації. Під час стерилізації забезпечують наявність надлишкового тиску в апараті, що скидається через вихлопну лінію, а утворений конденсат зливають.

Після завершення стерилізації припиняють подачу гострої пари та охолоджують апарат.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

Повітря, яке подається в ферментер для аерації має бути стерильним, стисненим та мати температуру близьку до температури культивування *Leuconostoc mesenteroides* (30°C).

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником (ПЗ-1), який встановлений на висоті 3 м над дахом виробничого приміщення.

ДР 2.2. Попередня очистка атмосферного повітря

Попередню очистку атмосферного повітря від грубих механічних домішок здійснюють за допомогою фільтру попередньої очистки (Ф-2), які встановлюють

перед компресором. Це є найпростішим способом очищення повітря. Ступінь очищення повітря після цього етапу становить 85-90%.

ДР 2.3. Компресування попередньо очищеного повітря

На цьому етапі повітря стискають до 0,35 МПа за допомогою компресора (К-3), для подолання опору в системі підготовки повітря, подолання тиску стовпа води та створення надлишково тиску в ферментері. Під час компресування повітря нагрівається до температури 120-250 °С.

ДР 2.4. Виділення зайвої вологи з повітря

Повітря переохолоджують у теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) до температури 25-30 °С для виділення зайвої вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), рівень вологи має становити 60-70%, а також усувають пульсацію повітря, яка може негативно впливати на роботу подальших фільтрів, що встановлюються для очищення повітря.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівають у теплообміннику-нагрівачі (Т-6) до температури 30 °С для попередження утворення пари на волокнах фільтра.

ДР 2.6. Очищення повітря на головному фільтрі

Далі повітря подається на головний фільтр (Ф-7), де відбувається основне очищення аераційного повітря від забруднень. Ступінь очищення повітря становить 94-97%.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

На фінальному етапі підготовки аераційного повітря, його подають на індивідуальний фільтр (ІФ-8). На цьому етапі відбувається очищення повітря від забруднень, які були пропущені на попередніх етапах очищення, або випадково потрапили в систему. Ступінь очищення повітря – максимальний, $E=99,9995\%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування 6%-го розчину НСІ

Розчин соляної кислоти використовують під час стерилізації композиції солей, додаючи його до композицій солей перед стерилізацією, для запобігання випадення осаду фосфорних солей. Для цього використовують 6%-й розчин соляної кислоти,

який не потребує попередньої стерилізації, так як буде стерилізуватись безпосередньо з композицією солей. Для приготування 1 л 6%-го розчину HCl необхідно провести розведення 36%-го розчину концентрованої соляної кислоти.

$V_1 = (1000 \times 6) / 36 = 167$ мл – 36%-го розчину концентрованої соляної кислоти.

$V_2 = 1000 - 167 = 833$ мл – води.

За допомогою мірного циліндру відміряють 167 мл 36%-го розчину концентрованої соляної кислоти та 833 мл дистильованої води. Після чого компоненти змішують.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчину NaOH

Розчин NaOH використовують після стерилізації композиції солей для стабілізації рН середовища, а також на етапі виробничого біосинтезу, для доведення значення рН поживного середовища до 7,0.

Для приготування 2 л 6%-го розчину NaOH необхідно використати:

$V_1 = 6 / 100 \times 2000 = 120$ г – NaOH;

$V_2 = 2 - 0,12 = 1,88$ л – води.

На технічних терезах в попередньо відтарованому хімічному стакані зважують 120 г NaOH. За допомогою мірного циліндру відміряють 1,88 л дистильованої води. Після чого компоненти змішують та стерилізують 6%-й розчин NaOH, при температурі 131°C, протягом 40 хвилин, 0,15 МПа.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На аналітичних терезах в попередньо відтарованому хімічному стакані зважують 5 г пептона. Наважку пептону переносять у колбу на 2 л, додають 50 мл холодної питної води та перемішують для того, щоб суспендувати пептон. Після цього на аналітичних терезах в попередньо відтарованому хімічному стакані зважують 50 г сахарози та 5 г дріжджового екстракту. Наважку переносять у колбу, додають 750 мл питної води та перемішують. Колбу закривають та стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На аналітичних терезах у відтарованому хімічному стакані зважують 0,05 г NaCl, 0,05 г CaCl₂, 0,01 г MnCl₂×H₂O. Наважку переносять в колбу на 750 мл, додають 55 мл питної води та перемішують. Після цього колбу закривають та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На аналітичних терезах у відтарованому хімічному стакані зважують 15 г K₂HPO₄, після чого наважку переносять в колбу на 750 мл, додають 70 мл питної води, перемішують. Колбу закривають та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживних середовищ для посівного апарату об'ємом 15 л

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах в попередньо відтарованому хімічному стакані зважують 45 г пептона. Наважку пептону переносять у колбу на 2 л, додають 500 мл холодної питної води та перемішують для того, щоб суспендувати пептон. Після цього через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-9) в реактор (Р-10) подається 450 г сахарози та 45 г дріжджового екстракту. Суспендований пептон також переносять у реактор, додають 5,9 л питної води. Реактор закривають та стерилізують композицію при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

Приготування і стерилізація композиції відбувається безпосередньо в інокуляторі (ІН-12), куди вносять 0,45 г NaCl, 0,45 г CaCl₂, 0,09 г MnCl₂×H₂O та 135 г K₂HPO₄, 1,9 л питної води. Додають 4 мл 6%-го розчину HCl(від ДР 3.1), після чого рН композиції має становити 4,0. Реактор закривають та стерилізують при температурі 131°C, 40 хв. Після стерилізації додають 18 мл стерильного 6%-го розчину NaOH(від ДР 3.2) для підлуження поживного середовища, рН композиції має становити 7,0.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживних середовищ для посівного апарату об'ємом 100 л

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-13) в реактор (Р-14) вносять 500 г пептона, додають 5 л холодної питної води для того, щоб суспендувати пептон. Після цього через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-13) додають 5 кг сахарози та 500 г дріжджового екстракту та 35 л питної води. Після подачі компонентів реактор закривають та стерилізують при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

В інокулятор (ІН-16), де відбувається змішування та стерилізація компонентів композиції, вносять 5 г NaCl, 5 г CaCl₂, 1 г MnCl₂×H₂O та 1,5 кг K₂HPO₄, додають 12,49 л питної води. Перед початком стерилізації вносять 28 мл 6%-го розчину HCl (від ДР 3.1.) та доводять рН композиції до 4,0. Композицію стерилізують при температурі 131°C, 40 хв. Після стерилізації додають 120 мл стерильного 6%-го розчину NaOH (від ДР 3.2.) для підлуження та доводять рН середовища до 7,0.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживних середовищ для ферментера об'ємом 1 м³

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-17) в реактор (Р-18) вносять 5 кг пептона, додають 50 л холодної питної води для суспендування пептону. Після цього додають 50 кг сахарози, 5 кг дріжджового екстракту, 250 л води. Реактор закривають та стерилізують при температурі 112°C, 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

У ферментер (Ф-23) вносять 50 г NaCl, 50 г CaCl₂, 10 г MnCl₂×H₂O та 15 кг K₂HPO₄. Наважку переносять у реактор та додають 124,9 л питної води. Перед стерилізацією додають 280 мл 6%-го розчину HCl (від ДР 3.1), доводять рН композиції до 4,0. Стерилізують при температурі 131°C протягом 40 хв. Після стерилізації додають 1200 мл стерильного 6%-го розчину NaOH (від ДР 3.2.).

ДР 5. Приготування та стерилізація підживлювального розчину сахарози

ДР 5.1. Приготування 40%-го підживлювального розчину сахарози

Через об'ємно-ваговий дозатор (ДЗ-19) в реактор (Р-20) вносять 60 кг сахарози та 90 л питної води.

ДР 5.2. Стерилізація 40%-го підживлювального розчину сахарози

Після подачі всіх необхідних компонентів, реактор закривають, всі компоненти перемішуються. Стерилізують розчин при температурі 112°C, протягом 30 хв.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 зберігають в запаяних під вакуумом ампулах у висушеному стані, у темряві, при температурі 4 °С. В такому стані клітини молочнокислих бактерій можуть зберігатись до 10-ти років без втрат активності. Реактивація клітин полягає в додаванні до них 0,2–1 мл стерильної води.

ТП 6.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігалась в ампулах, пересівають до ізольованих колоній на чашки Петрі з середовищем МРС, попередньо реактивувавши культуру. Вирощують в термостаті при температурі 25 °С, 48 год.

ТП 6.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 6.2.) пересівають петлею в пробірки з середовищем МРС (в одну пробірку засівають одну ізольовану колонію). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при температурі 25 °С, 24 год.

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу для засіву колб на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) зливають простерилізовані композиції Б, В (від ДР 4.1.2., ДР 4.1.3.), перемішують та розливають у колби на качалках об'ємом 750 мл, по 200 мл в кожену колбу.

У пробірку з робочою культурою *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 (від ТП 6.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби на качалках з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують

бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках, з частотою обертання 250 об/хв при температурі 25 °С протягом 24 год.

ТП 6.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л

В посівний апарат об'ємом 15 л (І-12) в асептичних умовах вносять 7 л композиції А (від ДР 4.2.1.) та 2 л композиції Б (від ДР 4.2.2.). Вмикають перемішувачий пристрій і доводять значення рН до 7. Через засівну колбу вносять 0,8 л посівного матеріалу від ТП 5.4. Культивування проводиться протягом 18 годин при температурі 25±1 °С при постійному перемішуванні з частотою обертання 250 об/хв та подачею очищеного повітря для аерації.

ТП 6.6. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л

В посівний апарат об'ємом 100 л (І-16) переносять 46 л композиції А (від ДР 4.3.1.) та 14 л композиції Б (від ДР 4.3.2.). Перемішують за допомогою перемішувачого пристрою і доводять значення рН до 7,0. За допомогою труби перетискування вносять 60 л посівного матеріалу від ТП 5.5. Культивують протягом 18 годин при температурі 25±1 °С при постійному перемішуванні з частотою обертання 250 об/хв та подачею очищеного повітря для аерації.

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування в ферментері об'ємом 1 м³

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з об'ємом 1 м³, з коефіцієнтом заповнення 0,6.

У попередньо простерилізований ферментер (ФР-23) об'ємом 1 м³ за перекачують простерилізоване поживне середовище (від ДР 4.4.1., ДР 4.4.2.). Вмикають перемішувачий пристрій, значення рН середовища за показником датчика має становити 7,0. Через трубу перетискування перекачують з посівного апарату інокулят (від ТП 6.6) і вмикають перемішувачий пристрій, яким слугує відкрита турбінна мішалка, якою обладнаний ферментер. Стерильний 40%-й підживлювальний розчин сахарози (від ДР 5.2.) подають через насос перистальтичний (Н-21) на 6 та 12 год культивування, порціями по 75 л. Культивування проводять протягом 22±2 год, до концентрації біомаси 24 г/л, при цьому виробничий біосинтез припиняється при значенні рН 4,0. Культивування

проводять при температурі 30 ± 1 °С, з частотою обертання перемішуючого пристрою 350 об/хв і постійною аерацією. Також в ферментері створюється надлишковий тиск ($P = 0,02-0,05$), за рахунок подачі стерильного стисненого повітря.

З дотриманням правил асептики з ферментеру кожні 3 год відбирають проби, в якій аналізують: концентрацію біомаси, вміст джерела вуглецю, азоту та мікробіологічну чистоту.

ТП 8. Виділення біомаси

ТП 8.1. Центрифугування культуральної рідини

Після виробничого біосинтезу першим етапом післяферментаційного виділення цільового продукту є центрифугування культуральної рідини. На даному етапі біомаса відділяється від фугата. Центрифугування відбувається у центрифугі протягом 15 хв, при 5000 об/хв. Після чого фугат видаляється, а відділення біомаса направляється до наступного технологічного етапу.

ДР 9. Приготування захисного середовища

ДР 9.1. Приготування та стерилізація захисного середовища

На наступному етапі необхідно підготувати біомасу до подальших етапів виділення. Для цього у реакторі змішувачі готують та стерилізують захисне середовище. Для цього додають 1,3 кг сухого знежиреного молока, 4,3 кг фосфатного буферу, 3 кг мініту та, додаючи питну воду, доводять загальний об'єм до 43 л. Після цього реактор закривають та стерилізують при 112-115°C, тиску 0,05 МПа протягом 20-30 хв. Після стерилізації та вистигання захисного середовища

ТП 10. Змішування захисного середовища середовища з біомасою

ТП 10.1. Змішування захисного середовища середовища з біомасою

Після завершення стерилізації та вистигання захисного середовища до нього додають біомасу. Змішування проводять в реакторі з частотою обертів мішалки 100 об/хв, протягом 20-30 хв. Співвідношення біомаси до захисного середовища має становити 1:2 відповідно.

ТП 11. Сушіння готового препарату

ТП 11.1 Заморожування готового препарату

На кювети виливають готовий препарат та відправляють до сублімаційної сушарки. Сушарку закривають та починають процес заморозки готового препарату який триває протягом 24 год, при температурі $-55\pm 5^{\circ}\text{C}$.

ТП 11.2 Сублімаційне сушіння готового препарату

Перед початком сублімаційного сушіння всередині апарату необхідно досягти певного тиску. Для цього використовується вакуумний насос. Під час сушіння тиск має становити 0,001-0,003 атм. Процес сублімаційного сушіння триває 24 год, при температурі $30\pm 5^{\circ}\text{C}$.

В загальному процес сублімаційного сушіння триває 48 год. Після завершення даного процесу, коли тиск всередині апарату нормалізується, кювети з готовим продуктом вивантажують та направляють на наступний технологічний етап.

ТП 12. Подрібнення висушеного препарату

ТП 12.1 Подрібнення та просіювання висушеного препарату

Враховуючи те, що після сублімаційного сушіння у кюветах утворюються цілісні пласти висушеного продукту – необхідним етапом є подрібнення даного препарату. Для цього використовують молоткову дробарку, яка оснащена ситом з діаметром пор 0,1 мм. Відповідно, після подрібнення готовий продукт одразу просіюється та на наступний етап вже потрапляють частинки регламентованого розміру.

ПМВ 13. Пакування та маркування

ПМВ 13.1 Пакування готового продукту

Отриману суху заквашувальну композицію поміщають в фасувально-пакувальну машину де пакують в саше пакети по 5 г в кожний.

ПМВ 13.2 Маркування готового продукту

На останньому технологічному етапі на запаковані саше пакети з готовою заквашувальною композицією наносять необхідні маркування, що відповідають вимогам ДСТУ. На саше пакети наносять дату виготовлення продукту, термін зберігання, а також номер серії та партії. Після цього продукт, готовий до реалізації, відправляється на склад для зберігання та подальшого транспортування.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж всього технологічного процесу біосинтезу біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 проводять необхідний контроль виробництва. Наприклад, на етапі виробничого біосинтезу, дотримуючись правил асептики, з ферментеру кожні 3 год відбирають проби, в якій аналізують наступні показники: концентрацію біомаси, вміст джерела вуглецю, азоту та мікробіологічну чистоту.

8.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Карта контрольних точок виробничого біосинтезу біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кх 1.2.1 <i>Підготовка засобу чистильного низькопінного з дезінфікуючим ефектом "DESOVER FN2"</i>	Готовий засіб після приготування, концентрація розчину	Хімічний контроль	Перевірка концентрації розчину проводить після його приготування	C=2%
Кх 1.2.2 <i>Підготовка засобу дезінфекційного універсального "SANDEZ"</i>	Готовий засіб після приготування, концентрація розчину	Хімічний контроль	Перевірка концентрації розчину проводить після його приготування	C=0,5%
Км 1.3.1 <i>Щоденне прибирання</i>	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Мікробіологічний контроль	Після проведення щоденного прибирання	КУО < 800/см ²

<p>НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ</p>				
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>		Гіріна А.С.		
<i>Перевір.</i>		Грегірчак Н.М.		
<i>Консульт</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.		
<p>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</p>			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>
				90
			<p>Кафедра БТМ</p>	
			<i>Аркцшів</i>	24

Продовження табл. 8.1

Км 1.3.2 <i>Генеральне прибирання</i>	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Мікробіологічний контроль	Після проведення генерального прибирання	КУО < 300/см ²
Кт 1.4.1 <i>Миття обладнання та комунікація</i>	Мийно-дезінфікуючий розчин, температура, час	Термометр, годинник	Під час проведення миття обладнання та комунікацій	T=45 ±5°C, t = 30 хв
Кт 1.4.2 <i>Дезінфекція та ополіскування обладнання і комунікацій</i>	Мийно-дезінфікуючий розчин, температура, час	Термометр, годинник	Під час проведення обробки обладнання та комунікацій	T=75 ±5°C, t = 45 хв
Кт 1.4.4 <i>Перевірка на герметичність</i>	Обладнання, герметичність, час, тиск	Манометр, годинник	Перед початком технологічного процесу, безперервне визначення тиску під час перевірки	t = 30 хв, P = 0,07 МПа
Кт 1.4.5 <i>Стерилізація обладнання</i>	Обладнання під час стерилізації, час, тиск, температура	Годинник, манометр, термометр	Контроль показників безпосередньо під час стерилізації	t=60 хв, P=0,07 МПа, T=130±5°C
Кт 2.2 <i>Попереднє очищення атмосферного повітря</i>	Повітря на виході з фільтрів попередньої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтру	Після очищення повітря у фільтрі попередньої очистки (грубої очистки)	E=80%, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 <i>Компресування попередньо очищеного повітря</i>	Стиснене повітря, тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування попередньо очищеного повітря	P=0,35 МПа, T=120-250 °C

Продовження табл. 8.1

Кт 2.4 <i>Виділення зайвої вологи</i>	Охолоджене повітря, температура, повітря після виділення зайвої вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря та після виділення зайвої вологи з повітря	T =20-30 °C, W=60-70%
Кт 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Повітря після нагрівання, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагрівання повітря	T=50 °C, W=50%
Кт 2.6 <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтру	Після очистки повітря на головному фільтрі	E=94%, тиск згідно паспорту
Кт 2.7 <i>Очищення повітря на індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтру	Під час очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E=99,99%
Кт, Кх 3.1 <i>Приготування 6%-го розчину НСІ</i>	Приготований розчин, концентрація	Хімічний метод, контроль технічний	Після приготування розчину	C=6% m=1 л
Кт, Км 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для виращування інокуляту</i> <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний метод	Під час стерилізації визначення температури, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль	T=112°C, t=30 хв, відсутність мікробіоти

<p>КТ, Км 4.1.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б</p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний метод</p>	<p>Під час стерилізації визначення температури, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль</p>	<p>T=131°C,</p> <p>t=40 хв,</p> <p>відсутність мікробіоти</p>
<p>КТ, Км 4.1.3</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В</p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний метод</p>	<p>Під час стерилізації визначення температури, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль</p>	<p>T=131°C,</p> <p>t=40 хв,</p> <p>відсутність мікробіоти</p>
<p>КТ, Км 4.2.2, 4.3.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б</p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний метод</p>	<p>Під час стерилізації визначення температури, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль</p>	<p>T=131°C,</p> <p>t=40 хв,</p> <p>pH=4,0,</p> <p>відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 4.4.1</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А</p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний метод</p>	<p>Під час стерилізації визначення температури, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль</p>	<p>T=112°C,</p> <p>t=30 хв,</p> <p>відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.4.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б</p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний метод</p>	<p>Під час стерилізації визначення температури, після стерилізації здійснюється мікробіологічний контроль</p>	<p>T=131°C,</p> <p>t=40 хв,</p> <p>pH=4,0,</p> <p>відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1, 5.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація 40%-го підживлювального розчину сахарози</i></p>	<p>Приготований розчин, концентрація, температура, час, стерильність</p>	<p>Хімічний метод, мікробіологічний метод контролю</p>	<p>Після приготування розчину</p>	<p>T = 112 °C,</p> <p>t = 30 хв,</p> <p>C =6%,</p> <p>m= 150 л,</p> <p>відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.1</p> <p><i>Підтримання колекційної культури</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CMG713</p> <p>Температура, час, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти та неконтрольованих мутацій</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час підтримання колекційної культури визначається температура, час, здійснюється мікробіологічний контроль 1-2 рази на місяць</p>	<p>T=4°C,</p> <p>t=до 10ти років,</p> <p>відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 6.2</p> <p><i>Одержання колекційної культури</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CMG713</p> <p>Температура, час, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти та неконтрольованих</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час одержання колекційної культури визначається температура, час, кожні 8 год здійснюється мікробіологічний контроль</p>	<p>T=25°C, t=48 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.3</p> <p><i>Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CMG713</p> <p>Температура, час, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти та неконтрольованих</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час одержання вирощування інокуляту визначається температура, час, кожні 8 год здійснюють мікробіологічний контроль</p>	<p>T=25°C, t=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.4</p> <p><i>Вирощування посівного матеріалу для колб на качалках</i></p>	<p>Посівний матеріал, температура, час вирощування, морфологічна відповідність мікроорганізмів</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура вимірюється та підтримується під час вирощування, мікробіологічний контроль здійснюється кожні 8 год</p>	<p>T=25°C, t=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Продовження табл. 8.1

<p>Кт, Км 6.5</p> <p><i>Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л</i></p>	<p>Посівний матеріал, температура, час вирощування, частота обертання мішалки, рівень рН, морфологічна відповідність мікроорганізмів</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>рН вимірюється безпосередньо перед вирощуванням, температура та швидкість обертання мішалки вимірюється та підтримується під час всього вирощування, мікробіологічний контроль здійснюється кожні 8 год</p>	<p>$T=25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$,</p> <p>$t=18 \text{ год}$,</p> <p>$\omega = 250 \text{ об/хв}$</p> <p>$\text{pH}=7,0$,</p> <p>відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.6</p> <p><i>Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л</i></p>	<p>Посівний матеріал, температура, час вирощування, частота обертання мішалки, рівень рН, морфологічна відповідність мікроорганізмів</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>рН вимірюється безпосередньо перед вирощуванням, температура та швидкість обертання мішалки вимірюється та підтримується під час всього вирощування, мікробіологічний контроль здійснюється кожні 8 год</p>	<p>$T=25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$,</p> <p>$t=18 \text{ год}$,</p> <p>$\omega = 250 \text{ об/хв}$</p> <p>$\text{pH}=7,0$,</p> <p>відсутність сторонньої мікробіоти</p>

КТ, КМ, КХ 7.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³</i>	Культуральна рідина, температура, час культивування, частота обертання мішалки, рівень рН, мікробіологічна відповідність культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль	рН вимірюється безпосередньо перед вирощуванням, температура та швидкість обертання мішалки вимірюється та підтримується під час всього вирощування, мікробіологічний контроль здійснюється кожні 8 год	T=30 ± 1 °C, t=18 год, рН=7,0, ω = 350 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
--	---	---	---	---

8.2. Мікробіологічний контроль

Враховуючи те, що культивування бактерій *Leuconostoc mesenteroides* SMG713 проводиться в асептичних умовах, надзвичайно важливо здійснювати мікробіологічний контроль на всіх етапах для забезпечення виробництва цільового продукту належної якості. Основним мікробіологічним контролем є: контроль стерильності поживних середовищ та контроль посівного матеріалу.

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Після стерилізації поживного середовища відбирається проба об'ємом 50 мл, для здійснення мікробіологічного контролю, шляхом прямого розсівання проби на чашки Петрі. Так як в стерильному поживному середовищі виявляють сторонні гриби, дріжджі та бактерії – поживне середовище в чашках Петрі має бути відповідним: СА – для виявлення грибів та дріжджів; МПА – для виявлення бактерій.

Чашки Петрі стерилізують у сухожаровій шафі при температурі 160-180 °C, протягом 2 год. Метод стерилізації сухим жаром базується на коагуляції клітинних білків, що забезпечує загибель спорових та неспорових форм мікроорганізмів [67]. Після стерилізації в чашки Петрі розливають по 20-30 мл відповідного поживного середовища (СА та МПА), яке було попередньо приготоване та нагрітого на водяній

бані до 50-60 °С. Чашки Петрі залишають на горизонтальній поверхні для рівномірного застигання поживного середовища. Потім їх витримують при температурі 30 °С кришками донизу для підсихання поверхні середовища в термостаті [88].

Після цього стерильною піпеткою відбирають по 0,1 мл проби та здійснюють розсіви на чашки Петрі з середовищами МПА та СА. Стерильним шпателем Дригальського рівномірно розподіляють пробу по поверхні поживного середовища [53]. Піпетки та шпателі попередньо стерилізують у сухожаровій шафі при температурі 160-180 °С, протягом 2 год [67]. Чашки Петрі з готовими розсівами поміщують у термостат, при температурі 30 °С, попередньо загорнувши в папір. Аналіз посіву здійснюють починаючи з 6-8 год, для цього візуально визначають на поверхні поживних середовищ відсутність ознак росту мікроорганізмів [53].

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу здійснюється за допомогою методу прямого мікроскопіювання, визначаючи морфологічні ознаки клітин та їх відповідність морфологічним ознакам цільового продукту. Для цього використовують світловий мікроскоп з імерсійною системою зі збільшенням x90.

На центральну частину чистого предметного скла, в асептичних умовах, стерильною бактеріальною петлею наносять краплю відібраної культуральної рідини, розподіляють по поверхні скла та дають висохнути на повітрі. Петлі попередньо стерилізують за допомогою фламбування над полум'ям пальника. Сухий препарат вміщують на предметний столик, на центральну ділянку препарату наносять краплю імерсійної олії. Опускають тубус мікроскопу, під зоровим контролем, щоб фронтальна лінза опустилась в краплю олії, але не торкалась препарату. Повільно обертаючи макрогвинт підіймають тубус до появи зображення. Після цього, за допомогою обертання мікрогвинта, фокусують зображення, щоб воно було чітким.

Після завершення мікроскопіювання слід ретельно очистити лінзу мікроскопу. Для цього спершу її обережно очищають фільтрувальним папером, а потім змочену у спирті ваткою [89].

Під час мікроскопіювання, за відсутності у зразку сторонньої мікробіоти, можна побачити клітини *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Це грампозитивні бактерії, які мають сферичну, дещо витягнуту форму клітин, розміром 0,5-0,7 x 0,7-1,2 мкм. Вони є нерухомими, а також не утворюють спори. Зазвичай, клітини *Leuconostoc mesenteroides* розміщуються на поживному середовищі довгими ланцюгами з клітин. Однак, залежно від умов культивування клітини можуть розташовуватись попарно, або подвійними ланцюгами [10]. Слід зазначити, що умови культивування, а саме склад і консистенція поживних середовищ, впливають на морфологію *Leuconostoc mesenteroides*. При культивуванні на молоці, або на поживному середовищі з додаванням молока клітини будуть мати кокоподібну форму і будуть вишиковуватись в ланцюжки. Якщо проводити культивування в бульйоні – клітини можуть подовжуватись і навіть можуть набувати вигляду паличок [8].

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Концентрація біомаси

Визначити концентрацію біомаси молочнокислих бактерій *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 можливо декількома методами: нефелометричним та ваговим методом, які найчастіше зустрічаються на практиці.

Визначення біомаси ваговим методом складається з трьох послідовних етапів:

1. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення. Для цього фільтри, покладені в чашку Петрі, або центрифужні пробірки розміщують у сушильну шафу й висушують протягом 1-2 год, при температурі 80-85°C й 90-100°C відповідно. Чашки Петрі або пробірки виймають з сушильної шафи й переносять в ексікатор з безводним хлористим кальцієм або концентрованою сірчаною кислотою. Через годину в ексікаторі, фільтри або центрифужні пробірки зважують з точністю до 0,0001 г, використовуючи аналітичні ваги. Так як масу потрібно довести до постійного значення, описанні вище операції: висушування та зважування повторюють до того моменту, поки коливання в значеннях зважування не перевищуватиме $\pm 0,0001$ г між двома послідовними повторами.

2. Відокремлення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини. Для цього використовують центрифугування у центрифугу. В центрифужну пробірку наливають ретельно перемішаної рідкої культури від 5 до 20 мл в залежності від щільності. Найчастіше центрифугують від 15 до 20 хв, при 5-10 тис. обертів/хв. Після завершення центрифугування надосадову рідину зливають, а осад промивають підкисленою дистильованою водою. Воду підкислюють 1 мл концентрованої HCl на 1 л води. Після цього знову поміщають у центрифугу та центрифугують ще 15-20 хв при 5-10 тис обертів/хв. Після завершення центрифугування необхідно швидко злити супернатант для запобігання загублення частини осаду. Після цього відбирають 5 мл осаду на мембранні фільтри та промивають підкисленою водою, при цьому фільтри розміщують на пористу пластину спеціального тримача.

3. Визначення біомаси. Після проведення підготовчих етапів можна визначати масу сухих клітин. Для цього фільтр із осадом клітин розміщують у сушильній шафі, де їх висушують впродовж 1-2 год, при температурі 80-85°C й 90-100°C відповідно, а потім зважують на аналітичних вагах. Кількість сухої біомаси визначають за формулою:

$$M = \frac{(A-B)1000}{V}, \quad (8.1)$$

де M-суха біомаса, г/л; A - маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом, г; B - маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду, г; V - обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування), мл.

Найчастіше даним методом визначають масу сухих клітин, однак можна визначити і вологу біомасу. Для цього в вище описаній методиці слід пропустити перший етап визначення. Необхідно лише зважити фільтр або центрифужну пробірку. Точність методу визначається якістю відмивання клітин від середовища та якістю зважування [80].

Інший метод, який використовують для визначення концентрації біомаси *Leuconostoc mesenteroides* є нефелометричний метод. Перевага даного методу в тому, що він автоматизований, через що точність досить висока, та базується на вимірюванні інтенсивності світла, що проходить крізь суспензію клітин. Цей метод

можна використовувати в разі утворення культурами рівномірної каламутної маси, що підходить для молочнокислих бактерій, однак не підходить для культур, які утворюють осад.

Для проведення даного методу визначення пробу культуральної рідини перемішують та піпеткою вносять у кювету об'ємом 5 мл задля вимірювання оптичної густини на спектрофотометрі за довжини хвилі 540 нм. Ці ж самі дії повторюють для попередньо відібраного поживного середовища. Для цього також вносять у кювету та поміщують в спектрофотометр за довжини хвилі 540 нм.

Кількість біомаси молочнокислих бактерій, в тому числі *L. mesenteroides*, визначають як різницю між оптичною густиною культуральної рідини та поживного середовища, виміряною на спектрофотометрі[90].

8.3.2. Концентрація цільового продукту

У нашому випадку цільовим продуктом є біомаса бактерій *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Для підрахунку концентрації живих клітин використовують декілька методів кількісного обліку мікроорганізмів: метод Коха, прямий підрахунок з використанням лічильних камер, та облік на фіксованих препаратах.

Метод Коха є найпоширенішим в лабораторній практиці. Суть даного методу полягає в тому, що проводять висів певного об'єму досліджуваного матеріалу на агаризовані поживні середовища в чашки Петрі. При подальшому вирощуванні утворюються колонії, кількість яких підраховується. Робота з таким методом включає три послідовні етапи: приготування розведень, висів на агаризоване поживне середовище, підрахунок колоній. Зазвичай готують ряд послідовних десятикратних розведень досліджуваного субстрату, у стерильній воді або фізіологічному розчині (1:10, 1:100, 1:1000 і т. д.). Для приготування кожного розведення обов'язково використовують нову піпетку, для уникнення помилкових результатів. Це пов'язано з адсорбцією клітин мікроорганізмів на стінках піпетки, в наслідок чого не всі клітини видаляються під час попередніх розведень.

У стерильні чашки Петрі наливають 20 мл поживного середовища, нагрітого до температури 50-60 °С на водяній бані. Чашки залишають на горизонтальній поверхні до застигання поживного середовища. Посіви роблять з певних розведень,

в залежності від передбачуваної кількості мікроорганізмів. Стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл відповідного розведення, яке перед цим було ретельно перемішане, та вносять на поверхню агаризованого поживного середовища.

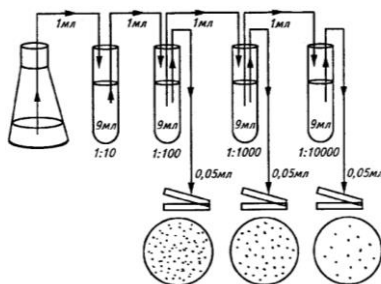


Рис. 5.2. Схема приготування розведень і посіву методом Коха [91]

Стерильним шпателем Дригальського рівномірно розподіляють суспензію по поверхні поживного середовища. При проведенні паралельних посівів з одного розведення можна використовувати одну стерильну піпеткою і один шпатель для всіх посівів. Для посівів з різних розведень, необхідно використовувати нову стерильну піпетку і шпатель. Чашки з засіяним поживним середовищем поміщають в термостат з певною, сприятливою для росту мікроорганізмів, температурою [91].

Метод прямого підрахунку мікроорганізмів з використанням лічильних камер дозволяє здійснити облік всіх клітин (і живих, і мертвих). Саме цим і зумовлене його обмежене застосування.

Краплю суспензії наносять на сітку камери і зверху накривають чистим покривним скельцем так, щоб рідина під покривним скельцем рівномірно розподілилась по сітці, без бульбашок повітря. Великими пальцями покривне скельце щільно притирають до бокових площадок камери до появи ньютонівських кілець. Камеру поміщають на предметний столик та мікроскопіюють зі збільшенням $\times 10-40$. При мікроскопіюванні одночасно має бути видно і квадратики камери, і самі мікрорганізми. Підрахунок кількості клітин проводять у п'яти великих квадратах, тобто 180 малих квадратах, розміщених по діагоналі. При цьому враховуються всі клітини, розміщені всередині квадрата і на пограничних лініях, якщо вони більшою частиною лежать всередині квадрата. Якщо клітини розділені пограничною лінією навпіл, їх рахують тільки на 2-х з 4-х меж квадрата, якщо клітини лежать більшою частиною поза даним квадратом, їх взагалі не враховують. Після підрахунку

визначають середню кількість клітин в одному квадраті, а перерахунок на 1 мл суспензії із врахуванням розведення здійснюють за формулою:

$$N = (a \cdot 1000 / h \cdot S) \cdot K, \quad (8.2)$$

де N – кількість клітин в 1 мл суспензії; a – середня кількість клітин у малому квадраті; h – глибина камери, мм; S – площа малого квадрата, мм²; K – розведення вихідної суспензії; 1000 – коефіцієнт перерахунку мм³ у мл (1 мл = 1000 мм³) [92].

Метод обліку мікроорганізмів на фіксованих препаратах. Суть методу полягає в тому, що в певному об'ємі досліджуваної суспензії підраховують кількість клітин мікроорганізмів безпосередньо у мікроскопі. Перевагою даного методу є те, що використання фіксованих мазків дає змогу зберігати препарат протягом довгого часу і можливість здійснювати підрахунок не лише під час досліду, а й після.

Для приготування фіксованого препарату 0,02-0,05 мл досліджуваної суспензії наносять мікропіпеткою на знежирене сухе предметне скло, поміщене на міліметровий папір площею 4 або 6 см². У краплю суспензією додають краплю стерильного 0,03 %-ного водного розчину агар-агару. Суспензію швидко перемішують стерильною бактеріологічною петлею та розподіляють по площі 4 або 6 см², в залежності від площі міліметрового паперу. Мазок залишають до повного висихання, фіксують 20–30 хв 96° спиртом і фарбують фуксином основним чи метиленовим синім упродовж 2 хв. Після цього промивають у кристалізаторі з водою і висушують. Підрахунок кількості мікроорганізмів здійснюють мікроскопіювання з імерсійним об'єктивом, збільшення х90-100 в квадратах окулярної сітки (не менше 10-ти полів зору), переміщаючи по діагоналі препарат [93].

8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення

Опираючись на склад поживного середовища, що використовується для біосинтезу бактерій *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 джерелом вуглецевого живлення є сахароза.

Одним з нових та перспективних методів визначення концентрації сахарози є використання біосенсорів на основі триферментної системи. У даного методу є

значні переваги перед стандартними методами визначення, а саме: простота у використанні, яка не потребує висококваліфікованого персоналу та дороговартісного обладнання, швидкість та точність результатів. Сахарозні біосенсиори розробляють для моніторингу біотехнологічних виробництв та харчової промисловості [94].

Найефективнішим серед розроблених біосенсорів для визначення сахарози є кондуктометричні біосенсиори з використанням каскаду реакцій триферментної системи, за рахунок того, що вони мають легку будову електрода, дешевизну за умови масового виробництва та не мають світлочутливості.

У дослідженні використовують супернатант, який попередньо готують фільтруванням та відділення біомаси клітин, а також біоселективні мембрани. Для виготовлення робочої мембрани готують розчин з таким вмістом ферментів: інвертаза – 4%, мутаротаза – 3%, глюкозооксидаза – 3% у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, з 10%-м гліцеролом. Суміш для приготування референтної мембрани готують так само, але замість ферментів беруть БСА (Бичачий сироватковий альбумін). Перед нанесенням на поверхню перетворювача розчини для референтної і робочої мембран змішували з 2%-м водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1 і потім суміш наносили на робочі поверхні гребінчастих електродів. Обидві мембрани мали однаковий вміст білка. Після сенсори висихували на повітрі при кімнатній температурі протягом 20 хв, до повного висихання. Перед початком роботи для вимивання надлишку глутарового альдегіду сенсор необхідно занурити у буферний розчин, в якому проводять подальші дослідження. Вимірювання проводять у 5мМ фосфатному буфері та універсальному буфері з різним рН, при кімнатній температурі, у відкритій комірці, за інтенсивного перемішування. Концентрацію субстратів у комірці задають додаючи до робочого буфера певними порціями стандартні концентровані вихідні розчини субстрату. Дослідження необхідно здійснювати щонайменше у трьох повторах. В разі виникнення неспецифічних змін вихідного сигналу, які пов'язані з коливанням температури, чи рН середовища, застосовуючи диференційний режим вимірювань [95].

Визначення концентрації джерела азотного живлення

Джерелом азотного живлення є пептон та дріжджовий екстракт, які є джерелами амінного азоту. Вміст амінного азоту визначають за допомогою мідного методу (йодометричного метода по Попу і Стівенсу).

В основі мідного методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть даного методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для того, щоб їх відділити від нерозчинного ортофосфату міді, суміш необхідно відфільтрувати. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді. Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію. В процесі реакції виділяється йод в кількості, яка еквівалентна кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який необхідно відтитрувати розчином тіосульфату натрію. 1 cm^3 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Для проведення дослідження мідним методом в мірну колбу, місткістю 50 cm^3 піпеткою вносять 5 cm^3 супернатанту, який необхідно попередньо виділити за допомогою центрифугування. Додають 3-4 краплини індикатору тімофталейну і по краплям додають розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/ dm^3 до появи блідно-блакитного забарвлення. Також порціями додають 30 cm^3 суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять до мітки дистильованою водою і фільтрують через паперовий фільтр.

Піпеткою відбирають 10 cm^3 фільтрату, який має бути абсолютно прозорим, переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, підкислюють 0,5 cm^3 80%-ї оцтової кислоти і додають 10 cm^3 розчину йодату калію. Перемішують і титрують йод, що виділився, із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/ dm^3 . В кінці титрування додають пару краплин розчину крохмалю. Кінець титрування визначають за зникненням блакитного забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При цьому досліді, вміст амінного азоту можна розрахувати за формулою:

$$X = (a * 0,28 * b * 10 * 100) / 50 \text{ (мг в } 100 \text{ см}^3 \text{ сусла)}, \quad (8.3)$$

Де X – вміст амінного азоту, а – розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³, який пішов на титрування, см³; б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, см³ [96].

8.4. Показники якості готового продукту

Якість готових заквашуваних компонентів та бактеріальної закваски молочнокислих бактерій контролюють по активності закваски, що контролюють по кислотності та тривалості сквашування, по чистоті та мікробіологічним показникам, по вмісту діацетилу та ацетоїну, а також по наявності вуглекислого газу й відсутності бактеріофага. Контроль якості цільового є критично важливою для забезпечення стабільної якості, ефективності та безпеки готового продукту[97].

Першочергово візуально визначають зовнішній вигляд готового продукту, якість та цілісність упаковки, наявність та відповідність маркування на ній. Також визначають органолептичні показники готової продукції, ообто її колір та смак.

Контроль якості заквашувальної композиції проводять в наступному порядку:

1. Визначення активності заквашувального препарату (кислотність та тривалість сквашування);
2. Визначення вмісту діацетилу і ацетоїну ;
3. Визначення наявності вуглекислого газу;
4. Визначення наявності бактеріофагу;
5. Визначення мікробіологічних показників заквашувальної композиції.

Визначення активності заквашувальної композиції *Leuconostoc mesenteroides* CMG713.

Активність заквасок, чи заквашувальних композицій контролюють за кислотністю та тривалістю сквашування, шляхом проведення пробного сквашування невеликої кількості молока[18].

Кислотоутворююча активність характеризує швидкість перетворення лактози та є важливим параметром, що визначає якість заквашувальної композиції. Відхилення швидкості кислотоутворення під час виготовлення сиру від норми

свідчить про погіршення якості бактеріальної заквашувальної композиції та призводить до погіршення якості та органолептичних властивостей готового продукту[18].

Закваски для твердого сиру з низькою температурою другого нагрівання мають мати кислотність 90–100° Т. При внесенні 1–3% материнської заквашувальної композиції *Leuconostoc mesenteroides* тривалість сквашування становить близько 6–8 год. Якщо час сквашування молока не перевищує задані межі, при цьому утворюється сирний згусток, що відповідає нормі – це свідчить про гарну якість заквашувальної композиції та її активність. Якщо ж спостерігається збільшення часу сквашування з утворенням слабкого сирного згустку – це вказує на зниження якості закваски та, відповідно, зниження активності[98, 99].

Окрім цього, звертають увагу на згусток, що утворився в результаті сквашування. Для цього визначають загальні органолептичні показники, такі як: розмір, колір, загальний вигляд, текстура, аромат та смак. Утворений сирний згусток має відповідати всім специфічним органолептичним показникам, що притаманні кожному виду закваски, чи заквашуваній композиції, так як саме це свідчить про якісну закваску, чисту від сторонньої мікрофлори[99].

Визначення вмісту діацетилу і ацетоїну в заквашувальній композиції

Визначення вмісту діацетилу і ацетоїну проводять за креатиноюю пробою. Для цього на порцелянову пластину наносять в рівних об'ємах, зазвичай по 2 краплі, аналізованої проби заквашувальної композиції, 0,04% розчин креатину та 40% розчин КОН. Після цього ретельно перемішують та залишають до прояви рожевого забарвлення.

Якщо появу рожевого забарвлення відзначають раніше, ніж за 7 хв, то заквашувальна композиція вважається гарним продуцентом діацетилу та ацетоїну. Це свідчить про гарну ароматоутворюючу здатність культури мікроорганізмів та високу якість композиції. Натомість, якщо поява рожевого забарвлення відзначається після 7–10 хв, це свідчить про низьку ароматоутворюючу здатність культури та низьку якість композиції[97].

Визначення наявності вуглекислого газу в заквашувальній композиції

Для цього в пробірку наливають відібрану пробу заквашуваної композиції, об'ємом 20 см² та відзначають рівень закваски у пробірці на початок визначення. Після цього пробірку переносять на водяну баню баню з холодною водою та поступово нагрівають воду, доводячи її температуру води до 90° С. Не знімаючи пробірку з водяної бані, повторно відзначають рівень заквашувальної композиції в ній. Якщо згусток збільшився та став губчастої текстури, піднявшись над сироваткою (від 0,5 см над поверхнею сироватки) – це свідчить про наявність вуглекислого газу в аналізованій пробі. Якщо згусток майже не піднявся (до 0,5 см) та майже не змінив своєї текстури – це є свідченням про відсутність вуглекислого газу[100].

Визначення наявності вуглекислого газу в заквашувальних композиціях особливо важлива для сирів Голландської групи, адже вони вирізняються не лише особливим смаком, але й текстурою. Саме наявність вуглекислого газу в заквасці забезпечує утворення текстури готового продукту, а також вічок різних розмірів, за рахунок “розривання” товщі сиру бульбашками під час виготовлення[101].

Визначення наявності бактеріофагу в заквашувальній композиції

Бактеріофаги – це віруси, які адаптовані до паразитування на бактеріях, що спричиняє бактеріоліз, тобто їх розчинення. Розміри фагів коливаються в межах 10–100 нм. Бактеріофаги складаються з двох частин: кулястої головки з нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) та подовженого відростка, який утворений порожнім стрижнем, що оточений чохлом зверху, здатним до скорочення. Також на нижньому кінці відростку бактеріофаги містять базальну пластину від якої відходять по 6 ниток, кожна завдовжки близько 100-150 нм.

За допомогою базальної пластинки та ниток бактеріофаг приєднується до бактеріальної клітини, під дією лізоциму розчиняє частину клітинної стінки бактерії, білкова оболонка бактеріофагу скорочується внаслідок чого його ДНК вприскує всередину бактеріальної клітини. Після потрапляння ДНК бактеріофага до цитоплазми бактеріальної клітини починається пригнічення її систем та життєїяльності, а вже через 30- 60 хв її клітина стінка проривається, що призводить до загибелі клітини бактерії та потрапляння назовні нових бактеріофагів, що знатні

уразити нові бактеріальні клітини. Цикл розвитку бактеріофага досить швидкий, з одного бактеріофага, що уразив бактеріальну клітину, після розриву її клітинної стінки утворюється близько сотні нових клітин бактеріофагів. Таким чином потрапляння бактеріофага до чистої культури бактерій, що чутливі до даного бактеріофага, призводить до лізису й загибелі всіх бактеріальних клітин. Отже, наявність бактеріофага в заквашувальній композиції є неприпустимою. Саме тому надзвичайно важливо контролювати наявність бактеріофагу в заквашувальній композиції[97, 102].

Наявність бактеріофагу визначають висівом проби заквашувальної композиції на стерильне знежирене молоко з додаванням метиленового синього. Для цього 10 мл стерильного обезжиреного молока змішують з 0,5 мл розчину метиленового синього та додають одну краплину аналізованої заквашувальної композиції. Після цього вміст пробірки перемішують коловими обертами та поміщають в термостат при температурі 37°C . Якщо після знебарвлення метиленового синього в процесі культивування через 4-5 год спостерігається повторне посиніння молока, це свідчить про присутність бактеріофага в аналізованому зразку[100].

Визначення чистоти та мікробіологічних показників заквашувального препарату *Leuconostoc mesenteroides* CMG713

Одним з основних параметрів, який контролює якість готової заквашувальної композиції є її чистота. Не допускається присутність сторонньої мікрофлори в готовому продукті. Контроль чистоти та мікробіологічний контроль заквашувальної композиції визначають методом мікроскопіювання. Також мікробіологічний контроль проводять в разі зниження активності готового продукту[97].

Перевірку чистоти заквашувального препарату здійснюється за допомогою методу прямого мікроскопіювання, визначаючи морфологічні ознаки клітин, їх відповідність морфологічним ознакам цільового продукту та відсутність сторонніх мікроорганізмів. Для цього використовують світловий мікроскоп з імерсійною системою зі збільшенням x90.

Для цього на центральну частину чистого предметного скла, дотримуючись асептичних умов, стерильною бактеріальною петлею вносять краплину відібраного

препарату закваски. Суху закваску попередньо розводять у краплі дистильованої води. Потім пробу рівномірно розподіляють по поверхні скла та залишають висохнути на повітрі. Петлі попередньо необхідно простерилізувати за допомогою фламбування над полум'ям пальника. Сухий препарат поміщають на предметний столик, на центральну ділянку препарату наносять краплю імерсійної олії. Тубус мікроскопа обережно опускають під зоровим контролем, щоб фронтальна лінза була опущена в краплю олії, але при цьому не торкалась препарату. Макрогвинт повільно обертають та підіймають тубус до появи зображення. Після цього, за допомогою обертання мікрогвинта, фокусують зображення, щоб воно було достатньо чітким.

Після завершення мікроскопіювання слід ретельно очистити лінзу мікроскопу. Для цього спершу її обережно очищають фільтрувальним папером, а потім змочену у спирті ваткою. Це необхідно робити для збереження лінзи мікроскопу в належному стані[89].

Під час мікроскопіювання в зразках повинні бути присутні лише клітини *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, що рівномірно розташовані в полі зору мікроскопа[97]. Це грампозитивні бактерії, які мають сферичну, дещо витягнуту форму клітин, розміром 0,5-0,7 x 0,7-1,2 мкм. Вони є нерухомими, а також не утворюють спор. Клітини *Leuconostoc mesenteroides* розміщуються довгими ланцюгами з клітин. Однак, залежно від умов культивування клітини можуть розташовуватись попарно, або подвійними ланцюгами [10].

Крім того чистоту заквашувальної композиції визначають шляхом посіву відібраної проби на відповідні поживні середовища.

Визначення кількості молочнокислих бактерій. Визначення проводять згідно з ДСТУ 7999. В сухих заквасках кількість молочнокислих бактерій має становити не менше ніж $1 \cdot 10^8$ КУО/г. Метод який застосовується для визначення кількості молочнокислих бактерій заснований на їх можливості розмножуватись на елективному середовищі при температурі 37 ± 1 °C протягом 24-48 год. Для *Leuconostoc mesenteroides* в якості поживного середовища використовують поживний агар з гідролізованим молоком та сахарозою.

Перед початком визначення готують розведення, з урахуванням того, щоб у разі їх посіви виростало 30-300 колоній. З кожної проби роблять висів на 2-3 чашки Петрі. З кожного розведення відбирають по 1 мл, переносять в чашки Петрі, заливають підготовленим та охолодженим до температури 40–45 °С поживним середовищем, закривають кришкою та вміст чашки ретельно перемішують обертальними рухами. Після цього залишають чашки до повного застигання поживного середовища. Коли середовище застигло чашки Петрі перевертають кришками донизу та термостатують за відповідного режиму. Після проростання колоній їх підраховують, відмічаючи кожну колонію на дні чашки чорнилом. Кількість молочнокислих бактерій в 1 г продукту розраховують за формулою:

$$X=n*10^m,$$

де n – кількість підрахованих колоній, m – число десятикратних розведень.

Такий підрахунок та розрахунок за формулою роблять по всіх чашках Петрі. За кінцевий результат дослідження приймають середнє арифметичне, одержане в усіх чашках після розрахунку[97].

Бактерії групи кишкової палички визначають висівом аналізованої проби на середовище Кесслера. Дане середовище є стандартним для визначення бактерій групи кишкової палички. Перед висівом проводять нейтралізацію аналізованого зразку до рН 7,5±1, додаючи до заквашувальної композиції розчин 10% питної соди в співвідношенні 10:1 відповідно. Нейтралізовану заквашувальну композицію висівають на середовище Кесслера та поміщають в термостат при температурі 43–45°С на 24 год. Після проходження доби посіви аналізують. Відсутність газоутворення в пробірці свідчить про відсутність забруднення заквашувальної композиції бактеріями групи кишкової палички. Якщо ж після термостатування у пробірці спостерігається газоутворення, це свідчить про можливу наявність в прбі бактерій групи кишкової палички. Для підтвердження цього проводять додатковий висів на середовище Ендо у чашках Петрі, які поміщають у термостат при температурі 37°С протягом 18-24 год. Після цього аналізують посіви. В разі появи колоній малинового кольору з металічним блиском, які є характерними для бактерій групи кишкової палички, їх вивчають, роблячи мазки та фарбуючи за Грамом для

мікроскопіювання. Порівнюють морфологічні ознаки бактерій з ознаками бактерій групи кишкової палички. В разі співпадіння роблять висновок, що препарат заражений бактеріями групи кишкової палички. Вимоги до контролю наведені в стандарті ДСТУ 7357:2013.

Для визначення дріжджів та грибів роблять посіви на середовище сусло-агар, чи середовище Сабуро, які культивують при температурі 24 °С протягом 3 – 5 діб, після чого готують препарат та мікроскопіюють. Контроль проводять згідно з вимогами ДСТУ 8447:2015[99].

Спорові аеробні та анаеробні бактерії – немолочнокислі бактерії, визначають посівом аналізованого зразка заквашувальної композиції в пробірки з стерильним знежиреним молоком. Для створення анаеробних умов для визначення анаеробних мікроорганізмів до пробірки додають парафін. Відповідно, для визначення аеробних мікроорганізмів до пробірки не додають нічого окрім стерильного знежиреного молока та аналізованої проби. Пробірки поміщають на водяну баню при температурі $85\pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 10 хв. Потім охолоджують суспензію, заливають її поживним середовищем, перемішують та поміщають в термостат при температурі 30°C на 2 – 3 доби. Після проходження часу аналізують отримані посіви[97].

Контроль наявності патогенних мікроорганізмів в заквасці, у тому числі бактерій роду *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* та *Salmonella spp.*, проводять згідно з встановленим порядком державного санітарного нагляду санітарно-епідеміологічними станціями за відповідними методиками та з періодичністю, встановленою та затвердженою центральним органом виконавчої влади у сфері охорони здоров'я України. Так патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду *Listeria monocytogenes* визначають горизонтальним методом згідно з ДСТУ ISO 11290-1, ДСТУ ISO 11290-2; бактерії *Staphylococcus aureus* визначають згідно з ДСТУ 30347; а бактерій роду *Salmonella*, визначають згідно з ДСТУ IDF 93A та методами, що затверджені Центральним органом виконавчої влади у сфері охорони здоров'я України[103].

Після проведення кожного з мікробіологічних досліджень на вміст певного типу мікроорганізмів у складі заквашувальної композиції, отриманні значення

порівнюють з встановленими нормативами. На основі нормативних даних роблять висновок про якість готового продукту та його придатності для вживання. Мікробіологічні показники заквашувальних композицій молочнокислих бактерій та нормативні значення представлені в табл. 8.2.

Таблиця 8.2

Мікробіологічні показники заквасок

Тип мікроорганізмів	Кількість мікроорганізмів, КУО/г			
	Неконцентровані ЗК		Концентровані ЗК	
	Рідкі / заморожені	Ліофільні	Рідкі / заморожені	Ліофільні
	Норматив		Норматив	
Молочнокислі бактерії (мінімальна кількість)	1*10 ⁸		1*10 ⁹	
Немолочнокислі бактерії	<50	<50	<500	<500
Дріжджі і плісняви	<1	<10	<1	<10
Коліформи	<1	<1	<1	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	<1	<10	<1	<10
<i>Salmonella spp.</i>	Відсутні в досліджуваному продукті		Відсутні в досліджуваному продукті	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Відсутні в досліджуваному продукті		Відсутні в досліджуваному продукті	

Наявність будь-якої сторонньої мікробіоти в кількості, що перевищує встановлені норми є неприпустимою в заквашувальній композиції *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Це свідчить про забруднення готового продукту, зниження його якості, саме тому такий продукт не може бути реалізованим. В разі відсутності будь-яких відхилень від норми готовий продукт вважається чистим, гарної якості та готовим до подальшої реалізації й використання.

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

На кожному біотехнологічному підприємстві утворюються велика кількість відходів різного типу та класу небезпеки. В рідких та газоподібних відходах міститься певна кількість біологічних частинок, чи залишків мийно-дезінфікуючих засобів. Також для даного підприємства характерне утворення твердих відходів, такі як пакувальні матеріали, папір чи скло. Відповідно, всі відходи, що утворюються на підприємстві необхідно правильно знешкоджувати чи передавати на переробку до спеціальних підприємств, для уникнення негативного впливу на екосистему.

Таблиця 9.1

Місця емісії, об'єми та шкідливість відходів, що утворюються на проєктованому виробництві

Тип відходів	Назва відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Стадія виробництва	Приблизна кількість відходів за 1 виробничий цикл	Клас небезпеки
Газоподібні	Відпрацьоване повітря з посівних апаратів	Діоксид карбону, клітини бактерій	Вирощування посівного матеріалу	1445 м ³	IV
	Відпрацьоване повітря з ферментеру		Виробничий біосинтез		

					НУХТ БТЕК 04.01.20 КР ПЗ		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		Гіріна А.С.			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Перевір.</i>		Грегірчак Н.М.				114	14
<i>Консульт.</i>					Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ							

Рідкі	2%-й розчин засобу чистильного низькопінного з дезінфікуючим ефектом "DESOVER FN2"	ЧАС, n-пропанол, ізопропиловий спирт, бензалконія хлорид	Санітарна підготовка підприємства	1600 л	III
	0,5%-й розчин засобу дезінфекційного універсального "SANDEZ"	Ізопропіловий спирт, гліцерин, перекис водню, ЧАС			IV
Тверді	Пластикова тара	ПЕ-поліетилен	На всіх стадіях виробництва	2 кг	IV
	Пакувальні матеріали	ПП - поліпропілен			IV
	Макулатура	Папір			IV

Розрахунок приблизної кількості газоподібних відходів за 1 виробничий цикл.

Тривалість отримання посівного матеріалу в інокуляторах та виробничого біосинтезу в ферментері складає по 18 годин. Для аерації середовища використовують стерильне аераційне повітря, яке підготовують на попередніх технологічних етапах. Швидкість аерації становить 1,2 л аераційного повітря на 1 л культуральної рідини за хвилину. Для вирощування посівного матеріалу використовують два посівних апарати об'ємом 15 та 100 л. Об'єм поживного середовища в посівних апаратах становить 9 л та 60 л відповідно. Виробничий біосинтез прободять в ферментері об'ємом 1 м³.

Розрахунок об'єму відпроцьованого аераційного повітря в посівному апараті об'ємом 15 л:

$$(1,2 \cdot 15) \cdot (18 \cdot 60) = 19440 \text{ л} = 19,4 \text{ м}^3$$

Розрахунок об'єму відпроцьованого аераційного повітря в посівному апараті об'ємом 100 л:

$$(1,2 \cdot 100) \cdot (18 \cdot 60) = 129600 \text{ л} = 129,6 \text{ м}^3$$

Розрахунок об'єму відпроцьованого аераційного повітря в ферментері об'ємом 1м^3 :

$$(1,2 \cdot 1000) \cdot (18 \cdot 60) = 1296000 \text{ л} = 1296 \text{ м}^3$$

Загальний об'єм відпроцьованого аераційного повітря за один виробничий цикл становить: $19,4 + 129,6 + 1296 = 1445 \text{ м}^3$

Розрахунок приблизної кількості рідких відходів за 1 виробничий цикл.

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Для миття та дезінфекції обладнання необхідно приготувати робочі розчини з врахуванням 30-40% від об'єму ємності обладнання.

Відповідно до специфікації обладнання ми маємо наступне обладнання: Р-10 Реактор-змішувач на 15 л, І-12 Інокулятор 15 л; Р-14 Реактор змішувач 50 л; І-16 Інокулятор 100 л, Р-18 Реактор-змішувач 800 л, Р-20 Реактор-змішувач 300 л, ФР-23 Ферментер 1000 л.

Таким чином необхідно розрахувати геометричний об'єм ємностей:

$$V_{\text{ємностей}} = 15 + 15 + 50 + 100 + 800 + 300 + 1000 = 2280 \text{ л}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \cdot 0,3 = 2280 \cdot 0,3 = 684 \text{ л (685 л)}, \text{ або}$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \cdot 0,4 = 2280 \cdot 0,4 = 912 \text{ л (915 л)}.$$

Отже, приймаємо що об'єм мийно-дезінфікуючи засобів становить 685-915 л.

Відпрацьована вода після ополіскування. Об'єм води, що йде на ополіскування обладнання становить близько 30% від об'єму ємності обладнання. Відповідно даний об'єм становить 685 л.

Таким чином орієнтовна кількість стічних вод за один виробничий цикл становить $915 + 685 = 1600 \text{ л}$.

9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.

9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.

Очищення стічних вод що надходять від підприємства є надзвичайно важливим для збереження довкілля, екосистеми та здоров'я населення. Неочищені

стічні води проектуемого підприємства мають залишки мікроорганізмів та різних хімічних і токсичних речовин, які при потраплянні до навколишнього середовища можуть мати серйозні негативні наслідки. Саме тому очищенню рідких відходів на підприємствах надається особлива увага. При проектуванні системи очищення стічних вод необхідно враховувати різні фактори, такі як тип виробляємої продукції, об'єм підприємства та ін.

Враховуючи розрахунки, масштаби та особливості проектуємо підприємства, очищення рідких відходів доцільно проводити з використанням системи біологічного очищення – аеротенків. Загалом системи біологічного очищення поділяються на два типи: пристрої, в яких очищення стічних вод наближається до природніх умов, та пристрої, в яких штучно створюються умови для очищення стічних вод. Аеротенки відносяться до другого типу – пристроїв, де створюються штучні умови для очистки. Перевагами такого типу пристроїв є їх висока продуктивність, що дозволяє більш інтенсивно та якісно здійснювати очищення[68].

Іншими значними перевагами біотехнологічного способу очищення за допомогою аеротенків є: можливість видалення з стічних вод широкого спектру забруднень; самопідлаштовування та регулювання системи до зміни спектру; відносна простота у використанні та апаратурного оформлення; відносно невеликі експлуатаційні витрати.

Однак, існує ряд недоліків такої системи очищення стічних вод, які необхідно враховувати при проектуванні, наприклад: першочергові високі витрати, що йдуть на спорудження очисної системи; необхідність попереднього розведення висококонцентрованих стічних вод, що приводить до збільшення потоку стічної води. Та враховуючи масштаб підприємства й відносно невеликий об'єм стічних вод, що подаються на очистку, можна мінізувати недоліки такої системи, зберігши її ефективність[105].

Аеротенками називають аеровані залізобетонні резервуари відкритого типу. Аерація в конструкції даного типу необхідна для насичення води киснем, що дозволяє підтримувати мул у зваженому стані.

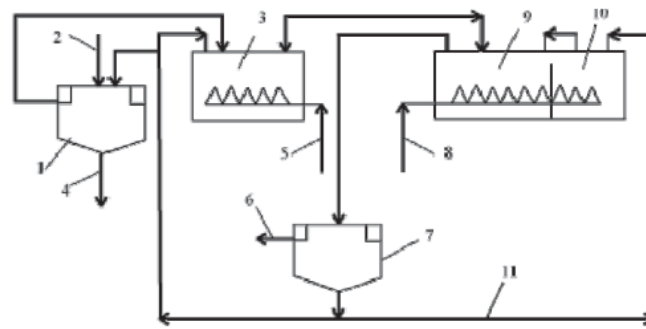


Рис. 9.1. Схема установки для біологічного очищення стічних вод (аеротенк), де: 1- первинний відстійник стічних вод; 2 - вхідні стічні води, що надходять на очищення; 3 -преаератор; 4 - осад; 5, 8 - повітря; 6 - очищені стічні води; 7 - вторинний відстійник; 9 - аеротенк; 10 - регенератор; 11 – активний мул[104].

Перед потраплянням в аеротенки рідина має містити не більш 150 мг/л зважених часток та не більше 25 мг/л нафтопродуктів. Також температура вод, що потрапляють на очищення, має бути в межах 6-30 °С, а значення рН бути в межах 6,5-9[104].

Основний принцип роботи аеротенків. Спершу стічну воду направляють у відстійник, куди для поліпшення осадження зважених часток можна подавати частину надлишкового мулу. Після освітлення вода направляється у преаератор-усереднювач, у який направляють мул зі вторинного відстійника. У преаераторі відбувається попередня аерація стічних вод повітрям протягом 5-20 хв. Додатково, за потреби до преаератор вводять нейтралізуючі добавки та живильні речовини.

З преаератор-усереднювач стічну воду подають до аеротенку через який відбувається циркуляція активного мулу. В загальному, біохімічні процеси, що протікають в аеротенках можуть бути поділені на два етапи:

1. На першому етапі відбувається адсорбція поверхнею активного мулу органічних речовин і мінералізація легко-окислюваних речовин при інтенсивному споживанні кисню.

2. На другому етапі відбувається доокислення органічних речовин, які повільно окисляються, та регенерація активного мулу. На другому етапі витрата кисню проходить досить повільно.

Зазвичай аеротенки розділені на дві частини: регенератор (що займає близько 25% від загального обсягу) і аеротенк, у якому йде основний процес очищення. Регенератор дозволяє збільшити продуктивність та очищувати більш концентровані стічні води.

Після контактування стічна вода з мілом надходить до вторинного відстійника. У ньому відбувається безпосереднє відділення води від мулу. Більша частина мулу направляється назад в аеротенк, а його невелика частина направляється до преаератора-усереднювача[104].

Існує декілька типів аеротенків які доцільно використовувати в залежності від масштабів підприємства та об'єму стічних вод, що надходять від нього. Враховуючи особливості проектуємого підприємства та те, що об'єм стічних вод відносно невеликий, доцільно використовувати аеротенк-витискувач, у якому можна досягти високої глибини очищення та практично повного вилучення всього забруднення зі стічних вод. Єдиним недоліком такої системи є початкове пригнічення життєдіяльності мікроорганізмів активного мулу високою концентрацією органічних забруднень при залповому надходженні стічних вод. Однак, об'єм стічних вод є відносно невеликим, тому дана загроза є мінімізованою та не впливає на ефективність очищення стічних вод[105].

В аеротенках такого типу воду та мул подають на початку спорудження, а наприкінці спорудження відводять суміш (рис. 9.2). Зазвичай аеротенк має 1-4 коридори, теоретичний режим потоку – поршневий, без подовжнього перемішування[17].

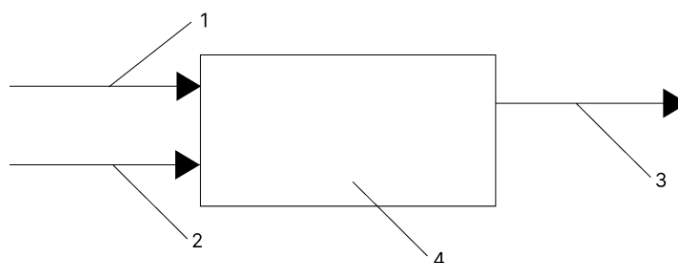


Рис.9.2. Схема структури потоків стічної води і поворотного активного мулу аеротенку-витискувача, де: 1 - стічні води, що надходять на очищення; 2 - активний мул; 3 - мулова суміш; 4 – аеротенк[104].

Особливу увагу слід звертати на аерацію, адже при цьому має забезпечуватись велика площа контакту між повітрям, стічною водою та мулом. Це є основною умовою ефективного очищення. У промислових масштабах використовують пневматичний, механічний і пневмомеханічний способи аерації стічної води в аеротенках в залежності від необхідного рівня аерації. Можна використовувати різні методи аерації, наприклад пневматичний чи механічний[104].

9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.

На сьогоднішній день у всьому світі гостро стоїть проблема знешкодження твердих відходів підприємств, в тому числі й біотехнологічних. Україна не стала країною виключенням. Статистичні данні за останні 10 років свідчать про підвищення об'ємів твердих відходів, утворених внаслідок роботи підприємств різних галузей. Згідно з даними, щорічно утворюється близько 1 млрд твердих промислових відходів, з них велика частина відноситься до високотоксичних відходів і за європейськими стандартами може бути віднесена до першого класу небезпеки. Якщо правильно не знешкоджувати відходи виробництва поступово вони будуть накопичуватись, займаючи величезні площі. На сьогоднішній день на території України тверді промислові відходи займають площу близько 1600 км², для порівняння – це п'ята частина Чернівецької області. Окрім того що відходи займають велику частину території, на їх утримання щороку йде багато коштів.

Звісно, велика частина всіх промислових відходів, що утворюються на території України, не є відходами біотехнологічної, харчової чи фармацевтичної промисловості, однак, вкрай важливо на кожному підприємстві, не залежно від його масштабів, приділяти значну увагу правильному знешкодженню твердих відходів та підбору відповідних методів й систем для збереження навколишнього середовища, екосистеми та здоров'я населення[106].

На підприємстві з виготовлення сухої закваски молочнокислих бактерій для виготовлення твердого сиру, в ході виробництва утворюються тверді відходи різного типу:

- Бруд на фільтрах;
- Фільтри;

- Відходи від обробки стічних вод;
- Непридатні хімічні реактиви;
- Залишки поживних середовищ;
- Залишки пакувальних матеріалів;
- Лабораторні відходи;
- Папір;
- Скло;
- Засоби індивідуального захисту, та ін.

В залежності від типу твердих відходів, класу токсичності та їх якості, відрізняється процес їх знешкодження та/або захоронення. При неправильному знешкодженні відходи можуть становити загрозу для населення та екосистеми.

Знешкодження бруду на фільтрах та самих фільтрів. Після того як у фільтра закінчився термін його експлуатації, він підлягає заміні. На старому фільтрі залишається бруд та залишки клітин продуценту. Через це проста утилізація фільтрів неможлива, тим більше не допускається викидати тверді відходи підприємства в загальне сміття, так як це може зашкодити навколишньому середовищу. Продуцент, що використовується на підприємстві не є патогенним, тому вимоги до знешкодження є менш жорсткими. Зазвичай для таких цілей використовують автоклав з відповідною температурою та режимом стерилізації. Після термічної обробки фільтрів та знешкодження клітин мікроорганізмів, що на ньому залишились, фільтри передають на утилізацію до відповідних компаній. Враховуючи об'єми та специфіку підприємства, неможливо проводити повне знешкодження деяких відходів без залучення сторонніх організацій[107].

Фільтри утилізуються згідно відповідно до встановлених нормативних актів, вимог та норм чинного законодавства. Утилізація здійснюється кваліфікованим персоналом. Процес утилізації складається з декількох послідовних етапів:

1. Збір фільтрів;
2. Знешкодження клітин мікроорганізмів;
3. Транспортування фільтрів до місця подальшої переробки;

4. Сортування твердих відходів;
5. Утилізація відходів;
6. Складання акту про переробку.

Перед транспортуванням фільтрів до місця їх подальшої переробки необхідно врахувати та забезпечити їх правильний збір та зберігання. Зберігати відходи необхідно на відкритих майданчиках або у приміщеннях, що мають заасфальтовану територію або бетонну основу. Зберігання та транспортування здійснюється у металевих бочках чи герметичних контейнерах, в залежності від об'ємів твердих відходів. Неправильне зберігання відходів загрожує потраплянню токсичних речовин до навколишнього середовища, так як використаний фільтр може накопичувати в собі токсичні та отруйні речовини.

Найбільш поширений метод знешкодження відпрацьованих фільтрів є термічне знищення[108].

Знешкодження хімічних реактивів. Утилізації даного типу твердих відходів необхідно приділяти особливу увагу, адже при не правильному зберіганні та знешкодженні вони здатні виділяти в атмосферу, літосферу й гідросферу цілий спектр токсичних речовин, що призводить до невиправної шкоди екосистемі. Утилізація хімреактивів від промислових виробництв – це процес знешкодження та переробки небезпечних хімічних сполук без шкоди для населення та навколишнього середовища.

Хімічні реактиви використовуються на різних етапах виробництва. До них відносяться компоненти поживного середовища, підживлювані розчини, розчини для регулювання та підтримання заданого рівня рН середовища, кислоти, луки, розчини та засоби для дезінфекції, мийні засоби. Такі відходи необхідно правильно зберігати на підприємстві відповідно до класу небезпечності, після чого передавати на знешкодження до відповідних організацій, що спеціалізуються на цьому.

Існує декілька основних методів утилізації хімічних реактивів, в залежності від їх типу, які використовують організації:

- Спалювання та знешкодження речовин з отриманням енергії;
- Нейтралізація хімічних речовин;

- Термічна обробка з очищенням газів;
- Для рідких хімічних реактивів використовують метод дистиляції, після чого деякі речовини можна використовувати повторно[109].

Утилізація паперу. Правильна утилізація паперу також важлива, адже період розкладання паперових відходів може становити декілька років. На жаль, в Україні не на стільки поширена практика сортування відходів та їх правильна утилізація, як у країнах Європи, де макулатура навіть на побутовому рівні сортується. Хоча правильна переробка та повторне використання паперових відходів може значно знизити навантаження на природу. По-перше, знизиться рівень забрудненості навколишнього середовища, а також знизяться об'єми вирубки деревини. Саме тому підприємству, на якому щомісячно викидається велика кількість макулатури, такої як: папір, документи, чисті серветки, коробки та інші, важливо звертатись до сторонніх компаній, що займаються правильною переробкою макулатури.

Процес утилізації макулатури досить простий. Спершу сировину сортують за кольором, вологістю та іншими параметрами, далі кожна група окремо подається до гідравлічного розбивача, що подрібнює сировину на волокна, видаляє сторонні забруднення, після чого масу можна повторно використовувати[110].

Знешкодження відходів, що утворюються в лабораторії. На підприємстві розташована лабораторія, що займається дослідженнями та проводить контроль якості сировини та готової продукції. Відповідно, лабораторні відходи мають бути правильно утилізованими, так як вони вважаються одними з самих небезпечних. Ступінь небезпечності лабораторних відходів варіюється від нешкідливих до токсичних. Саме тому їх знешкодження суворо регламентоване та проводиться організаціями, які мають відповідну ліцензію та дозволи.

Для утилізації відходів спершу необхідно правильно їх зібрати, а потім передати в окремі організації для подальшої утилізації. Цей процес складається з наступних етапів:

1. Установка спеціальних контейнерів для збору відходів. Матеріал контейнерів відрізняється в залежності від рівня небезпечності речовин. Для відходів першого та другого класу використовують оцинковану тару, для інших

відходів використовують контейнери, покриті спеціальним шаром для захисту їх від корозії. Розмір контейнерів обирається з врахуванням об'єму відходів.

2. Далі контейнери забирають на переробку чи утилізацію. Якщо речовини не придатні до повторного використання та переробки, їх відвозять на полігон, де їх нейтралізують. Після чого вони не несуть загрози та є екологічно безпечними речовинами[111].

Утилізація скла. Скло не взаємодіє з оточуючим середовищем та продуктами, є екологічно чистим матеріалом, практичним, саме тому поширений на підприємствах біотехнологічної промисловості. Однак, скляний інвентар має свій термін використання, а також може битись та пошкоджуватись в процесі експлуатації, через що потребує заміни.

Вироби зі скла повністю піддаються переробці, що дозволяє значно зменшити відходи від виробництва. До того ж, правильна утилізація скла, як і більшості інших твердих відходів необхідна для збереження навколишнього середовища, адже скло майже не розкладається, а просто засмічує природу, чи звозиться на звалища з іншим несортованим сміттям, де може лежати роками. Саме тому підприємствам слід звертатись до кваліфікованих організацій, які займаються утилізацією скла для того, щоб зменшити кількість твердих відходів, що забруднюють нашу планету та несуть значну загрозу.

Технологічний процес утилізації скла досить простий та складається з наступних етапів:

1. Збір скла та скляних виробів;
2. Транспортування відходів до місця утилізації;
3. Мийка та сортування скла за кольором;
4. Підготовлене скло ретельно подрібнюють на фракції;
5. Плавлення підготовленого матеріалу;
6. Повторне використання сировини та виготовлення з неї нових скляних виробів.

Варто зазначити, що утилізації в такий спосіб піддаються чисті списані скляні вироби та інвентар. Якщо посудина забруднена хімічними чи токсичними речовинами – вона не придатна для такого типу переробки[112].

Отже, як ми бачимо на підприємстві що займається виготовленням сухої бактеріальної закваски існують відходи різних типів та класів, які необхідно правильно знешкоджувати для збереження навколишнього середовища, екосистеми та здоров'я населення. Особливу увагу слід звертати на хімічні реактиви, токсичні відходи, та біологічний матеріал, збір, зберігання та знешкодження якого проводиться в особливий спосіб. Однак, не слід нехтувати правильною переробкою та утилізацією таких відходів, як скло чи папір, які на перший погляд безпечні, але можуть нанести не виправну шкоду природі.

9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.

Іншою надважливою системою на біотехнологічному підприємстві є система знешкодження газоподібних відходів. Після вирощування інокуляту в посівному апараті, чи після виробничого біосинтезу в ферментері відпрацьоване повітря містить багато клітин мікроорганізмів, тому потрапляння такого повітря в атмосферу, без попереднього очищення, є неприпустимим з огляду на охорону довкілля та навколишнього середовища.

Об'єм відпрацьованого повітря приблизно дорівнює об'єму аераційного повітря.

Однією з проблем при виборі системи очищення газоподібних відходів є те, що відпрацьоване повітря, яке подається на очищення, містить досить високу відносну вологість. Через це звичайні фільтри можуть швидко виходити з ладу та бути не придатними для подальшого використання, що призводить до додаткових витрат та незручностей[113].

Система фільтрації відпрацьованого повітря, що встановлюється на виході з ферментера призначена для очищення повітря від залишків мікроорганізмів та інших речовин, й створення так званого стерильного бар'єра для запобігання потрапляння забруднень з навколишнього середовища до ферментера. Враховуючи особливість біотехнологічного процесу, відносно невеликий об'єм відпрацьованого

повітря та високу вологість відпрацьованого повітря на виході з ферментеру та інокуляторів, рекомендується використовувати систему знешкодження газоподібних відходів, що складається з двох етапів:

1. На першому етапі очищення встановлюється попередній фільтр, призначений для попереднього очищення та видалення аерозольних частинок і крапель рідини, що містять клітини мікроорганізмів та поживне середовище, з відпрацьованого повітря. Після ферментеру чи інокулятору відпрацьоване аераційне повітря подається на фільтр попередньої очистки. Основним елементом та матеріалом, що використовують для фільтруючих елементів є мембрани товщиною близько 1,2 мкм, що складаються з поліпропілену. Окрім попередньої фільтрації, фільтр попередньої очистки подовжує термін дії основного фільтру, на який відпрацьоване повітря подається після попередньої очистки, за рахунок видалення зайвої вологи з повітря.

2. На другому етапі очищення встановлюють основний фільтр, що складається з гідрофобних мембран товщиною 0,2 мкм, що складаються зі спіненого політетрафторетилену (ePTFE), більш відомий під назвою тефлон. Даний фільтр призначений для очищення відпрацьованого повітря від залишків мікроорганізмів, навіть за наявності води та насиченого газу, та недопущення їх потрапляння в зовнішнє середовище. Також основний фільтр перешкоджає потраплянню сторонніх мікроорганізмів та продуктів їх життєдіяльності з зовнішнього середовища у стерильну мережу, де вони можуть спричинити контамінацію та призвести до забруднення партії готової продукції, через що вона буде не придатна для подальшого використання та реалізації, а підприємство понесе значних фінансових збитків.

Не зважаючи на встановлений фільтр попередньої очистки, одна з функцій якого видалення зайвої вологи з відпрацьованого повітря та подовження терміну придатності основного фільтру, основний фільтр все одно має свій термін служби. Завдяки гідрофобності матеріалу, з якого він виготовлений, він схильний до дії вологи, частина якої все ще залишається у повітрі. Саме тому необхідно

дотримуватись правил експлуатації повітряних фільтрів та проводити їх вчасну заміну для досягнення необхідного рівня очищення повітря[114].

9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.

Організація проектованого біотехнологічного підприємства побудована таким чином, що перед початком технологічного процесу першочергово проводяться розрахунки необхідної кількості мийно-дезінфікуючих засобів, компонентів поживного середовища та інших необхідних компонентів. Відповідно, згідно з розрахунками на підприємстві має утворюватись мінімальна кількість зайвих відходів. Однак, для забезпечення цього весь персонал має бути високо кваліфікованим, постійно проходити відповідне навчання та підвищувати кваліфікацію. Також персонал має бути екологічно обізнаним щодо правил поводження з відходами. Для цього необхідно проводити регулярні тренінги. А також кожен співробітник на підприємстві має свідомо використовувати воду, одноразові рушники та інші побутові засоби для того, щоб зменшити кількість побутових відходів.

Для зменшення кількості використаного паперу на підприємстві, до якого відносять використані папери та бланки, які не мають зберігатись на підприємстві, пропонується частину документації перевести в електронний формат та зберігати її на сервері. Даний підхід є екологічнішим та надійнішим, так як документи не загубляться, не буде ризику їх механічного пошкодження, а також у співробітників буде легший доступ до документації в разі необхідності. Використаний папір чи картон пропонується відправляти на переробку.

Також, де це можливо, використовувати багаторазову тару та матеріали, які можна мити та стерилізувати. Це також значною мірою знизить об'єм відходів на підприємстві.

Загалом, для впровадження заходів щодо зменшення кількості відходів на підприємствах необхідно раціонально використовувати ресурси, залучати працівників до тренінгів та програм екологічної відповідальності, проводити аудит та оцінку вже впроваджених заходів на підприємстві та на основі отриманих даних покращувати наявні заходи, чи впроваджувати нові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Михайленко О.В. Від чого залежить молочна промисловість України: аналіз стану та перспективи розвитку. *Бухгалтерський облік, аналіз та аудит*. 2022, 65: 197-200. doi: 10.32843/infrastruct65-33
2. Россоха В.В., Петриченко О.А. Розвиток ринку молока та молокопродукції в Україні. *Економіка АПК*. 2018, 8: 43-54.
3. Цимбал Л. М., Кузьменко Л. М. Користь і шкода твердих сирів. Матеріали студентської наукової конференції Полтавської державної аграрної академії (Полтава, 2016 р.) с.273-274.
4. Від чого залежить промислова могутність України. Українське юридичне товариство. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://justice.org.ua/politika-i-pravo-podiji-fakti-komentari/vid-chogo-zalezhit-promislova-mogutnist-ukrajini-vsomu-svij-chas-abo-biotekhnologiji>
5. Боднарчук О. В., Якубенко О. Б., Петров П. І., Насирова Г. Ф. аналіз використання заквашувальних культур, здатних до синтезу екзополісахаридів, при ферментації молока. *Продовольчі ресурси*, 2019 – №13. doi:10.31073/foodresources2019-13-02.
6. Farwa Sarwat, Shah Ali U Qader, Afsheen Aman, Nuzhat Ahmed. Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences* – 2008. – Vol. 4. – № 6. – P. 379-386.
7. Liang Wang, Huimin Tian, Wei Liu, Huanhuan Zheng, Haodong Wu, Yuedong Guanz, Qianyu Lu, Zili Lv. Effects of EPS-producing *Leuconostoc mesenteroides* XR1 on texture, rheological properties, microstructure and volatile flavor of fermented milk. *Food Bioscience* – 2023. – Vol. 56. doi: 10.1016/j.fbio.2023.103371
8. Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». – Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. – 312 (15)
9. Поліщук Г.Є., Бовкун А.О., Колесникова С.С. Технологія сиру: Навч. посібник. – К.: НУХТ, 2009 (18)

10. Michael E. Stiles. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Bacteriocins Produced by *Leuconostoc* Species. 1994, P. 497–506. doi: 10.1007/978-1-4615-2668-1.
11. *Leuconostoc* species [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://genome.jgi.doe.gov/portal/leume/leume.home.html>
12. Elsa Díaz-Montes. Dextran: Sources, Structures, and Properties. *Polysaccharides*. 2021, 2(3): 554-565. doi: 10.3390/polysaccharides2030033.
13. Dextran. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dextran>
14. E.-H. Song, J. Shang, D.M. Ratne. *Polysaccharides*. University of Washington, Seattle, WA, USA. 2012. doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00246-6.
15. Myriam Naessens, An Cerdobbel, Wim Soetaert, Erick J. Vandamme. *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. *Chem Technol Biotechnol*. 2005, 80:845–860. doi: 10.1002/jctb.1322.
16. Н.В. Божко, І.В. Чорна. Метаболізм вуглеводів. : конспект лекцій / укладач і: Н. В. Божко, І. В. Чорна. – Суми : Сумський державний університет, 2022. – 89 с.
17. A. L. Bhavani, J. Nisha. Dextran – the polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*/ 2010, 1(4) Режим доступу: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=ea23e52b4bc433acd9c0294c76dee7f8d6830516>
18. Наталія Рябченко. Бактеріальні закваски для виготовлення сирів. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/13889/1/statya_Ryabchenko.pdf
19. Закваска для сиру Гауда. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://milkservis.com/ua/p4210947-zakvaska-dlya-syra.html>
20. Закваски Углич для сиру. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://robimosir.cx.ua/zakvaski-uglich-dlja-siru-asortiment-opis.html>
21. Мезофільна закваска CHN-19, Хансен. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dom-gastronom.com.ua/uk-ua/zakvaski-i-pleseni-dlja-sirodelija/zakvaski-hansen--hansen--dlja-sira/mezofilnaja-zakvaska-chn-19-hansen--50u>

22. В.В. Власенко, Т.В. Семко, А.М. Соломон, М.М. Бондар. Закваски і їх види у сировиробництві. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького, 2016, т 18, № 2 (68)
23. Юлевич О.І. Біотехнологія: навчальний посібник / О.І. Юлевич, С.І. Ковтун, М.І. Гиль; за ред. М.І. Гиль. — Миколаїв : МДАУ, 2012. — 476с.
24. Shah Ali UL Qader, Lubna Iqbal, Afsheen Aman, Erum Shireen, Abid Azhar . Production of Dextran by Newly Isolated Strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9 // Turk.J.Biochem. – 2006. – Vol. 31. – № 1. – P. 21-26.
25. D. Nguyen, T. Q. Nguyen, T. Nguyen. Differentiation of *Leuconostoc mesenteroides* media modified with different sugars. 2016.
26. Пирог, Т.П. Лабораторний практикум з дисципліни «Загальна мікробіологія і вірусологія» для студ. освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання / Т.П. Пирог, М.М. Антонюк – К. :НУХТ. – 2016. – 110 с.
27. J. Bacteriol. Cell Wall Constituents of *Leuconostoc citrovorum* and *Leuconostoc mesenteroides*. 1967, 93(1): 273–277. doi: 10.1128/jb.93.1.273-277.1967
28. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. – К. :НУХТ, 2010. – 632 с.
29. Скільки Європейці витрачають на їжу [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.delfi.lt/ru/news/live/litovcy-tratyat-na-edu-stolko-zhe-skolko-nemcy-nesmotrya-na-raznicu-v-zarplatah-94427967>
30. Аналіз ринку сиру в Україні 2022 рік. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://pro-consulting.ua/ua/issledovanie-rynka/analiz-rynka-syra-v-ukraine-2022-god>
31. Іваніщева О.А. Виробництво і споживання сиру: історія та сучасність. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції (Вінниця, 17 – 19 вересня 2018 р.) С.165-173.
32. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/>

33. Україна скоротила експорт молочних продуктів на 4% в 2023 році [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://avm-ua.org/uk/post/ukraina-skorotila-eksport-molocnih-produktiv-na-4-v-2023-roci>
34. Сирний бізнесмен. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://agro-business.com.ua/agro/suchasne-tvarynnytstvo/item/7998-syrnyi-biznesmen.html>
35. Мезофільні закваски. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dom-gastronom.com.ua/uk-ua/zakvaski-i-pleсени-dlja-sirodelija/mezofilnie-zakvaski/>
36. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., Коломієць Ю.В. Промислова біотехнологія: Київ, 2014. Режим доступу: http://document.kdu.edu.ua/info_zab/162_481.pdf
37. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проєкту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.
38. Гліколізу *Leuconostoc mesenteroides* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lmk00010>
39. Метаболізм крохмалю та сахарози *Leuconostoc mesenteroides* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00500>
40. Пуриновий обмін *Leuconostoc mesenteroides* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lmk00230>
41. Метаболізм піримідинів *Leuconostoc mesenteroides* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lmk00240>
42. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»/ Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.: НУХТ, 2019. – 81 с

43. Alanine, aspartate and glutamate metabolism [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00250>
44. Lysine biosynthesis [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00300>
45. Cysteine and methionine metabolism [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00270>
46. Glycine, serine and threonine metabolism [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00260>
47. Біосинтез валіну, лейцину та ізолейцину [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00290>
48. Arginine biosynthesis [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00220>
49. Histidine metabolism [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map00340>
50. Amino sugar and nucleotide sugar metabolism *Leuconostoc mesenteroides* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lmk00520>
51. Метаболізм жирних кислот [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/map01212>
52. Citrate cycle (TCA cycle) *Leuconostoc mesenteroides* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lmk00020>
53. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
54. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курсової роботи для здобувачів освіт. ступ. “бакалавр” спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. форм навч. /уклад: Т.П. Пирог, В.О. Красінько, С.О. Старовойтова. – К.: НУХТ, 2022. – 56 с.

55. Бродильний апарат, ферментатор, 1 м³. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom-nasos.pro/eng/catalog/engineering/equipment-for-the-production-of-alcohol-and-bioethanol/capacitive-equipment-for-bioethanol-and-distilleries/brodilniy-aparat-fermentator-10m3-st3/>
56. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. -К НУХТ, 2022. -373 с.
57. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2023 р. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/e4cf84a5-25fa-46e8-aa14-dbfa240b974a>
58. Засіб чистильний низькопінний з дезінфікуючим ефектом “DESOVER FN2” [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://luksavto.in.ua/ua/p1458411242-sredstvo-chistyaschee-nejtralnoe.html>
59. Засіб дезінфікуючий з мийними властивостями “ДЕЗОлайт” [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://gigienadez.com.ua/ua/p1648353852-dezolajt-dezinfitsiruyuschee-sredstvo.html>
60. Засіб дезінфікуючий «VASEPT ultra» ТОВ «Владасепт», Україна [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://vladasept.com.ua/ua/p917075125-vasept-ultra-kontsentrat.html>
61. Засіб дезінфікуючий «VASEPT forte», ТОВ «Владасепт», Україна [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://vladasept.com.ua/ua/p917102423-vasept-forte.html>
62. Засіб дезінфекційний універсальний “SANDEZ” [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://rozetka.com.ua/ua/213034057/p213034057/>
63. Засіб дезінфікуючий – шкірний антисептик «БіоЛонг» ТОВ «ВП «БІОЛОНГ», Україна [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://pestco.com.ua/ua/products/biolong-dezinfikuyuchiy-zasib-shkirniy-antiseptik-51.html>
64. Дезінфікуючий безспиртовий засіб "Септофан Форте" ТОВ «Українські Хімічні Технології ЛТД», Україна [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://clean-ua.com/dezinfikuuchiy-bezspirtoviy-zasib-septofan-forte-5000ml/>

65. Засіб дезінфекційний та антисептичний "СЕПТАНОЛ Екстра" [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://optsoroka.bigopt.com/goods/septanol-ekstra-11-zasib-antiseptichniy/>

66. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.

67. Пирог Т.П., Скроцька О.І. Загальна мікробіологія [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Т.П. Пирог, О.І. Скроцька. – К.: НУХТ, 2018. – 106 с.

68. Силікони [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/525/silikoni>

69. Повітрозбірники горизонтальні та вертикальні типу А1І серії 5.903-20 і 5.903-2 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://ptpk.prom.ua/ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html>

70. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>

71. Поршневі одноступінчасті компресори [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/porshnevi-odnostupinchasti-kompresory/>

72. Промислові осушувачі повітря Hankison рефрижераторного типу [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/promyslovi-osushuvachi-povitrya-hankison-refryzheratornogo-typu/>

73. ТОВ “Пневмат” [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://pneumatyka.com.ua/product-groups/zbiorniki-cisnieniowe-pionowe/>

74. Водяний нагрівач НКВ 600х300-4 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://vents-shop.com.ua/vodyanoj-nagrevatel-vents-nkv-600-300-4/>

75. Кишенькові фільтри від NEW FILTER [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kishenkovi-filtri-f5-dlya-ventilyatsiyi.html>
76. Магістральні фільтри очищення повітря модель SPF [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://www.koprig.com.ua/koprig/vozduh/filter_SPF.html
77. Колба конічна, 2 л конічна ТМ SIMAX [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://himreagent.com.ua/ua/p1238200221-kolba-konicheskaya-simax.html>
78. Stirred Pressure Autoclave Reactor [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://amarequip.com/stirred-pressure-autoclave-reactor>
79. Мембранний насос для рідин 1,5 л/хв [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p860452263-membrannyj-nasos-dlya.html>
80. Біореактори Biostat® Cplus Reactor [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://sartorius.com.ua/fermenteri-i-bioreaktori/sterilizuyemi-na-misczi-fermenteri-bioreaktori-cip/biostat-cplus/>
81. Microbial Stainless Steel Bioreactors BR500-M2 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.lab1st.com/microbial-stainless-steel-bioreactor>
82. Вагаовий дозатор 0,1-60 кг [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p565239385-vesovoj-dozator.html>
83. Реактор з гомогенізатором, "Енергопром" [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://energoprom.in.ua/ua/p1151912492-reaktor-800-litriv.html>
84. Арасо AG Reactor TRVA-R2Stainless Steel Reactor [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://foeth.com/de/reaktoren/edelstahlreaktoren/apaco-ag-reactor-trva-r2-stainless-steel-reactor-329t875>
85. Ваговий дозатор FlexWX [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://flexmash.com/uk/vagovij-dozator-flexwx/>
86. Airlift Fermenter Bioreactor Industrial [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.ollital.com/airlift-fermenter-bioreactor-industrial_p928.html#parentHorizontalTab021
87. Насос моноблочний Speroni CS 50-160 D3 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://watton.ua/speroni-nasos-cs50-160d-kw-3.html>

88. Ващенко О.В., Міхедькіна О.Й., Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології для студентів напрямку підготовки 6091501 «Харчові технології та інженерія» / уклад. О.В. Ващенко. – Харків: НТУ «ХПІ», 2008. –72с.

89. Єдунков О.О., Колесник Т.М. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «біотехнологія» для студентів спеціальності 101 «Екологія» денної та заочної форм навчання/ Борщевська І.М., Бєдунков О.О., Колесник Т.М. – Рівне: НУВГП, 2018 – 58с.

90. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько. Біотехнологія та біоінженерія: Підручник – 1-ша частина, – К.: КПІ, 2022

91. Агрономія Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з мікробіології для студентів II курсу з спеціальності 201 «Агрономія» / Укл.: к.с.-г.н. Шевченко Л.А., к.е.н. Кудряшова К.М., к.е.н. Рябуха Г.І. Чернігів: НУ «Чернігівська політехніка», 2020. 38 с

92. E.-H. Song, J. Shang, D.M. Ratne. Polysaccharides. University of Washington, Seattle, WA, USA. 2012. doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00246-6.

93. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.

94. Солдакін О.О., Пешкова В.М., Саяпіна О.Я., Дзядевич С.В.. Традиційні та біосенсорні методи моно- і дисахаридів – Київ, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. – 9-21 с.

95. О.О Солдакін, В.М. Пешкова, С.В. Дзядевич, Г.В. Эльська. Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для визначення сахарози –Київ, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. – 2008. – №1. – 116-122 с.

96. Визначення вмісту амінного азоту йодометричним методом по Попу і Стівенсу (мідним способом) [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>

97. Кухтин М.Д. Лабораторний практикум з мікробіології молока і молочних продуктів: навчальний посібник / Кухтин М.Д., Кравченко Х.Ю. – Тернопіль : Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2023. – 157 с.
98. Як перевірити якість закваски [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://surl.li/tszkw>
99. Коваленко, В. О. Мікробіологія молока та молочних продуктів [Текст]: навчальний посібник / В.О. Коваленко, В.В. Євлаш, Л.О. Чернома. – Х: ХДУХТ, 2011. – 136 с.
100. Мікробіологічний контроль якості заквасок [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://www.ni.biz.ua/9/9_2/9_23785_mikrobiologicheskij-kontrol-kachestva-zakvasok.html
101. Міфи і факти про сир, оригінальні смаки, або за що ми любимо сир? [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://milkservis.com/ua/n187431-mify-fakty-syre.html>
102. Бактеріофаги [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1836/bakteriofagi>
103. ДСТУ 4558:2006 Сир пошехонський. Технічні умови.
104. О.Л. Кляченко, М.Д. Мельничук, Т.В. Іванова Екологічні біотехнології: теорія і практика.: Навчальний посібник. – Вінниця, ТОВ «Нілан-ЛТД», 2015. –254 с.
105. Біологічна система очищення стічних вод і як вона працює [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://ziko.com.ua/all-article-shcho-take-biologichne-ochyshchennya-vod/>
106. Тверді промислові відходи: джерела утворення та екологічні аспекти проблеми [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://osvita.ua/vnz/reports/ecology/21365/>
107. Чебан Л.М. Загальна біотехнологія: навчально-методичний посібник. Модуль 1. – Чернівці: Чернівецький нац.ун-т, 2017. – 116 с.

108. Утилізація фільтрів [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://xn--80ancaco1ch7azg.xn--j1amh/uk/utilizatsiya-othodov/utilizatsiya-filtrov/>
109. Утилізація хімреактивів [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://xn--80ancaco1ch7azg.xn--j1amh/uk/utilizatsiya-othodov/utilizatsiya-ximreaktivov/>
110. Утилізація паперу [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://xn--80ancaco1ch7azg.xn--j1amh/uk/utilizatsiya-othodov/utilizatsiya-bumagi/>
111. Утилізація відходів лабораторії [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://xn--80ancaco1ch7azg.xn--j1amh/uk/utilizatsiya-othodov/utilizatsiya-othodov-laboratorii/>
112. Переробка та утилізація скла [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://xn--80ancaco1ch7azg.xn--j1amh/uk/utilizatsiya-othodov/utilizatsiya-stekla/>
113. Ernest Stadler. An Exhausting Solution for Fermentors. *Pharmaceutical Engineering Magazine*. 2018
114. Filtration application in fermentation [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.linkedin.com/pulse/filtration-applications-fermentation-yogin-patel>

Апробація роботи

1. Гіріна А., Грегірчак Н. Одержання біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 як компонента закваски // Матеріали 90-ї Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті" – Ч.1 (м.Київ: НУХТ, 11–12 квітня 2024 р.) – с. 382.

Матеріали 90-ї Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", 11–12 квітня 2024 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1.

14. Одержання біомаси *Leuconostoc mesenteroides* CMG713 як компонента закваски

Анастасія Гіріна, Наталія Грегірчак

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Проблемою сьогодення є необхідність пошуку та використання продуктивних штамів молочнокислих бактерій, які входять до складу заквасок та здатних до накопичення високого рівня біомаси та декстрану, при рості на дешевому поживному середовищі [1, 2].

Матеріали і методи. Проведено аналіз наукової літератури для вибору продуктивного штаму бактерій *Leuconostoc mesenteroides* та умов його культивування за опрацювання таких інформаційних джерел цитування як: PubMed, Google Scholar, Elsevier та ResearchGate.

Результати. Враховуючи хімічну будову та властивості екзополісахариду декстрану, а також особливості його використання в харчовій промисловості в якості загусника та стабілізатора, була припущена можливість його використання в сироварінні для покращення структури сиру та зменшення використання хімічно синтезованих харчових добавок. Використання в заквасці молочнокислих бактерій, що є продуцентами декстрану, може мати позитивний вплив на якість готового молочного продукту [2]. За аналізом наукових досліджень та порівняльним розрахунком умовної вартості цільового продукту запропоновано штам *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. Показано, що найбільше накопичення біомаси та екзополісахариду декстрану відбувається на 22±2 год біосинтезу при температурі 30°C [1].

Зазначимо, що за результатами досліджень кінцева концентрація екзополісахариду залежала від концентрації сахарози в поживному середовищі. Максимальне підвищення синтезу декстрану спостерігалось при концентрації субстрату 15%. Однак, враховуючи особливості умов біосинтезу молочнокислих бактерій, початкова концентрація субстрату в середовищі не повинна перевищувати 50 г/л. Тому на 6 та 12 год культивування нами запропоновано внести підживлення сахарози у вигляді 40%-го підживлювального розчину для досягнення необхідної концентрації вуглецевого живлення. Таким чином бактерії здатні засвоїти підживлювальний розчин та накопичити більшу кількість біомаси й декстрану: 24 г/л та 6,5 г/л відповідно. Накопичення декстрану та активність ферменту збільшувались з часом, що корелює з часом максимального накопичення біомаси *L. mesenteroides* CMG713 [1].

Висновки. Штам *L. mesenteroides* CMG713, здатний також до синтезу декстрану на дешевому середовищі, може розглядатися як перспективний компонент закваски для виробництва твердого сиру голандської групи

Література

1. Farwa Sarwat, Shah Ali Ul Qader, Afsheen Aman, Nuzhat Ahmed. (2008), Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), pp. 379-386.
2. Liang Wang, Huimin Tian, Wei Liu, Huanhuan Zheng, Haodong Wu, Yuedong Guanz, Qianyu Lu, Zili Lv. (2023), Effects of EPS-producing *Leuconostoc mesenteroides* XR1 on texture, rheological properties, microstructure and volatile flavor of fermented milk. *Food Bioscience*, 56. doi: 10.1016/j.fbio.2023.103371.