

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

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

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

«__» __лютого__ 2022 р.

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

«__» __лютого__ 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»
на тему: Нетрадиційні субстрати для одержання молочної кислоти

Виконав: здобувач II курсу, групи 01

ІЩЕНКО Юлія Борисівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник .КАРЛАШ Юрій Васильович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти (ім'я та прізвище) (підпис)

((ім'я та прізвище)) (підпис)

(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Галина МУТЕНКО
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“03” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ІЩЕНКО Юлії Борисівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Нетрадиційні субстрати для одержання молочної кислоти

керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, к.т.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 865-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи цільовий продукт: молочна кислота; біологічний агент:
Escherichia coli BLac-2106; субстрат: технічний
гліцерин.

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

Особливості мікробного синтезу молочної кислоти; Техніко-економічне обґрунтування; Обґрунтування вибору технологічної схеми; Специфікація обладнання; Опис технологічної схеми; Контроль виробництва; Обґрунтування вибору технологічної схеми отримання молочної кислоти; Підбір сучасних методів контролю виробництва; Специфікація обладнання післяферментаційної ділянки; Опис технологічної схеми; Контроль виробництва молочної кислоти.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва молочної кислоти – 2 аркуші формату А2.

Апаратурна схема виробництва молочної кислоти – 2 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Особливості мікробного синтезу молочної кислоти	03.11.2021 – 23.11.2021	
2	Техніко-економічне обґрунтування	24.11.2021 – 30.11.2021	
3	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.12.2021 – 06.12.2021	
4	Специфікація обладнання	07.12.2021 – 12.12.2021	
5	Опис технологічної схеми	13.12.2021 – 18.12.2021	
6	Контроль виробництва	19.12.2021 – 24.12.2021	
7	Обґрунтування вибору технологічної схеми отримання молочної кислоти	25.12.2021 – 30.12.2021	
8	Підбір сучасних методів контролю виробництва	31.12.2021 – 04.01.2022	
9	Специфікація обладнання післяферментаційної ділянки	05.01.2022 – 10.01.2022	
10	Опис технологічної схеми	11.01.2022 – 16.01.2022	
11	Контроль виробництва молочної кислоти	17.01.2022 – 27.01.2022	
12	Оформлення пояснювальної записки	28.01.2022 – 01.02.2022	

Здобувач

_____ (підпис)

Юлія ІЩЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Юрій КАРЛАШ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу молочної кислоти при культивуванні штаму *Escherichia coli* ВLас-2106, що синтезує у середовищі з технічним гліцерином 105 г/л молочної кислоти.

Розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва, яка включає допоміжні роботи (приготування мийних засобів для генерального і щоденного прибирання, а також для миття обладнання, підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів, приготування запасного розчину мікроелементів та розчину тіамін-HCl, підготовка та стерилізація поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу в колбах, в інокуляторі об'ємом 25 л та виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л), а також власне технологічний процес отримання молочної кислоти (вирощування посівного матеріалу, процес біосинтезу, відділення біомаси від культуральної рідини, доочищення фільтрату, іонообмінне очищення, вакуумне випарювання).

Кваліфікаційна робота викладена на 90 сторінках друкованого тексту, містить 15 таблиць, 5 рисунків і складається з вступу, одинадцяти розділів, списку використаної літератури (91 джерело) та графічної частини (2 креслення формату А1 та 2 креслення формату А2).

Ключові слова: нетрадиційні субстрати, технічний гліцерин, молочна кислота, *Escherichia coli* ВLас-2106, біосинтез, виділення.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ ..	8
1.1. Використання традиційних субстратів для синтезу молочної кислоти	8
1.2. Перспективи синтезу молочної кислоти на нетрадиційних субстратах	21
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	30
2.1. Потреба у цільовому продукті.....	30
2.2. Розрахунок потужності виробництва.....	33
2.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	33
2.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	34
2.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л.....	35
2.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	35
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	37
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування та перевірочний розрахунок складу поживного середовища	37
3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	44
РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	46
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	49
РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	57
6.1. Мікробіологічний контроль.....	57
6.2. Визначення концентрації біомаси	59
6.3. Визначення концентрації джерела вуглецю	59
6.4. Визначення концентрації джерела азоту	59
6.5. Визначення концентрації цільового продукту	61
РОЗДІЛ 7. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ	62

7.1. Обґрунтування стадій виділення і очищення молочної кислоти для виробництва лікарського засобу	62
7.1.1. Відділення біомаси від культуральної рідини	63
7.1.2. Доочищення фільтрату	65
7.1.3. Іонообмінне очищення	66
7.1.4. Концентрування	68
7.1.5. Пакування	69
РОЗДІЛ 8. ПІДБІР СУЧАСНИХ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА	70
8.1. Ідентифікація молочної кислоти	70
8.2. Кількісне визначення молочної кислоти	70
РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ ДІЛЯНКИ	72
РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	74
РОЗДІЛ 11. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ	77
11.1. Контроль якості готової продукції	77
11.2. Карта постадійного контролю	78
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	80

ВСТУП

Молочна кислота ще з давніх часів знайшла застосування у господарській діяльності людини, наприклад, для подовження терміну зберігання харчових продуктів, тобто у ролі консерванту. На сьогоднішній день попит на молочну кислоту збільшився через значний потенціал для її використання у біотехнологічних програмах в різних галузях промисловості, серед яких харчова, косметична, фармацевтична та хімічна [1].

Упродовж останніх років молочна кислота набула статусу промислово важливої кислоти органічного походження. Молочна кислота широко використовується у харчовій, текстильній, мийній та паперовій промисловості, а останнім часом її застосовують і для виробництва цінних продуктів у сфері фармацевтичної промисловості. Оптично чиста L-молочна кислота може бути отримана лише ферментативним синтезом та мікробною ферментацією. Але ензиматичний метод є недоцільним для промислового виробництва через його високу вартість і складність процесу. На сьогоднішній день близько 90% молочної кислоти у світі виробляється шляхом мікробного синтезу [2].

Разом з тим встановлено, що попит на молочну кислоту постійно зростає при темпі росту в умовах сучасного ринку на рівні 8% річних, однак її широке застосування залишається обмеженим внаслідок високої вартості лактату. Відомо, що для мікробного синтезу молочної кислоти використовують традиційні субстрати, серед яких глюкоза, фруктоза, сахароза, крохмаль та інша вуглеводмісна сировина. Вартість сировини, попередня обробка та оцукрювання сировини методами фізико-хімічної та ферментативної обробки виступають у ролі процесів, що перешкоджають рентабельному виробництву молочної кислоти [3].

У зв'язку з цим, **актуальністю** даної роботи є пошук та використання дешевих джерел сировини для отримання молочної кислоти із різноманітних відходів виробництв, що складають значну групу нетрадиційних субстратів для культивування мікроорганізмів. Серед таких субстратів особливою актуальністю наразі користуються відходи виробництва біодизелю, зокрема технічний гліцерин.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ

1.1. Використання традиційних субстратів для синтезу молочної кислоти

Молочна кислота це багатofункціональна промислово цінна органічна кислота, нещодавні дослідження засвідчили той факт, що вона має найбільш перспективне застосування у виробництві біосумісних та біодеградабельних полімерів, таких як полімолочна кислота. Застосування альтернативних субстратів у процесах біосинтезу молочної кислоти, що передбачають використання дешевої сільськогосподарської сировини або побічних продуктів різних галузей промисловості (висівок, кукурудзяного сиропу, сироватки, гліцерину тощо), знижує вартість виробництва і, відповідно, вартість кінцевого продукту. Однак такі субстрати мають не до кінця визначений склад, точний загальний обсяг сполук, що містяться в таких субстратах, є часто невідомий. Так, деякі сполуки, які можуть бути присутніми в складі джерела вуглецю, здатні пригнічувати ріст мікроорганізмів-продуцентів або перешкоджати синтезу молочної кислоти [4].

Тому застосування таких традиційних субстратів як глюкоза [5-10, 12, 14-15, 18, 19, 21-25, 27-30], ксилоза [12, 13, 16, 17, 19, 27], целобіоза [11, 27] та інших вуглеводмісних речовин [4, 20, 26] є оптимальним рішенням, зважаючи на простоту та відомий склад таких субстратів.

Біосинтез молочної кислоти продуцентами бактеріального походження

Значна частина сучасної літератури представлена роботами, які присвячені дослідженню мікробного синтезу молочної кислоти на традиційних субстратах. Так, у роботі [5] Wang зі співавторами визначили особливості синтезу L-молочної кислоти при культивуванні *Lactobacillus rhamnosus* LA-04-1.A на традиційних

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 1. Особливості мікробного синтезу молочної кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іщенко Ю.Б.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					8	22
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

змішаних вуглеводневих субстратах. Показано, що при зростанні концентрації глюкози, фруктози та сахарози з 44,38 до 100,1 г/л у середовищі культивування продуцента спостерігали і підвищення кількості молочної кислоти – 44-78 г/л.

Senedese зі співавторами у роботі [4] представили результати дослідження синтезу L-молочної кислоти штамом *L. rhamnosus* ATCC 10863 при його культивуванні на цукровмісному субстраті – мелясі. Середовище для біосинтезу містило 27,6 г/л меляси та 3 г/л дріжджового екстракту, культивування здійснювали у звичайному періодичному режимі та з підживленням при температурі 43,4 °C і pH 5,0. Підживлення мелясою здійснювали через 12, 24 та 36 год. Так, внаслідок саме культивування з підживленням було отримано більшу кількість лактату – 22 г/л, ніж за звичайного періодичного біосинтезу – 16,5 г/л.

Інші дослідники у статті [6] досліджували синтез молочної кислоти штамом *Lactobacillus pentosus* CECT 4023 T. Встановлено, що у середовищі з 20 г/л глюкози та 25% (об'ємна частка) прегідролізату пшениці за строго анаеробних умов культивування показники синтезу молочної кислоти були вищі (17,76 г/л), порівняно з кількістю лактату, отриманого у такому ж середовищі з 75% (об'ємна частка) прегідролізату пшениці за власне анаеробних умов – 0,79 г/л. При цьому автори не акцентували увагу на різниці між строго анаеробними та власне анаеробними умовами культивування продуцента.

Порівняння синтезу молочної кислоти *Lactobacillus delbrueckii* Ус-3 та мутантним штамом FM1 провели автори роботи [1]. Показано, що у модифікованому середовищі MRS з 25 г/л глюкози рівень синтезу молочної кислоти мутантним штамом FM1 був в 11 разів вищим (10,2 г/л), порівняно з показниками синтезу за культивування штаму Ус-3 – 0,911 г/л. Дослідники зазначили, що дана робота стала першою доповіддю про виробництво недисоційованої L-молочної кислоти лактобактеріями з використанням процесу відновлення *in situ* з високим рівнем синтезу продукту станом на 2018 рік.

На сьогоднішній день в основному досліджується виробництво L-молочної кислоти, у той час як інформація про біосинтез D-молочної кислоти обмежена. Целюлозно-кукурудзяний корм являє собою відновлювані лігноцелюлозні

матеріали, які можна гідролізувати до цукрів та використовувати для біосинтезу D-молочної кислоти. Так, у роботі [7] описано процес оцукрювання кукурудзяного корму целюлазою CTec2, а цукри, отримані в результаті гідролізу, були субстратом для отримання D-молочної кислоти внаслідок культивування гомоферментативного штаму *L. delbrueckii* ATCC 9649. Так, 36,3 г/л D-молочної кислоти з оптичною чистотою 99,8% було отримано при періодичному культивуванні продуцента у цукровмісному середовищі, що містило 40 г/л глюкози.

У іншій статті [8] представлено результати дослідження особливостей біосинтезу D-лактату штамом *L. delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. Так, штам QU 41 виявляв високу термотолерантність і продукував D-молочну кислоту при температурах 50 °C і вище. З метою оптимізації умов культивування штаму QU41 автори роботи дослідили вплив pH, температури, нейтралізуючого реагенту та початкової концентрації глюкози на виробництво D-молочної кислоти в періодичних культурах. Було встановлено, що оптимальну кількість (20,1 г/л) D-молочної кислоти з високою оптичною чистотою (> 99,9%) було отримано в контрольованій культурі з підтримкою pH на рівні 6,0 шляхом додавання гідроксиду амонію як нейтралізуючого реагенту, при 43 °C у середовищі MRS, що містило 20 г/л глюкози, у той час як при збільшенні кількості субстрату до 100 г/л концентрація лактату становила 87,4 г/л.

Штам молочнокислої бактерії *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121 ізолювали з ґрунту біля підприємства з виробництва етанолу (Changhae Ethanol, Чонджу, Корея) та ідентифікували за допомогою аналізу послідовності гену 16S рРНК [9]. Штам ефективно продукував 192 г/л молочної кислоти із середовища, що містить 200 г/л глюкози, з продуктивністю 3,99 г/(л·год) та виходом 0,96 г/г. Оптична чистота отриманого L(+)-лактату становила 96,6%.

Вплив температури на ріст та продукцію L-молочної кислоти *Lactobacillus casei* G-03 досліджували Qin зі співавторами [10]. Було встановлено, що максимальну концентрацію молочної кислоти 160,2 г/л досягали при культивуванні у середовищі з 170 г/л глюкози за температури 41 °C. Дослідники

зазначили, що за підвищення чи навпаки зниження температури концентрація лактату та біомаси відповідно теж знижувалась. Окрім цього, було визначено вплив температури на розподіл основних метаболітів штаму G-03. Результати показали, що саме за температури 41 °C спостерігали максимальний потік вуглецю у напрямку молочної кислоти в піруватному вузлі, при цьому потік вуглецю у напрямку до оцтової кислоти був мінімальним. Це свідчить про наявність впливу умов культивування на ефективну продукцію лактату.

Для ефективного використання целюлозної біомаси для економічного виробництва молочної кислоти необхідним є пошук продуцента, який би мав потенційну здатність використовувати не тільки глюкозу, але і целобіозу. Так, у статті [11] Abdel-Rahman зі співавторами показали, що серед значної кількості штамів (631), виділених з різноманітних зразків навколишнього середовища, штам *Enterococcus mundtii* QU25 виявився найперспективнішим продуцентом L-(+)-молочної кислоти високої оптичної чистоти за його культивування у середовища з целобіозою. В ході експерименту дослідниками було проведено оптимізацію умов біосинтезу лактату – для періодичного режиму культивування оптимальне значення pH було 7, а температури – 43 °C. Штам QU25 був здатен одночасно метаболізувати суміш глюкози та целобіози (по 20 г/л) без явного пригнічення катаболізму вуглецю та за утворення 35,1 г/л молочної кислоти, однак підвищення кількості целобіози до 151 г/л супроводжувалось відповідно і підвищеним рівнем синтезу молочної кислоти – 119 г/л. Оптична чистота синтезованого L-лактату становила 99,9%. Такі результати засвідчили той факт, що *E. mundtii* QU25 є потенційним кандидатом для ефективного виробництва молочної кислоти із традиційних цукровмісних целюлозних гідролізатних матеріалів.

Пізніше у 2015 році ці ж автори у праці [12] навели продовження дослідження можливості біосинтезу молочної кислоти штамом *E. mundtii* QU25 у середовищі з глюкозою та ксилозою. Повідомляється, що максимального значення кількості лактату 129 г/л вдалось досягти за наявності 25 г/л глюкози та удвічі більшої кількості ксилози (50 г/л) з додаванням 5 г/л дріжджового

екстракту. При цьому відбувався синтез чистого продукту (99,5%) без інших побічних сполук. Біосинтез проводили за періодичного режиму з підживленням сумішшю субстратів та використанням гідроксиду амонію як нейтралізуючого агента.

У іншій роботі Abdel-Rahman зі співавторами визначили оптимальні умови для біосинтезу молочної кислоти іншим продуцентом – *Enterococcus faecium* QU50 [13]. Так, за рН 6,5, температури 50 °С та наявності у середовищі 22,8 г/л ксилози як субстрату концентрація лактату становила 23,7 г/л, оптична чистота отриманого метаболіту становила близько 99,2%.

У 2019 році ці ж дослідники описали особливості культивування ще одного штама-продуцента молочної кислоти – *Enterococcus hirae* BoM 1-2 [14]. Результати оптимізації умов культивування показали, що максимальну концентрацію лактату 109,9 г/л зафіксували за внесення 150 г/л глюкози, при рН 9,0 та 40 °С.

Інші дослідники у роботі [2] дослідили новий адаптований штам *E. faecium* S.156, який здатен до продукування енантіоселективної L-молочної кислоти. За наявності 120 г/л глюкози концентрація синтезованої молочної кислоти була на рівні 91,3 г/л, у той час як у процесі оптимізації середовища (150 г/л глюкози) вдалось збільшити концентрацію L-лактату до 126 г/л. Отримана молочна кислота володіла високою оптичною чистотою (99,7%), високою продуктивністю (5,25 г/л*год) та коефіцієнтом конверсії >90%. Виробництво L-молочної кислоти залишалося стабільним у діапазоні температур 32-40 °С і при значеннях рН від 5,5 до 6,5. Зміна рівня кисню (0-4 л/хв) не впливала ні на зростання біомаси, ні на ферментацію L-молочної кислоти.

Yokaryo зі співавторами [15] повідомили про можливість синтезу молочної кислоти алкалофільними штамами бактерій, які було виділено з різних лужних джерел (рН 10) Окінави (Японія). Упродовж ферментації багато штамів змогли перетворити глюкозу в переважно L-(+)-молочну кислоту високої оптичної чистоти в лужних умовах, це свідчить про те, що бактерії, які продукують молочну кислоту, можуть бути ефективно виділені шляхом скринінгу в лужних

умовах. Було відібрано шість штамів та порівняно їх здатність синтезувати молочну кислоту при різних початкових значеннях рН. Штам *Enterococcus casseliflavus* 79w3 дав найвищу концентрацію молочної кислоти. Так, за проведення періодичного культивування при 30 °С та наявності 129 г/л глюкози як субстрату концентрація молочної кислоти становила 103 г/л, а оптична чистота отриманого L-ізомеру склала 99,5%.

Економічно ефективний спосіб культивування оптично чистої молочної кислоти із цукрів лігноцелюлози за допомогою *Bacillus coagulans* C106 навели автори статті [16]. Ферментацію проводили при 50 °С та рН 6,0 в ксилозовмісному середовищі з мінеральними солями, що містить 1-2% (об'ємна частка) дріжджового екстракту, причому особливістю такого способу була відсутність стерилізації поживного середовища. Встановили, що при періодичній ферментації з 85 г/л ксилози кількість лактату становила 83,6 г/л, у той час як за проведення підживлення культури (120 + 80 + 60 г / л ксилози) концентрація молочної кислоти досягла 215,7 г/л. В обох випадках вихід молочної кислоти та оптична чистота досягли 95% та 99,6% відповідно. Також було відмічено вплив титруючого агенту на інтенсивність синтезу лактату. Так, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ є кращим нейтралізуючим агентом, ніж NaOH , оскільки кількість та продуктивність молочної кислоти у цьому разі була в 1,2 та 1,8 рази відповідно вище, ніж при застосуванні NaOH .

Пізніше ці ж дослідники [17] описали метод отримання молочної кислоти при культивуванні з підживленням іншого штаму – *B. coagulans* J112. Початкова кількість ксилози становила 85 г/л, через 7,5 год було здійснено підживлення (55 г/л), температура та рН становили 50 °С та 6,0 відповідно, середовище для культивування стерилізації не піддавали. За таких умов концентрація лактату досягла 137,5 г/л, оптична чистота була на рівні >99,5%.

Біосинтез молочної кислоти продуцентами грибного походження

Одноступеневий процес ферментації молочної кислоти грибом *Rhizopus oryzae* LA-UN-1 наведено у статті [18]. Такий метод виявився більш ефективним – культивування продуцента у середовищі з 100 г/л глюкози супроводжувалось

підвищеним синтезом продукту (62 г/л), порівняно з показниками за стандартного режиму ферментації – кількість молочної кислоти становила 57 г/л. Однак, автори зазначили, що такий процес потребує значних затрат на сировину через збільшену кількість субстрату.

Можливість синтезу молочної кислоти представником роду *Rhizopus* встановлено також і у статті [19]. Штам *Rhizopus oryzae* GY18 вирощували як на глюкозі, так і на ксилозі, при цьому тривалість культивування була різною – 72 та 120 год. За наявності однакової концентрації кожного із субстратів (100 г/л) більшу концентрацію L-лактату 75,2 г/л спостерігали при вирощуванні *R. oryzae* GY18 у глюкозовмісному середовищі, тоді як на ксилозі отримали меншу кількість продукту – 68,5 г/л. При підвищенні концентрації глюкози до 180 г/л відповідно збільшилась і концентрація молочної кислоти до 102 г/л.

Shahri зі співавторами [20] дослідили процес біосинтезу L-(+)молочної кислоти штамом *R. oryzae* PTCC 5263 у середовищі з картопляним крохмалем в ерліфтному ферментері. Так, за наявності 10 г/л крохмалю після 48 годин ферментації концентрація молочної кислоти становила 5 г/л.

У іншій роботі [21] було висвітлено особливості напівбезперервної ферментації *R. oryzae* AS 3.819 для виробництва молочної кислоти. Було досліджено вплив таких факторів, як кількість інокуляту, час додавання CaCO_3 , температурний режим на вихід L-молочної кислоти. Результати показали, що оптимальними умовами ферментації були: інокуляція суспензією спор у кількості 4%, додавання CaCO_3 до культурального середовища на початку ферментації, а також температура культивування 32–34 °C. Також було проведено підживлення культури протягом культивування, середовище для підживлення містило 100 г/л глюкози. Отже, за таких умов та початкової концентрації глюкози 120 г/л, що супроводжувалось підживленням, кінцева концентрація L-молочної кислоти досягла 103,7 г/л, а об'ємна продуктивність становила 2,16 г/(л·год).

Процес отримання лактату за проведення культивування продуцента з підживленням описали і Yamane зі співавторами [22]. Так, при початковій концентрації глюкози 150 г/л і наступному підживленню (100 г/л) у процесі

культивування *R. oryzae* NBRC 5384 при 37 °C кількість безводного лактату кальцію становила 280 г/л, що відповідає 231 г/л молочної кислоти, оптична чистота якої була >98%.

Біосинтез молочної кислоти продуцентами дріжджового походження

Полімолочна кислота є важливим відновлюваним полімером, але поточні процеси отримання її попередника – молочної кислоти, зазнають певних труднощів внаслідок зниження ефективності процесу, що пов'язано з використанням бактеріальних продуцентів. Тому покращення здатності дріжджів, а саме *Saccharomyces cerevisiae* виробляти молочну кислоту є перспективним підходом для поліпшення її промислового виробництва. Для цього необхідною мірою є збільшення толерантності дріжджових клітин до молочної кислоти. Так, у статті [23] дослідники описали реалізований підхід до підвищення кислотостійкості дріжджового штама-продуцента – було ідентифіковано декілька мішеней для нокдауна гена, який відповідає за підвищену кислотостійкість *S. cerevisiae* BY4741. Потім обрану мішень було перенесено у штам *S. cerevisiae* CEN.PK, внаслідок цього штам міг продукувати молочну кислоту у надлишку. Отриманий штам CEN.PK за культивування у середовищі з 80 г/л глюкози синтезував близько 50,57 г/л лактату за 60 год ферментації.

У іншій роботі [24] Baek зі співавторами представили дослідження синтезу D-ізомеру молочної кислоти рекомбінантним штамом *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C. Продукцію D-молочної кислоти було досягнуто шляхом експресії високостереоспецифічного гену D-лактатдегідрогенази із *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 в штам *S. cerevisiae*, який не має природної здатності продукувати лактат. Толерантність сконструйованого штаму до лактату було посилено адаптивною еволюцією та над експресією гену HAA1, що кодує активатор транскрипції, що бере участь в слабкій реакції на кислотний стрес, це призвело до ефективного біосинтезу D-молочної кислоти у концентрації 48,9 г/л без нейтралізації. При періодичному режимі ферментації за наявності початкових кількості глюкози 100 г/л з підживленням (розчин мав концентрацію

800 г/л, його додавали за зниження кількості субстрату в середовищі до 5 г/л) в умовах нейтралізації *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C синтезував 112 г/л лактату.

Пізніше ці ж дослідники [25] встановили можливість синтезу D-лактату іншим рекомбінантним штамом – *S. cerevisiae* JHY5710, який створили шляхом експресії гену D-лактатдегідрогенази (Lm. LdhA) з *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, одночасно видаляючи гени, що беруть участь у побічному продукуванні етанолу (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 та ADH5), гліцерину (GPD2), і деградації D-молочної кислоти (DLD1). Адаптивна лабораторна еволюція вихідного штаму JHY5610 призвела до того, що отриманий штам *S. cerevisiae* JHY5710 мав вищу толерантність до лактату та здатність до підвищеного продукування D-ізомеру основного метаболіту. Штам JHY5710 був додатково вдосконалений шляхом видалення гену PDC1, що кодує піруватдекарбоксилазу. Отриманий штам JHY5730 продукував 82,6 г/л D-молочної кислоти за наявності початкової кількості глюкози 60 г/л з періодичним підживленням (розчин концентрацією 800 г/л) при pH 3,5.

Mimitsuka зі співавторами [26] дослідили ефективність періодичної та безперервної ферментації молочної кислоти генетично модифікованим штамом *S. cerevisiae* SW092-2D. Так, за безперервного режиму культивування в мікроаеробних умовах та наявності початкової концентрації 75 г/л тростинного цукру як субстрату, що супроводжувалось підживленням, кількість D-молочної кислоти становила 74,6 г/л, у той час як при періодичному режимі отримали меншу кількість лактату – 39 г/л.

Здатність генно-інженерного штаму *S. cerevisiae* EJ4 споживати лігноцелюлозні гідролізати з утворенням молочної кислоти визначили автори роботи [27]. Штам EJ4 було створено шляхом інтеграції у нього генів, що кодують транспорт целобіози, β -глюкозидазу, ксилоредуктазу, ксилітдегідрогеназу, ксилулокіназу та лактатдегідрогеназу. При ферментації целюлозної цукрової суміші, що містила 10 г/л глюкози, 40 г/л ксилози та 80 г/л целобіози, отриманий штам EJ4 утворив 83 г/л молочної кислоти з виходом 0,66 г молочної кислоти/г цукру (66% теоретичний максимум). Такі результати

демонструють початкові кроки до ефективного виробництва молочної кислоти з лігноцелюлозних цукрів рекомбінантними дріжджами.

Синтез D-молочної кислоти рекомбінантним штамом *S. cerevisiae* YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18 дослідили і автори статті [28]. Так, при періодичному культивуванні штаму YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18 у середовищі з 100 г/л глюкози рівень синтезу D-лактату становив 63 г/л, а його оптична чистота склала 99,9%.

Mitsui зі співавторами [29] сконструювали генно-інженерний штам *S. cerevisiae* pHLA2-51, що володів толерантністю до молочної кислоти, що супроводжувалось зниженням затрат на нейтралізацію при виробництві лактату. Так, експресія генів, пов'язаних з гліколізом та шляхом синтезу молочної кислоти в дріжджах, що володіють кислотостійкістю, була всебічно і випадково модифікована для створення D-лактат-продукуючого лактат-толерантного штаму дріжджів pHLA2-51. Отриманий штам синтезував близько 33,9 г/л D-молочної кислоти із 100 г/л глюкози без нейтралізуючих агентів та 52,2 г/л D-лактату із 100 г/л глюкози з додаванням 20 г/л CaCO_3 з метою забезпечення напівнейтралізованих умов. Оптична чистота молочної кислоти була $> 99 \%$.

Іншими дослідниками було описано здатність рекомбінантних дріжджів *Candida sonorensis* синтезувати L-молочну кислоту [30]. Штам *C. sonorensis* ATCC32109 було отримано внаслідок експресії генів, що кодують L-лактатдегідрогеназу, із *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus megaterium* та *Rhizopus oryzae* у новий цільовий штам *C. sonorensis*, причому автори зазначили, що даний мікроорганізм не є типовим продуцентом L-лактату. Так, при концентрації глюкози як субстрату 10% (об'ємна частка) та pH 3,5 концентрація молочної кислоти склала 92 г/л, а її оптична чистота становила 99%. Автори акцентували увагу на тому, що отримані дані з використання дріжджів роду *Candida* як продуцентів оптично чистого лактату засвідчують можливість використання й інших дріжджових штамів з метою промислового виробництва молочної кислоти.

Таким чином, проаналізувавши вищеописану інформацію про результати дослідження біосинтезу молочної кислоти у середовищі з традиційними

вуглеводневими субстратами, викладену в статтях іноземних науковців, можна зробити висновок, що за концентрацій субстрату 10-260 г/л спостерігали синтез лактату у кількості 5-231 г/л, причому найбільші кількості молочної кислоти отримали при проведенні процесу культивування, що супроводжувався підживленням. Слід відмітити, що перевагою використання традиційних джерел вуглецю для продукування молочної кислоти є їх точно визначений склад, а характеристика таких речовин є добре вивченою, отже, це зводить до мінімуму ризик пригнічення росту продуцента та перешкоджання синтезу цільового продукту.

Загальну інформацію про біосинтез молочної кислоти на традиційних вуглеводних субстратах представлено у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Узагальнені дані щодо синтезу молочної кислоти на традиційних цукровмісних субстратах

Продуцент молочної кислоти	Субстрат	Концентрація субстрату, г/л	Концентрація молочної кислоти, г/л	Оптична чистота лактату, %	Література
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA-04-1.A	Глюкоза	100,1	78	*Н.в.	[5]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 10863	Меяса	27,6	22	Н.в.	[4]
<i>Lactobacillus pentosus</i> CECT 4023T	Глюкоза + 25% (об'ємна частка) прегідролізату пшениці	20	17,76	Н.в.	[6]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> FM1	Глюкоза	25	10,2	Н.в.	[1]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649	Глюкоза	40	36,3	99,8	[7]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> QU 41	Глюкоза	100	87,4	99,9	[8]
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CHB2121	Глюкоза	200	192	96,6	[9]
<i>Lactobacillus casei</i> G-03	Глюкоза	170	160,2	Н.в.	[10]
<i>Enterococcus mundtii</i> QU 25	Целобіоза	151	119	99,9	[11]
	Глюкоза+ксилоза	25+50	129	99,5	[12]
<i>Enterococcus faecium</i> QU50	Ксилоза	22,8	23,7	99,2	[13]
<i>Enterococcus hirae</i> BoM1-2	Глюкоза	150	109,9	99,7	[14]
<i>Enterococcus faecium</i> S.156	Глюкоза	150	126	99,7	[2]
<i>Enterococcus casseliflavus</i> 79w3	Глюкоза	129	103	99,5	[15]
<i>Bacillus coagulans</i> C106	Ксилоза	120 + 80 + 60	215,7	99,6	[16]
<i>Bacillus coagulans</i> JI12	Ксилоза	85+55	137,5	99,5	[17]
<i>Rhizopus oryzae</i> LA-UN-1	Глюкоза	100	62	Н.в.	[18]
<i>Rhizopus oryzae</i> GY18	Ксилоза	100	68,5	98,5	[19]
	Глюкоза	180	102		
<i>Rhizopus oryzae</i> PTCC 5263	Картопляний крохмаль	10	5	Н.в.	[20]
<i>Rhizopus oryzae</i> AS 3.819	Глюкоза	120	103,7	Н.в.	[21]
<i>Rhizopus oryzae</i> NBRC 5384	Глюкоза	150	231	98	[22]

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK	Глюкоза	80	50,57	Н.в.	[23]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	Глюкоза	100	112	Н.в.	[24]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JHY5710	Глюкоза	60	82,6	Н.в.	[25]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SW092-2D	Тростинний цукор	75	76,8	99,9	[26]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EJ4	Глюкоза	10	83	Н.в.	[27]
	Ксилоза	40			
	Целобіоза	80			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH499/dPdA3-34/DLDH/1-18	Глюкоза	100	60,3	99,9	[28]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pHLA2-51	Глюкоза	100	52,2	99	[29]
<i>Candida sonorensis</i> ATCC32109	Глюкоза	10% (об'ємна частка)	92	99	[30]

Примітка*Н.в. – не визначали оптичну чистоту молочної кислоти у даній роботі.

1.2. Перспективи синтезу молочної кислоти на нетрадиційних субстратах

Слід зазначити, що у зв'язку зі зростанням обсягів біотехнологічного виробництва молочної кислоти на початку XXI століття виникла потреба у зменшенні виробничих витрат шляхом заміни рафінованих субстратів (глюкоза, сахароза тощо) на більш дешеву сировину (відходи інших виробництв, целюлозовмісні матеріали і тд) [31].

Відходи харчових виробництв як субстрати для біосинтезу молочної кислоти

У статті [32] дослідники використовували арахісовий шрот для отримання молочної кислоти. Найвищий рівень синтезу D-лактату спостерігали за культивування *Sporolactobacillus* sp. CASD з 40 г/л арахісового шроту – 207 г/л, при цьому оптична чистота продукту становила 99,3%.

Синтез L-молочної кислоти у середовищі з топінамбуром описано в роботі [33]. Так, при культивуванні *L. casei* G-02 у середовищі з 200 г/л борошна топінамбуру протягом 30 год рівень синтезу лактату становив 141,5 г/л. Автори зазначають, що використання такого субстрату для синтезу молочної кислоти характеризується економічністю виробництва.

Інші дослідники встановили можливість мікробного синтезу лактату *Lactococcus lactis* IO-1 на детоксифікованому гідролізаті цукрової тростини [34]. Так, за культивування продуцента у середовищі з гідролізатом, що містить 30 г/л ксилози, концентрація молочної кислоти становила 10,85 г/л. Автори зазначили, що ксилоза як основний цукор у гідролізаті, метаболізувалась до молочної кислоти шляхом гетеролактичного бродіння або змішаного кислого бродіння.

Застосування мікроводоростей як субстрату для отримання молочної кислоти описано у статті [35]. За вирощування штаму *Lactobacillus coryniformis* sub. *torquens* ATCC 25600 протягом 36 год у середовищі з 80 г/л сухої біомаси мікроводоростей *Hydrodictyon reticulatum* концентрація лактату становила 36,6 г/л. При цьому оптична чистота отриманої D-молочної кислоти була в межах 95,8-99,6%.

Пізніше ці ж дослідники встановили можливість синтезу L- та D-форм молочної кислоти у середовищі з куркумою [36]. Відомо, що бульбові кореневища (або підземні стебла) куркуми *Curcuma longa* використовувались з давнини як приправи, барвник та ароматизатор у деяких лікарських засобах. Культивування *Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600 та *Lactobacillus paracasei* LA104 проводили у середовищі з 140 г/л висушеної маси куркуми, при цьому концентрація молочної кислоти становила 97,13 г/л та 91,61 г/л відповідно. Автори акцентують увагу на тому, що даний процес є простим, ефективним та може бути застосований при промисловому виробництві молочної кислоти, використавши залишки *Curcuma longa* без необхідності зміни обладнання.

У статті [37] досліджували отримання молочної кислоти у середовищі з целюлозою листяних порід рослин. Встановлено, що культивування штаму *L. plantarum* NCIMB 8826 протягом 72 год за наявності 5-15% целюлози листової сировини супроводжувалось синтезом молочної кислоти у кількості 55,2-84,6 г/л. Оптична чистота D-лактату становила 99,2%.

Використання крохмалю як субстрату для виробництва молочної кислоти наведено у роботі [38]. Показано, що за наявності 50 г/л крохмалю у середовищі культивування *Weissella* sp. S26 концентрація молочної кислоти досягла 24,2 г/л, причому 23,6 г/л припадає на D-лактат, а 0,6 г/л – на L-форму. Також встановили, що оптична чистота D-ізомеру становила 99,5%.

Щорічно у Китаї у якості відходів виробництв утворюється близько 20 мільйонів тонн кукурудзяних качанів. Автори статті [39] дослідили перспективи використання такої сировини для мікробного синтезу молочної кислоти. Гідролізат кукурудзяних качанів вносили у середовище культивування *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 у такій кількості, щоб кількість редукуючих цукрів складала 100-150 г/л, при цьому було визначено, що концентрація D-молочної кислоти склала 107,2 г/л. Також дослідники визначили, що при використанні бавовняного борошна як субстрату (3,7 г/л) концентрація D-лактату становила 120 г/л. Таким чином, бавовняне борошно виявилось кращим субстратом для синтезу кислоти.

Використання відходів молочної промисловості (молочної сироватки) та агропромисловості у якості субстратів для синтезу молочної кислоти описано у роботі [40]. Встановлено, що культивування *Lactobacillus rhamnosus* B103 у середовищі з 60 г/л лактози з сироватки та 45 мл/л кукурудзяного лікєру супроводжується синтезом L-молочної кислоти у концентрації 143,7 г/л.

Відходи молочної промисловості для синтезу молочної кислоти використовували також автори роботи [41]. Так, за культивування штаму *Lactobacillus lactis* ATCC 4797 у середовищі з казеїновим сироватковим пермеатом, що містить 35 г/л лактози, концентрація D-лактату становила 24,3 г/л. Оптична чистота отриманої молочної кислоти була більше 98%.

Синтез молочної кислоти у середовищі з гідролом, соєвими залишками та солодом описано авторами статті [42]. Було визначено, що за культивування штаму *E. faecalis* RKY1 у середовищі з 100 г/л гідролу, 150 г/л гідролізату соєвих залишків та 20 г/л солодового гідролізату рівень синтезу L-молочної кислоти становив 96,1 г/л. Оптична густина отриманої кислоти була більше 97,5%. Автори зазначили, що оскільки ці субстрати є відходами агропромисловості, такий спосіб одержання лактату є економічно та екологічно вигідним.

Інші дослідники для синтезу D-лактату використовували лігноцелюлозну сировину [43]. Так, при культивуванні мутантного штаму *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 *ldhL1* у середовищі з кукурудзяною соломою (ксилоза, 40 г/л) відбувався синтез молочної кислоти у концентрації 27,3 г/л. Оптична густина синтезованого лактату становила 99,5%.

Російські вчені у роботі [44] показали можливість використання вівсяних висівок для синтезу молочної кислоти. Так, за культивування гриба *Rhizopus oryzae* F-1030 у середовищі з вівсяними висівками (вміст редукуючих речовин 27,93 г) від'ємно-доливним методом кількість молочної кислоти становила 4,63 г, при цьому загальний вихід продукту становив 17,5%.

Пізніше інші вчені також провели синтез молочної кислоти штамом F-1030 у поживних середовищах з гідролізатом клітковини [3]. Культивування проводили від'ємно-доливним та періодичним методом, так за використання першого методу

кожні 4 години протягом 24 год відбирали 100 мл і доливали таку ж кількість поживного середовища. Витрата редукуючих речовин у субстраті за весь час культивування за обох методів в середньому становила 55 ± 5 г/л. Автори зазначили, що використання від'ємно-доливного методу супроводжувалось синтезом молочної кислоти, кількість якої була у 1,5 рази більшою – 7,87 г, порівняно з періодичним методом – 4,74 г. Також дослідники зауважили, що складністю проведення періодичного культивування був процес нормалізації рН середовища, що вказує на доцільність використання саме від'ємно-доливного методу при синтезі молочної кислоти.

Mladenović зі співавторами встановили можливість синтезу L-молочної кислоти у середовищі з відходами агропромисловості [45]. Так, за вирощування штаму *L. paracasei* A-22 у середовищі з патокою цукрових буряків (5-25 %, об'ємна частка) та картопляними залишками рівень синтезу молочної кислоти становив 169,9 г/л. Оптична чистота лактату становила 99%.

Автори роботи [46] описали метод отримання молочної кислоти у середовищі з кавовою гущею. Так, за культивування рекомбінантного штаму *Saccharomyces cerevisiae* SR8 LDH у середовищі з 10 г кавової макухи концентрація лактату становила 11,2 г/л. Такий спосіб отримання молочної кислоти забезпечує скорочення обсягів відходів при екстракції кави у промисловому кавовому виробництві.

Інші дослідники у статті [47] описали результати використання очеретяної патоки як джерела вуглецю при виробництві молочної кислоти штамом *Bacillus coagulans* H-1. Так, за наявності у середовищі з глюкозою (185 г/л) 149 г/л очеретяної патоки кількість L-лактату в кінці культивування становила 168,3 г/л.

Відходи біопаливної промисловості як субстрати для біосинтезу молочної кислоти

Відомо, що відходом виробництва біодизелю є технічний гліцерин. Так, автори статті [48] показали можливість використання такого легко відновлюваного ресурсу як технічний гліцерин для виробництва молочної кислоти. Культивування штаму *Escherichia coli* BLac-2106 здійснювали за

наявності 121 г/л гліцерину протягом 40 год. Встановлено, що концентрація D-лактату становила 105 г/л, чистота отриманої сполуки досягла 99,9%. Автори підсумували, що використання низькосортного гліцерину для виробництва біологічних сполук має промислове значення. Це може підтримати постійний розвиток галузі біодизельного палива, знизивши вартість очищення гліцерину в подальшому.

Murakami зі співавторами також описали метод синтезу молочної кислоти на відходах виробництва біодизелю [49]. Так, за концентрації гліцерину 30 г/л у середовищі культивування *Enterococcus faecalis* QU 11 рівень синтезу L-лактату становив 44,9 г/л.

Можливість використання гліцерину як субстрату для біосинтезу молочної кислоти також описано у статті [50]. Так, було сконструйовано генно-інженерний штам *Escherichia coli* LA02, за вирощування даного штаму у середовищі з гліцерином (40 г/л) відбувався синтез D-лактату у кількості 32 г/л. Дослідники зазначили, що оптична чистота продукту була близько 99,9%.

Vodnar зі співавторами у статті [51] висвітлили результати дослідження синтезу L(+)-лактату у середовищі з технічним гліцерином та соком люцерни. Так, при концентрації обох речовин 75 та 25 г/л відповідно у середовищі культивування *R. oryzae* NRRL 395 зафіксували найвищу концентрацію молочної кислоти – 48 г/л.

Інші дослідники встановили метод отримання молочної кислоти у середовищі з капустяним відваром і гліцерином [52]. Так, при культивуванні *R. microsporus* LTH23 з 17 г на 1 л капустяного відвару відбувався синтез молочної кислоти у кількості 4,03 г/л, при цьому оптимальне значення рН становило 6,5, а оптимальна кількість сечовини в середовищі була 3,75 г/л.

Побічні продукти інших галузей промисловості як субстрати для біосинтезу молочної кислоти

У Китаї бавовняна промисловість є досить розвиненою, відповідно насіння бавовни, яке залишається після переробки, вважається сільськогосподарськими відходами. Однак, насіння бавовни характеризується досить високим вмістом

білків, амінокислот та вітамінів. Таким чином, бавовняне насіння є дешевою сировиною для виробництва різноманітних речовин. Так, автори роботи [53] визначили можливість використання бавовняного насіння та борошна для виробництва молочної кислоти штамом *Bacillus* sp. P38. Було встановлено, що за присутності у середовищі культивування штаму P38 40 г/л бавовняного насіння та 72 г/л глюкози концентрація молочної кислоти становила 70 г/л. Оптична чистота отриманого лактату становила 100%.

Застосування фанерної стружки як субстрату для промислового синтезу лактату описали Yuan зі співавторами [54]. Визначено, що 92 г/л L(+)-молочної кислоти вдалось отримати при вмісті 35% (об'ємна частка) фанерної стружки у середовищі культивування *E. faecalis* SI. Дослідники підкреслили, що особливістю даного дослідження є проведення культивування штаму SI за оптимальної температури 42 °C, а оптична чистота синтезованої молочної кислоти була більше 99%.

Отже, узагальнюючи відомості про перспективи культивування молочної кислоти у середовищах з нетрадиційними субстратами, можна підсумувати, що використання таких субстратів як відходи харчової, біопаливної, деревообробної та інших видів промисловості не поступається за ефективністю традиційним джерелам вуглецю, що у більшій мірі являють собою вуглеводи. Показано, що рівень синтезу молочної кислоти був приблизно аналогічний показникам синтезу за вирощування продуцентів лактату у цукровмісному середовищі – 4,03-207 г/л. Окрім цього, відмітимо, що хоча спосіб використання промислових відходів для культивування різноманітних корисних для людства речовин є недостатньо вивченим, однак він є досить перспективним, оскільки з кожним роком такий підхід набуває все більшої популярності через його значні переваги, серед яких і підвищення екологічності виробництв внаслідок одночасної утилізації різноманітних відходів, що супроводжується синтезом інших речовин.

Зважаючи на це, можна також відмітити, що такий підхід окрім екологічності забезпечує і відповідне підвищення економічності виробництва внаслідок скорочень витрат на певні ресурси.

Загальну інформацію про використання нетрадиційних субстратів для виробництва молочної кислоти наведено у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

Біосинтез молочної кислоти при вирощуванні продуцентів у середовищі з нетрадиційними субстратами

Продуцент	Субстрат	Концентрація субстрату, г/л	Концентрація молочної кислоти, г/л	Оптична чистота лактату, %	Література
<i>Sporolactobacillus</i> sp. CASD	Арахісовий шрот	40	207	99,3	[32]
<i>Lactobacillus casei</i> G-02	Борошно топінамбура	200	141,5	*Н.в.	[33]
<i>Lactococcus lactis</i> IO-1	Гідролізат цукрової тростини (ксилоза)	30	10,85	Н.в.	[34]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> sub. <i>torquens</i> ATCC 25600	Суха біомаси мікроводоростей <i>Hydrodictyon reticulatum</i> ,	80	36,6	95,8-99,6	[35]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ATCC 25600	Висушена маса куркуми	140	97,13	Н.в.	[36]
<i>Lactobacillus paracasei</i> LA104			91,61		
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826	Целюлоза листової сировини	5-15% (об'ємна частка)	55,2-84,6	99,2	[37]
<i>Weissella</i> sp. S26	Крохмаль	50	24,2	99,5	[38]
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> YBS1-5	Гідролізат кукурудзяних качанів	100-150 (у перерахунок на редукуючі цукри)	107,2	99,2	[39]
	Бавовняне борошно	3,7	120		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> B103	Молочна сироватка (лактоза)	60	143,7	77	[40]
<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 4797	Казеїновий сироватковий пермеат (лактоза)	35	24,3	98	[41]
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Гідрол	100	96,1	97,5	[42]
	Гідролізат соєвих залишків	150			
	Солодовий гідролізат	20			
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826 ldhL1	Кукурудзяна солома (ксилоза)	40	27,3	99,5	[43]
<i>Rhizopus oryzae</i> F-1030	Вівсяні висівки	Вміст редукуючих речовин 27,93 г	4,63 г	Н.в.	[44]
<i>Rhizopus oryzae</i> F-1030	Гідролізат клітковини	Загальний вміст	7,87	Н.в.	[3]

		редуючих речовин 55±5 г/л			
<i>Lactobacillus paracasei</i> A-22	Патока цукрових буряків	5-25 %, об'ємна частка	169,9	99	[45]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SR8 LDH	Кавова макуха	10	11,2	Н.в.	[46]
<i>Bacillus coagulans</i> H-1	Очеретяна патока	149	168,3	Н.в.	[47]
<i>Escherichia coli</i> BLac-2106	Технічний гліцерин	121	105	99,9	[48]
<i>Enterococcus faecalis</i> QU 11	Технічний гліцерин	30	44,9	Н.в.	[49]
<i>Escherichia coli</i> LA02	Гліцерин	40	32	99,9	[50]
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	Технічний гліцерин	75	48	Н.в.	[51]
<i>Rhizopus microsporus</i> LTH23	Гліцерин	17	4,03	Н.в.	[52]
<i>Bacillus</i> sp. P38	Бавовняне насіння	40	70	100	[53]
<i>Enterococcus faecalis</i> SI	Фанерна стружка	35%, об'ємна частка	92	99	[54]

Примітка*Н.в. – не визначали оптичну чистоту молочної кислоти у даній роботі.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

2.1. Потреба у цільовому продукті

У даній кваліфікаційній роботі пропонується застосування молочної кислоти, синтезованої штамом *Escherichia coli* ВLас-2106, з метою лікування захворювань шлунково-кишкового тракту у кролів.

Обґрунтування необхідності застосування молочної кислоти для боротьби з хворобами сільськогосподарських тварин

Хвороби системи травлення дуже поширені і становлять від 40 до 60% незаразної патології у тварин. Деякі захворювання (гостра тимпанія рубця, гіпотонія й атонія передшлунків, гострі розлади травлення у новонароджених та ін.) в окремі періоди року набувають масового характеру і завдають великих економічних збитків, які складаються зі зниження продуктивності, вимушеного забою чи загибелі тварин та витрат на лікування [55].

Всі хвороби органів травлення об'єднані в наступні 4 групи:

- 1) хвороби ротової порожнини, глотки і стравоходу;
- 2) хвороби передшлунків і сичуга жуйних;
- 3) хвороби шлунка і кишечника;
- 4) хвороби шлунка і кишок, які перебігають із синдромом колік.

До першої групи відносять порушення умов годівлі та напування тварин: неповноцінні раціони за поживними і біологічно активними речовинами; раптовий перехід від одного типу годівлі на інший, що найчастіше буває при переведенні з пасовищного на стійлове утримання і навпаки; порушення технології заготівлі, збереження і підготовки кормів до згодовування; порушення співвідношення поживних і біологічно активних речовин (протеїну і цукру, кальцію і фосфору та ін.) і окремих кормів (грубих, соковитих і концентрованих) в раціонах; нерегулярна годівля та напування тварин; згодовування зіпсованих і

НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Іщенко Ю.Б.			Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів	
Перевір.		Карлаш Ю.В.					30	7	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

недоброякісних кормів (гнилих, мерзлих, засмічених землею та сторонніми тілами); напування недоброякісною водою.

До другої групи причин відносять порушення умов утримання та експлуатації тварин: відсутність або обмеження моціону й інсоляції тварин у стійловий період їх утримання; порушення параметрів мікроклімату у приміщеннях (зниження та підвищення температури повітря, наявність протягів, підвищена вологість і вміст шкідливих газів); переохолодження (при напуванні холодною водою, довготривале перебування тварин на холоді, під дощем чи снігом) та перегрівання (при важкій роботі в жаркий період); до цієї групи причин належить і зміна атмосферного тиску.

До третьої групи причин відносять мікотоксикози, інфекційні, інвазійні та хвороби серцево-судинної, дихальної, сечової, нервової та інших систем, при яких хвороби системи травлення виникають як ускладнення.

Загальними симптомами хвороб органів травлення є зниження або втрата апетиту, втрата маси тіла (схуднення), зміни перистальтики, коліки, розлад дефекації [56].

В останні роки в нашій країні кролі стали об'єктом пильної уваги кролівників, які розводять їх з метою отримання м'яса та інших продуктів. Кролі є ссавцями з родини зайців, загону гризунів. Однією з найбільш характерних особливостей кролів є їхня висока плодючість. При кожному окролі самка народжує 6–15, а іноді й більше кроленят. Наразі у світі нараховують понад 70 порід кролів, в Україні розводять близько двадцяти [56].

Однак кріль, як і будь-яка свійська тварина, потребує до себе належної уваги, знань правил утримання, відтворення, годівлі і профілактики інфекційних та інвазійних хвороб. Саме заразні (інфекційні та інвазійні) хвороби кролів завдають найбільших збитків кролівництву.

Список інфекційних захворювань кролів досить значний. Серед кролів поширені вірусні хвороби (геморагічна хвороба кролів (ВГХК), рота- і коронавірусні ентерити, інфекційний стоматит, хвороба Ауескі, міксоматоз, віспа, папіломатоз, фіброматоз, ящур), бактеріальні (хвороба Тіззера, бруцельоз,

диплококоз, дифтероїдний ентерит, антропонозна чума, інфекційний риніт, колібактеріоз, лістеріоз, меліюдоз, некробактеріоз, пастерельоз, псевдотуберкульоз, сальмонельоз, стафілококоз, стрептококоз, туберкульоз, туляремія, ентеротоксемія, хламідіоз, гемабартенельоз), грибкові (актиномікоз, аспергільоз, бластомікоз, криптококоз, трихофітія, мікроспорія, фавус) та гельмінтозні [56].

Кролі відзначаються недостатньою опірністю організму проти різних хвороботворних факторів. Однак захворювання виникають тільки тоді, коли порушуються елементарні правила профілактики розведення, утримання та годівлі тварин. Згодовування неякісних кормів, різка зміна раціону зумовлюють масові ураження шлунково-кишкового тракту кролів, та призводять до їх загибелі. Ветеринарні фахівці інформують про основні захворювання кролів та заходи боротьби з ними [57].

В якості однієї з найбільш універсальних речовин в кролівництві часто використовується молочна кислота, що характеризується доступністю і володіє широким спектром дії. Залежно від способу застосування молочна кислота проявляє різні властивості. При пероральному використанні характеризується:

- антисептичним і протибродильним ефектом. Виявляє бактеріостатичні та антибактеріальні властивості. Перешкоджаючи розмноженню патогенної мікрофлори, знижує інтоксикацію організму. Допомагає розслабити травні сфінктери;
- подразливо діє на слизові шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Прискорює обмінні процеси.

У ветеринарії, зокрема в кролівництві, молочну кислоту рекомендується застосовувати при:

- ентеритах;
- гастриті;
- тимпанії;
- метеоризмі;

- станах гострого розширення шлунка [58].

2.2. Розрахунок потужності виробництва

Відомо, що у Черкаській області розташовується кроляча ферма, на ній наразі утримується 80 000 кролів [59].

Згідно даних щодо застосування молочної кислоти для лікування захворювань ШКТ у кролів [60], у ветеринарії використовують 3%-й розчин молочної кислоти (що відповідає 30 г на 1 л) у кількості 5 мл на одну особину, тривалість лікування складає 5 днів. Зважаючи на це, для забезпечення лікування 80 000 кролів необхідно

$$30 \text{ мг/мл} \times 5 \text{ мл} \times 5 \text{ днів} \times 80\,000 = 60 \times 10^6 \text{ мг або } 60 \text{ кг}$$

Як було зазначено вище, кролі володіють недостатньою опірністю організму проти інфекційних захворювань, тобто спалахи хвороб ШКТ можуть бути неодноразово, тому слід збільшити потребу у 4 рази – отримаємо

$$G_{\text{гп}} = 60 \times 4 = 240 \text{ кг.}$$

Таким чином, для забезпечення лікування захворювань ШКТ у 80 000 кролів, що знаходяться на фермі, на рік необхідно 240 кг молочної кислоти.

2.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Зі статті [48] відомо, що при культивуванні у середовищі з технічним гліцерином штам *E. coli* BLас-2106 синтезує $P_{\text{кр}} = 105$ г/л молочної кислоти. Для лікування необхідно використовувати 3%-й розчин, що відповідає 30 г молочної кислоти на 1 л води, зважаючи на це, розрахуємо необхідну кількість молочної кислоти:

$$8\,000 \text{ л} \times 30 \text{ г/л} = 240\,000 \text{ г} = 240 \text{ кг}$$

Для виробництва даної кількості молочної кислоти приймемо наступні вихідні дані:

- кількість робочих трудоднів $T_{\text{рд}} = 48$; інші 282 дні виробництво буде працювати для біосинтезу молочної кислоти з метою подальшого її використання у харчовій промисловості (переробка молока, консервування овочів) та сільському господарстві (виготовлення силосу);

- $T_{цф} = 46$ год, цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 40 год).

- втрати молочної кислоти при виділенні $E_{св} = 20\%$ (0,2)

- коефіцієнт запасу при нестерильних операціях (1,1-1,5) $K_1 = 1,1$

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N = 24 \cdot T_{рд} / T_{цф} = 24 \cdot 48 / 46 = 25 \text{ циклів}$$

Визначаємо кількість готового продукту (молочної кислоти) за цикл

$$G_{цк} = G_{гп} / N_{ц} = 240 / 25 = 10 \text{ кг/цикл}$$

Визначаємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 10 кг молочної кислоти за цикл:

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{Р_{мк}} / P_{мк} (1 - E_{вт}) = 1,1 \cdot 10 \cdot 0,95 / 105 (1 - 0,2) = 0,1245 \text{ м}^3 \text{ або } 125 \text{ л/цикл}$$

2.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 125$ л культуральної рідини.

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

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{ф}} = \frac{125}{1 - 0,1} \approx 138 \text{ л}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 138$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зан} = 0,55$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1} = 138 / 0,55 = 250$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 250$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зан.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{138}{250} = 0,55$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\text{ф}}} = \frac{138}{1 + 0,1} = 125 \text{ л}$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 138 - 125 = 13 \text{ л}$$

2.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 30 л

Для одержання 13 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{13}{1 - 0,1} = 14,4 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 14,4 / 0,55 = 26 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 30 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{14,4}{30} = 0,5$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{14,4}{1 + 0,1} = 13 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 14,4 - 13 = 1,4 \text{ л}$$

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

Для одержання 1,4 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,15$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{1400}{750 \times 0,15} = 12 \text{ шт}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 12 качалочних колб.

Узагальнюючи вищеописане, можна зазначити, що процес отримання інокуляту для забезпечення виробничого біосинтезу молочної кислоти у ферментері об'ємом 250 л з коефіцієнтом заповнення 0,55 буде проходити у два етапи.

Таблиця 2.1.

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	2	3	4	5	6
1.	0,75л × 12	0,2	1,4	1,27	0,13
2.	30	0,55	14,4	13	1,4
3.	250	0,55	138	125	13

РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування та перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Незважаючи на переваги мікробного синтезу молочної кислоти, суттєвою проблемою залишається висока вартість традиційних цукровмісних субстратів для культивування продуцентів. Тому для отримання молочної кислоти мікробним синтезом у промислових умовах доцільним буде здійснити пошук штамів-продуцентів, які здатні до високого рівня синтезу лактату при рості на дешевих субстратах.

Для порівняння було обрано 3 продуценти – *Lactobacillus casei* G-02, *Weissella* sp. S26, *Escherichia coli* BLac-2106 [33, 38, 48].

Для обґрунтування вибору біологічного агента було вибрано саме дані штами, оскільки вони здатні до синтезу молочної кислоти на нетрадиційних субстратах, які характеризуються відносно невисокою вартістю. Порівняння продуцентів здійснювали за тривалістю утворення молочної кислоти, її концентрацією та брали до уваги особливості проведення кожного процесу біосинтезу.

Дані, наведені у табл. 3.1, засвідчують, що найбільша концентрація лактату 141,5 г/л спостерігалась за вирощування штаму *L. casei* G-02 протягом 36 год у середовищі з борошном топінамбура, а найменшу кількість молочної кислоти отримали при культивуванні *Weissella* sp. S26 – 24,2 г/л. Таким чином, на основі лише табл. 3.1 ми не можемо обрати найкращого біологічного агента. Так як склад поживних середовищ і субстратів, які вони містять, різний, тому на наступному етапі розраховували їхню вартість (табл. 3.2).

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іщенко Ю.Б.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					37	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 3.1

Поживні середовища для культивування *Lactobacillus casei* G-02, *Weissella* sp. S26 та *Escherichia coli* BLac-2106 для синтезу молочної кислоти

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація молочної кислоти, г/л	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>Lactobacillus casei</i> G-02	Борошно топінамбура – 200 Глюкоза – 30 Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 10 (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 2 MnSO ₄ ·H ₂ O – 0,2 CaCO ₃ – 20	141,5	36	pH 6,5, t=40 °C	Xiang-Yang G., Qian H., Wei-Guo Z. Enhancement of L-Lactic Acid Production in <i>Lactobacillus casei</i> from Jerusalem Artichoke Tubers by Kinetic Optimization and Citrate Metabolism. <i>Journal of Microbiology and Biotechnology</i> . 2010, 20(1):101-9 [33].
<i>Weissella</i> sp. S26	Крохмаль – 50 Пептон – 10 М'ясний екстракт – 8 Дріжджовий екстракт – 4 Твін 80 – 1 K ₂ HPO ₄ – 2 Триамоніум цитрат – 2 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2 MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,05 NaCl – 2,1	24,2	37	pH 6,0, t=30 °C	Li Q., Hudari M. S. B., Wu J. C. Production of Optically Pure D-Lactic Acid by the Combined use of <i>Weissella</i> sp. S26 and <i>Bacillus</i> sp. ADS3. <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> . 2015, 178(2): 285–293. doi:10.1007/s12010-015-1871-0 [38].

<i>Escherichia coli</i> BLac-2106	Технічний гліцерин – 121 KH_2PO_4 – 25,72 K_2HPO_4 – 28,71 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 26,5 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 Тіамін-HCl – 0,015 Мікроелементи : $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0954 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0135 $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0095 ZnCl_2 – 0,0237 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0134 H_3BO_4 – 0,0131	105	40	$t=37^\circ\text{C}$, витрата повітря 2 л/л, швидкість перемішування 200-500 об/хв, рН 7,0 підтримували на заданому рівні за допомогою 20% (об'ємна частка) $\text{Ca}(\text{OH})_2$	Wang Z. W., Saini M., Lin L.-J., Chiang C.-J., Chao Y.-P. Systematic Engineering of <i>Escherichia</i> <i>coli</i> for d-Lactate Production from Crude Glycerol. <i>Journal of</i> <i>Agricultural and Food</i> <i>Chemistry</i> . 2015, 63(43): 9583–9589. doi:10.1021/acs.jafc.5b0416 2 [48].
--------------------------------------	---	-----	----	---	--

Вартість поживних середовищ для культивування *Lactobacillus casei* G-02, *Weissella* sp. S26 та *Escherichia coli* BLac-2106

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело* (1,2,3,4,5)
<i>Lactobacillus casei</i> G-02	Борошно топінамбура – 200	10	2	1
	Глюкоза – 30	18	0,54	2
	Пептон – 10	750	7,5	3
	Дріжджовий екстракт – 10	1100	11	4
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 2	82	0,16	5
	MnSO ₄ ×H ₂ O – 0,2	45	0,009	6
	CaCO ₃ – 20	30	0,6	7
Вартість 1 л середовища становить – 21,8 грн				
<i>Weissella</i> sp. S26	Крохмаль – 50	23	1,15	8
	Пептон – 10	750	7,5	3
	М'ясний екстракт – 8	763,82	6,1	9
	Дріжджовий екстракт – 4	1200	4,8	4
	Твін 80 – 1	82	0,082	10
	K ₂ HPO ₄ – 2	90	0,18	11
	Триамоніум цитрат – 2	33,3	0,066	12
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,2	10	0,002	13
	MnSO ₄ ·4H ₂ O – 0,05	26,57	0,001	14
	NaCl – 2,1	4,4	0,009	15
Вартість 1 л середовища становить – 19,89 грн				
<i>Escherichia coli</i> BLac-2106	Технічний гліцерин – 121	18	2,18	16
	KH ₂ PO ₄ – 25,72	50	1,28	17
	K ₂ HPO ₄ – 28,71	90	2,58	11
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 26,5	82	2,17	5
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 1	10	0,01	13
	CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,1	190	0,019	18
	Тіамін-HCl – 0,01	1800	0,027	19
	Мікроелементи :			
	FeCl ₃ ×6H ₂ O – 0,0954	58,5	0,005	20
	CoCl ₂ ×6H ₂ O – 0,0135	1020	0,014	21
	CuCl ₂ ×2H ₂ O – 0,0095	250	0,002	22
	ZnCl ₂ – 0,0237	50	0,001	23
	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O – 0,0134	550	0,007	24
	H ₃ BO ₄ – 0,0131	23	0,0003	25
Вартість 1 л середовища становить – 8,29 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на листопад 2020 р.:

1 – <https://65116-ua.all.biz/poroshok-muka-topinambura-g8439230>

2 – <https://kiev.flagma.ua/glyukoza-dekstroza-o2394980.html>

3 – <https://www.systopt.com.ua/ru/item-pepton-fermentatyvnyi>

- 4 – <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 5 – https://systopt.all.biz/ammoniya-fosfat-g1113568#shipping_option
- 6 – https://www.covalent.com.ua/ru/shop/manganese_sulfate
- 7 – <https://prom.ua/p253511095-kaltsij-uglekislyj-kaltsiya.html>
- 8 – <https://prom.ua/p1156647682-kartofelnyj-krahmal-pervogo.html>
- 9 – <https://russian.alibaba.com/product-detail/2020-best-sells-ch>
- 10 – <https://prom.ua/p1026101016-tvin.html>
- 11 – https://russian.alibaba.com/product-detail/food-grade-powder-k2hpo4-price-dipotassium-phosphate-62021690558.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.5c5056f9MNO0nM
- 12 – <https://prom.ua/p46475717-trinatrij-tsitrat.html>
- 13 – https://novohim.com.ua/catalog/promyshlennaya-khimiya-i-syre/magnij-sernokislyj-7-vodnyj/?attribute_fasovka=5%20%D0%BA%D0%B3&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkpuLa4LtOnV-aTPSvfbdo_5pH9YQ-N09JdkFk5efjUB5BEcP6j0sfRoCkY4QAvD_BwE
- 14 – <https://prom.ua/p47505427-sulfat-margantsa-mnso4.html>
- 15 – <https://prom.ua/p20809801-sol-pischevaya.html?&primelead=MS42Ng>
- 16 – <https://prom.ua/p1300356758-glitserin-tehnicheskij.html?&primelead=Mt4wMQ>
- 17 – <https://kiev.prom.ua/ua/p1059869951-monofosfat-kaliya.html>
- 18 – <https://aquasmile.com.ua/shop/product/reaktiv-dlia-balling-metoda-kaltsii-hloristy-bezvodnyi-cacl2-500-g/>
- 19 – <https://www.systopt.com.ua/ru/item-vitamin-v1-tiamin>
- 20 – <https://novohim.prom.ua/p10887191-zhelezo-hlornoe-baraban.html>
- 21 – <https://prom.ua/p3619555-hlorid-kobalta-kobalt.html>
- 22 – <https://kiev.flagma.ua/medi-ii-hlorid-2-vodnaya-o3433689.html>
- 23 – <https://cemargl.prom.ua/p27892230-tsink-hloristyj-kitaj.html>
- 24 – <https://prom.ua/p907984864-molibdat-natriya.html>
- 25 – <https://prom.ua/p667848375-bornaya-kislota.html?&primelead=MC41>

З огляду на вищенаведені розрахунки, представлені у табл. 3.2, середовище для культивування *E. coli* ВЛас-2106 є найдешевшим – 8,29 грн, у той час як найдорожчим виявилось поживне середовище для штаму G-02 – 21,8 грн.

Далі для порівняння даних штамів розраховували умовну вартість 1 г молочної кислоти та концентрацію лактату, синтезованого за 1 год. За даними табл. 3.3, найнижчою є умовна вартість 1 г молочної кислоти при культивуванні

штаму BLас-2106 – 0,078 грн, у той час як найдорожчим виявився 1 г лактату штаму S26 – 0,82 грн. Відносно високу концентрацію лактату, синтезованого за годину, спостерігали при вирощуванні штаму G-02 – 3,93 г/л, але його використання є не вигідним через високу вартість поживного середовища.

**Умовна вартість 1 г молочної кислоти при культивуванні
Sporolactobacillus sp. CASD, *Lactobacillus casei* G-02, *Weissella* sp. S26 та
Escherichia coli BLac-2106**

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація молочної кислоти, г/л	Умовна вартість 1 г молочної кислоти, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація лактату, синтезованого за год, г/л
<i>L. casei</i> G-02	21,8	141,5	0,15	36	3,93
<i>Weissella</i> sp. S26	19,89	24,2	0,82	37	0,65
<i>E. coli</i> BLac-2106	8,29	105	0,078	40	2,6

Тому зважаючи на низьку вартість поживного середовища, досить високі показники синтезу і росту, а також наявність нетрадиційного субстрату для синтезу молочної кислоти, робимо висновок що найкращим продуцентом серед представлених є штам *E. coli* BLac-2106.

3.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Біосинтез молочної кислоти слід здійснювати у періодичному режимі, оскільки максимальний синтез лактату спостерігається у стаціонарній фазі росту, крім цього, у ході періодичного культивування субстрат буде споживатись культурою у повному обсязі, оскільки субстрат вноситься на початку культивування і споживається продуцентом протягом усього часу біосинтезу продукту [48].

Оскільки молочна кислота є екзометаболітом, тобто виділяється у культуральну рідину, необхідно обрати глибинний спосіб культивування, оскільки за такої умови синтез лактату буде відбуватись на заданому рівні, а внаслідок подальшого виділення продукту отримаємо необхідну кількість молочної кислоти.

Зважаючи на інформацію, наведену вище, штам *E. coli* BLac-2106 є строгим аеробом, витрати повітря при біосинтезі молочної кислоти повинні бути на рівні 2 об'єми/об'єм·хв, для кращого насичення поживного середовища киснем повинно бути здійснене перемішування середовища – 500 об/хв є оптимальним режимом перемішування. Зважаючи на це, процес культивування штаму BLac-2106 необхідно проводити в аеробних умовах, а ферментер має бути оснащено барботером для подачі повітря та мішалкою для перемішування поживного середовища. Враховуючи час культивування $T_k = 40$ годин, продуктивність компресора по повітрю для аерації має становити не менше

$$Q_{\text{п}} = 2 \times V_{\text{п}} \times 60 = 2 \cdot 138 \cdot 60 = 16,6 \text{ м}^3/\text{год}$$

Штам *E. coli* BLac-2106 є мезофільним та нейтрофільним мікроорганізмом, оскільки синтезу молочну кислоту за температури 37 °С, а оптимальним значенням рН для культивування лактату є рН 7,0 – це створює ризик контамінації середовища іншими мезофілами та нейтрофілами [48]. Тому доцільним буде здійснювати процес культивування у стерильних умовах – так, з метою уникнення контамінації сторонньою мікрофлорою проводять стерилізацію обладнання, комунікацій, а також поживних середовищ для біосинтезу продукту.

Таким чином, для біосинтезу молочної кислоти бактеріальним штамом *E. coli* ВLас-2106 слід використати глибинне культивування у періодичному режимі із забезпеченням аерації середовища в асептичних умовах.

Зважаючи на певні умови проведення біосинтезу конструкція та оснащення ферментеру може змінюватись, тому слід обрати оптимальне оснащення та тип ферментера, взявши до уваги параметри культивування штаму, а також його фізіолого-біохімічні особливості.

З метою забезпечення аеробних умов ферментер має бути оснащений барботером для подачі повітря, а також датчиком контролю кисню для регуляції його рівня. Для забезпечення кращої розчинності кисню та підвищення масообмінних процесів у середовищі необхідно встановити мішалку з частотою обертання 500 об/хв. Оскільки для культивування даного штаму не передбачено встановлення мішалки особливого типу, слід обрати найпростіший тип – наприклад, лопатеву, яка характеризується простотою конструкції та обслуговування. Окрім цього, необхідною мірою є встановлення у ферментері відбивних перегородок з метою запобігання утворення воронки при перемішуванні поживного середовища [61].

Для забезпечення заданого значення температури вирощування культури ферментер має бути оснащений сорочкою та термометром для контролювання значень температури. Для забезпечення заданого рівня рН під час біосинтезу молочної кислоти ферментер має бути оснащено датчиком контролю рН.

Підсумувавши вищеописане, можна зробити висновок, що для реалізації біосинтезу молочної кислоти штамом необхідно обрати ферментер, який буде оснащений барботером, датчиками контролю кисню та рН, турбінною мішалкою, сорочкою та термометром.

РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі, для біосинтезу молочної кислоти наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник Vaillant DN 110/160 PP, концентричний – 0020145585, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. ¹
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки повітря G4 (EU4). Фільтруючий матеріал – целюлоза, рекомендований кінцевий перепад тиску 250 Па, Е= 65-90 %. Виробник: «Alter Air» (Україна) ²
К-3	Компресор	1	Компресор Tesla Weld AIR 600-100, живлення 220 В ± 10%. Потужність 2,2 кВт, продуктивність 36 м3/год, тип приводу клиноремінний. Виробник «Tesla Weld» (Україна) ³
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач AIR COOLER. Об'єм повітря 200 м3/год, площа 12-15 м2, потужність: 1,5 кВт. Фірма «ТОВ АГРОСИСТЕМА ЛТД»(виробник Китай) ⁴
Р-5	Ресивер	1	Ресивер вертикальний РВ 500.11.00, об'єм 1 м3, робочий тиск до 10 атм, габарити 1,2 х 1,3 х 3,6м. Виробник «ООО "ЛЕТИСС КОМПРЕССОР УКРАИНА"» (Україна) ⁵
Т-6	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач повітря AIR-BUS BV 690 FTR, продуктивність 125 м3/годчас, матеріал – сталевий корпус з підвищеною стійкістю. Компанія: «ТД Фаворит» (Україна) ⁶
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр тонкої очистки повітря класу очистки EN 779: H10-H14, фільтроматеріал мікроскловолокно, клас фільтрації від H10 до U16, Е = 95 %. Компанія: Технофільтр Київ (Україна) ⁷
Р-8	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор UNDE Hagen об'ємом 20 л, діаметр 215 мм, глибина 600 мм, робочий тиск 300 бар, загальна висота 2,2 м, обладнаний сорочкою та перемішувачем пристроєм. Компанія: «Perry Machinery Ukraine» (Україна) ⁸

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Иценко Ю.Б.				Розділ 4. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						37	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Продовження таблиці 4.1

Д-10 Д-13	Дозатор	2	Дозатор виробництва НВП "Техноаги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1% ⁹
Р-11	Реактор-змішувач для композиції А	1	Реактор Suncombe об'ємом 200 л із нержавіючої сталі, внутрішній діаметр 700 мм, висота циліндричної частини 500 мм, зовнішня сорочка із нержавіючої сталі розрахована на повний вакуум/4,5 бар при 150 °С. Реактор обладнаний турбінною мішалкою із нержавіючої сталі. Компанія: «Perry Machinery Ukraine» (Україна) ⁸
Р-14	Реактор-змішувач для гліцерину	1	Реактор UNDE Hagen об'ємом 20 л, діаметр 215 мм, глибина 600 мм, робочий тиск 300 бар, загальна висота 2,2 м, обладнаний сорочкою та перемішуючим пристроєм. Компанія: «Perry Machinery Ukraine» (Україна) ⁸
ІН-15	Інокулятор	1	Інокулятор New Brunswick BioFlo 310 об'ємом 30 л, для вирощування інокуляту, оснащений паровою сорочкою, барботером, турбінною мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискання та автоматичним датчиком рівня піни. Швидкість перемішування до 500 об/хв. Компанія: «New Brunswick» (Німеччина) ¹⁰
Ф-9 Ф-12 Ф-16 Ф-18	Фільтри індивідуальної очистки	2	Фільтр індивідуальної очистки повітря класу очистки EN 779: Н10-Н14, фільтроматеріал мікроскловолокно, продуктивність 3000 м ³ /год, клас фільтрації від Н10 до U16, Е = 99,995 %. Компанія: «Технофільтр Київ» (Україна) ¹¹
ФР-17	Виробничий ферментер	1	Ферментер об'ємом 250 л, із сталі марки Х18Н10Т, оснащений сорочкою, турбінною мішалкою з відбійниками, трубою перетискування, діаметр 700 мм, висота 1360 мм. Виробник: завод «ЮВС» (Росія) ¹²
Н-19	Насос	1	Насос відцентровий вертикальний (БЦПН) LEO (775990), продуктивність 50 л/хв, матеріал корпусу алюмінієвий сплав, вала двигуна – сталь AISI 304. Компанія: «ToolMag» (Україна) ¹³

Примітка*: пошук і підбір обладнання здійснювали з використанням наступних електронних джерел:

- 1 – <https://kts-sev.ru/product/воздухозаборник-vaillant-dn-110-160-pp-0020145585>
- 2 – <https://shop.alterair.ua/ru/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/#scrollDescription>
- 3 – <https://teslaweld.com/kompressor-tesla-weld-air-600-100>

- 4 – <https://agrosistema-ltd.prom.ua/p1221915894-oholodzhuvach-povitrya-air.html>
- 5 – https://letiss.com.ua/aircast-remeza-resiveri/vozdushniy_vertikalniy_resiver_rv_500_1100
- 6 – <https://tdfavorit.com.ua/p294559464-promyshlennyj-nagrevatel-vozduha.html>
- 7 – <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364274/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>
- 8 – <https://perryvidex.eu/category/reactors/stainless-steel-reactor-europe-0-4-999-litres>
- 9 – <http://technowagy.com.ua/product/dozatory-mnogokomponentnye/>
- 10 – <https://www.selectscience.net/products/eppendorf-new-brunswick-bioflo-310/?prodID=195302>
- 11 – <https://tehnofilter.ub.ua/ru/goods/view/6364276/all/filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-m-hepa-hepa>
- 12 – <http://www.uvsprom.ru/apparaty-s-peremeshivayushchimi-ustroystvami-meshalki/item/763-fermenter-inokulyator>
- 13 – <https://toolmag.com.ua/p1206987366-nasos-tsentrobezhnij-vertikalnyj.html>

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та культивування).

Технологічну схему біосинтезу молочної кислоти наведено у графічній частині курсової роботи.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору атмосферного повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди та інші фактори).

Враховуючи висоту будівлі підприємства (близько 12 м), забір атмосферного повітря відбуватиметься на висоті близько 2–4 м над будівлею, тобто 15 м. Забір здійснюється повітрозбірником (ПЗ – 1).

ДР 1.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок

На цій стадії з повітря видаляється основна маса великих механічних часточок та пилу. Для цього використовують фільтри грубої очистки (Ф-2). Ступінь очищення 90 %.

ДР 1.3. Стиснення повітря

За допомогою компресора (К-3) повітря стискають до 0,35–0,5 МПа, при цьому повітря нагрівається до 120–250 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Щоб запобігти випаданню вологи в краплєвловлювачі, повітря «переохолоджують» до 25°С в теплообміннику (Т-4). Далі у ресивері (Р-5) відбувається стабілізація вологості повітря $W = 60\%$.

ДР 1.5. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря підігрівають у теплообміннику (Т-6) для забезпечення надійної

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іщенко Ю.Б.					49	8
Перевір.		Карлаш Ю.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

роботи фільтрів до температури 45-50°C. Це запобігає конденсації пари на волокнах фільтра.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі (Ф-7), як фільтрувальний матеріал використовують міроскловолокно. Ступінь очистки становить $E = 95 \%$.

ДР 1.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Кінцева стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (Ф-9, Ф-12, Ф-16, Ф-18). Як фільтрувальний матеріал використовують міроскловолокно. Ступінь очищення становить $E=99,995 \%$. Після цього стерильне аераційне повітря надходить на інші стадії виробничого процесу.

ДР 2. Приготування титрувальних розчинів.

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення композиції солей при їх стерилізації для інокулятора об'ємом 30 л та ферментера об'ємом 250 л.

У колбу об'ємом 500 мл під витяжною шафою вносять 233 мл води дистильованої і при постійному перемішуванні за допомогою циліндра додають 47 мл 37 %-го розчину HCl. Закривають колбу скляною пробкою.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 20% розчину Ca(OH)₂

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 20% розчину Ca(OH)₂ для підлучення поживного середовища в інокуляторі об'ємом 30 л та ферментері об'ємом 250 л.

При біосинтезі молочної кислоти йде самопідкислення, тому використання 6% HCl не потрібно, у даному випадку для підтримки рН використовують 20% розчин Ca(OH)₂. На технічних вагах зважують 56 г Ca(OH)₂ і вносять у колбу об'ємом 500 мл, доливають 224 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування технічного гліцерину

У реактор-змішувач Р-14 подають технічний гліцерин, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв). Технічний гліцерин подають до ТП 4.5, ТП 5.1.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів

На технічних вагах в попередньо відтарованому стакані зважують: 19 мг $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2,7 мг $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1,9 мг $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 4,7 мг ZnCl_2 , 2,7 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,6 мг H_3BO_4 . Наважки мікроелементів вносять в колбу об'ємом 500 мл та розчиняють у 200 мл питної води.

Стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С та тиску 0,15 МПа протягом 40 хв та зберігають у стерильних умовах, вносять до поживного середовища в асептичних умовах у кількості 1 мл.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація запасного розчину тіамін-НСІ

На технічних вагах зважують 1 г тіамін-НСІ та вносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води і перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують 30 хв при температурі 112 °С та тиску 0,05 МПа.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 1,4 л в колбах на качалках

На даному етапі необхідно приготувати 1,4 л поживного середовища, вміст компонентів для приготування наведений в табл 5.1.

Таблиця 5.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,4 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 1,4 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
KH_2PO_4	25,72	36	А	1
K_2HPO_4	28,71	40,2		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	26,5	37,1		
Вода, мл		886,7		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	1,4	Б	0,23

CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,1	0,14		
Вода, мл		228,5		
Технічний гліцерин	121	170		
Разом:		1,4		1,4

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують 36 г КН₂РО₄, 40,2 г К₂НРО₄ та 37,1 г (NH₄)₂НРО₄, наважки переносять в колбу об'ємом 2 л. В колбу додають 886,7 мл дистильованої води і перемішують до розчинення. Потім колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 131 °С за тиску 0,15 МПа протягом 50 хв.

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б.

Для приготування цієї композиції на технічних вагах зважують 1,4 г MgSO₄×7H₂O та 0,14 г CaCl₂ × 2H₂O і поміщають в колбу об'ємом 0,5 л. Вносять 228,5 мл дистильованої води, перемішують до розчинення солей, після чого закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С, тиску 0,15 МПа протягом 50 хв.

ДР 3.5. Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л.

На даному етапі необхідно приготувати 13 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 13 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 13 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
КН ₂ РО ₄	25,72	334	А	11,5
К ₂ НРО ₄	28,71	373		
(NH ₄) ₂ НРО ₄	26,5	344,5		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1	13		
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,1	1,3		

Вода, л		10,43		
Технічний гліцерин	121	1573		1,5
Разом		13		13

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 334 г KH_2PO_4 , 373 г K_2HPO_4 , 344,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 13 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 1,3 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, після цього наважки переносять в збірник (Р-8) об'ємом 20 л. У збірник додають 10,43 л питної води, приготований розчин підкислюють розчином HCl (від ДР 2.1.1) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури 131 °С та тиску 0,15 МПа.

ДР 3.6. Підготовка поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 250 л.

На даному етапі необхідно приготувати 125 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування наведено в *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 125 л поживного середовища

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 125 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
KH_2PO_4	25,72	3,2	А	123,5
K_2HPO_4	28,71	3,6		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	26,5	3,3		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1	0,13		
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,013		
Вода, л		113,26		
Технічний гліцерин	121	1,51		1,5
Разом		125		125

ДР 3.6.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-10) зважують 3,2 кг KH_2PO_4 , 3,6 кг K_2HPO_4 , 3,3 кг $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,13 кг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 0,013 кг $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,

після цього наважки подають в збірник (Р-11) об'ємом 200 л. У збірник додають 113,26 л питної води, приготований розчин підкислюють розчином НСІ (від ДР 2.1.2) до рН 4-4,5, після чого проводять стерилізацію протягом 1 год за температури 131 °С та тиску 0,15 МПа.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури *Escherichia coli* BLac-2106

Колекційну культуру штаму *E. coli* BLac-2106 зберігають у пробірках зі скошеним МПА при 4 °С, здійснюють пересіви кожні 3-4 місяці. При роботі з колекційною культурою забезпечуються строго асептичні умови.

ТП 4.2. Одержання *Escherichia coli* BLac-2106 на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з агаризованим м'ясо-пептонним середовищем в асептичних умовах. Вирощують при температурі 37°С упродовж 24 год.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури *Escherichia coli* BLac-2106 на агаризованому середовищі

Мікробіологічною петлею пересівають ізольовані колонії на пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром із розрахунку – одна ізольована колонія на окрему пробірку. Вирощування робочої культури здійснюють у пробірках при 37°С впродовж 24 год.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

У колбу об'ємом 2 л із 1 л розчину композиції А (від ДР 3.4.1) в асептичних умовах вносять 230 мл розчину композиції Б (від ДР 3.4.2), запасний розчин мікроелементів (від ДР 3.2) та запасний розчин тіамін-НСІ (від ДР 3.3). Розчин перемішують і розливають по 116 г в 12 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл. У кожену колбу окремо вносять по 14 мл технічного гліцерину.

У пробірки з *E. coli* BLac-2106 (від ТП 4.3) вносять по 10 мл фізіологічного розчину, суспендують та вносять у колби з поживним середовищем. Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (500 об/хв) при 37°С

упродовж 24 год. Після завершення культивування здійснюють відбір проб для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокулятор (ІН-15) об'ємом 30 л подають простерилізовану композицію А (від ДР 3.5.1), запасний розчин мікроелементів (від ДР 3.2), запасний розчин тіамін-НСІ (від ДР 3.3) та вносять 1,57 кг технічного гліцерину зі збірника гліцерину Р-14 (від ДР 3.1). Біосинтез молочної кислоти відбувається при рН 7,0, тому середовище нейтралізують за допомогою 20% розчину $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (від ДР 2.2.1). Потім подають посівний матеріал від ТП 4.4 та вмикають перемішувач (500 об/хв), аерацію (2 об/об·хв), подають пару у кожух посівного апарату. Культивування здійснюють протягом 24 год за температури 37 °С та рН 7,0. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 250 л

У ферментер (ФР-17) об'ємом 250 л подають простерилізовану композицію А (від ДР 3.6.1), запасний розчин мікроелементів (від ДР 3.2), запасний розчин тіамін-НСІ (від ДР 3.3) та вносять 15 кг технічного гліцерину зі збірника гліцерину Р-14 (від ДР 3.1). Біосинтез молочної кислоти відбувається при рН 7,0, тому середовище нейтралізують за допомогою 20% розчину $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (від ДР 2.2.1), рівень рН контролюється на рН-метрі. Далі через трубу перетискування подають посівний матеріал від ТП 4.5 та вмикають перемішувач (500 об/хв), аерацію (2 об/об·хв), подають пару у кожух ферментеру.

Культивування здійснюють впродовж 40 год за температури 37 °С, при проведенні біосинтезу кожні 4-6 годин відбирають проби культуральної рідини для контролю показників росту та синтезу, а також для мікробіологічного контролю. Культивування буде проводитися протягом наведеного вище часу (40 год) до накопичення необхідної кількості цільового продукту – молочної кислоти ($C_m = 100-105$ г/л).

ЗВ 6. Знешкодження відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 6.1. Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів з ферментерів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням газів, зниженням вологості в вологовідбійниках з подальшим нагріванням, щоб уникнути потрапляння крапельної вологи і змочування фільтрів. Під час очищення повітря, що входить в вентиляційну систему, використовують різноманітні фільтри з волокнистих матеріалів. Очищене повітря викидається через трубу розсіювання.

ЗВ 6.2. Знешкодження рідких відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують в каналізацію.

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Протягом культивування кожні 4-6 годин відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю визначення концентрації біомаси та молочної кислоти, а також джерел вуглецю (технічний гліцерин) та азоту (гідрофосфат амонію).

6.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соевим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів та грибів [62].

Escherichia coli – це короткі палички із заокругленими кінцями, поліморфні (можуть мати вигляд кокобактерій або нитки), розміром 1,1–1,5×2,0–6,0 мкм. Більшість штамів мають капсулу або мікрокапсулу, рухливі (перитрихи), але трапляються і нерухливі штами, спор не утворюють, грамнегативні.

E. coli – факультативні анаероби, невибагливі до поживних середовищ, легко ростуть на МПА і МПБ. На щільних середовищах бактерії утворюють плоскі опуклі каламутні S-колонії з рівними або трошки хвилястими краями (3–5 мм у діаметрі) або сухі плоскі R-колонії з нерівними краями. У рідких середовищах ростуть дифузно, викликаючи помутніння середовища і утворення осаду (рідше формують поверхневу плівку або пристінкове кільце). На диференційно-діагностичних середовищах (Ендо, ЕМС, Плоскірева ешерихії розщеплюють лактозу з накопиченням кислоти, внаслідок чого змінюється забарвлення індикатора, тому колонії мають яскраве забарвлення: на середовищі Ендо – колонії малинового кольору з металевим блиском і без нього; на середовищі ЕМС (Левіна) – темно-фіолетові з металевим блиском і без нього; на середовищі Плоскірева – червоні з жовтим відтінком [63].

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 6. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іщенко Ю.Б.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					57	5
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



Рис. 6.1. Культура *Escherichia coli* на щільному поживному середовищі [64]

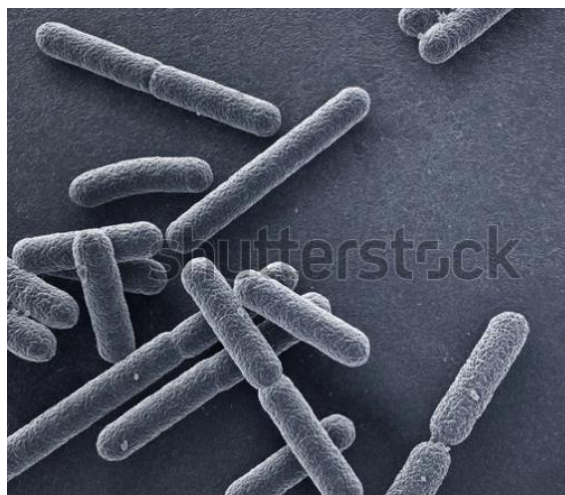


Рис. 6.2. Вигляд *Escherichia coli* під мікроскопом

Для мікроскопіювання використовують препарат «роздавлена крапля». Для приготування препаратів за методом роздавленої краплі на поверхню чистого сухого предметного скла наносять краплю води або фізіологічного розчину в разі перевірки посівного матеріалу, на наявність контамінації. Скляною паличкою або бактеріологічною петлею в краплю вносять невелику кількість досліджуваної культури і обережно розподіляють її в рідині для отримання однорідної суспензії. Якщо буде здійснюватися перевірка культуральної рідини на наявність сторонньої мікрофлори, то на поверхню чистого сухого предметного скельця буде вноситись декілька крапель культуральної рідини. Після чого приготовлену краплю

накривають покривним склом, уникаючи утворення бульбашок повітря. Якщо частина рідини виступає за краї покривного скла, надлишок середовища можна поглинути вузькою смужкою фільтрувального паперу. Готові препарати розглядають в сухих та імерсійних системах [65].

6.2. Визначення концентрації біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, потім вимірюють оптичну густина (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [66].

6.3. Визначення концентрації джерела вуглецю

Гліцерин вимірювали у супернатанті культуральної рідини після її центрифугування (5000 об, 15 хв при 4°C) за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), оснащеної детектором показника заломлення RID-10A (Shimadzu, Японія) та колоною ICsep ICE-ION-300 (Transgenomic, США). Аналіз проводили при температурі 60 ° С з рухомою фазою (0,0085 N H₂SO₄), швидкість становила 0,6 мл/хв [48].



Рис. 6.3. Рідинний хроматограф Agilent 1260 Infinity [67]

6.4. Визначення концентрації джерела азоту

Оскільки джерелом азоту у даному середовищі виступає гідрофосфат амонію, для аналізу його вмісту можна застосувати метод колориметричного визначення NH₄⁺ за допомогою зчитувача мікропланшетів (MPR). Аналізована

речовина NH_4^+ реагує зі слаболужною сумішшю гіпохлориту натрію та саліцилату натрію у присутності нітропрусиду натрію як каталізатора на 5-аміносаліцилат. Після окислення останнього, приєднуючись до іншої молекули саліцилату, утворюється похідне індофенолу синього кольору (2,2'-дикарбоксиіндофенол). Для калібрування аналізу NH_4Cl (200 мМ) спочатку розчиняли у воді, а потім додатково розбавляли визначеним середовищем (без NH_4^+). Для досягнення статистичної достовірності кожне розведення вимірювали 16 разів для 10-бальної та 3 рази для 8-точкових калібрувань.

Процедура аналізу: 60 мкл розведеного зразка (супернатант культуральної рідини після її центрифугування (5000 об, 15 хв при 4°C)) або калібрувального стандарту (0–200 мкМ NH_4Cl) додавали до 96-лункових мікропланшетів, потім 100 мкл реагенту А (саліцилат) та 80 мкл реагенту В (розчин гіпохлориту), при цьому змішування та темперування виконувались у межах MPR. Реагент А складається з 15% (мас./об.) Саліцилату натрію, 5% (мас./об.) тригідрату натрію дигідрату, 5% (мас./об.) дигідрату натрію тартрату та 0,17% (мас./об.) нітропрусиду натрію дигідрату - усі розчинені у мембранно-очищеній воді. Реагент В являє собою 6,5% (об./об.) суміш 13% (об./об.) гіпохлориту натрію та 6% (об./об.) NaOH (водні розчини). Аналізи інкубували протягом 15 хв при 37 °C в MPR, вимірювання проводили при 620 нм на фотоелектроколориметрі [68].



Рис. 6.4. Фотоелектроколориметр ApeI AP-120 [69]

6.5. Визначення концентрації цільового продукту

Вміст молочної кислоти аналізували у супернатанті культуральної рідини після її центрифугування (5000 об, 15 хв при 4°C) за допомогою ВЕРХ (AS3000, Thermo Scientific, США) за допомогою УФ-детектора при 210 нм та колони ICSeP ICE-ORH-801 (Transgenomic). Аналіз проводили при 55 °C з рухомою фазою (0,0085 N H₂SO₄), при режимі швидкості 0,3 мл/хв [48].



Рис. 6.5. Хроматограф FOCUS GC [70]

РОЗДІЛ 7. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ

7.1. Обґрунтування стадій виділення і очищення молочної кислоти для виробництва лікарського засобу

Кінцевим продуктом виробничого біосинтезу є молочна кислота, яка використовується в харчовій, текстильній, мийній та паперовій промисловості та на сьогоднішній день набула великого попиту в фармацевтичній промисловості. Зважаючи на велику кількість методів очищення молочної кислоти та враховуючи факт, що ми будемо використовувати кінцевий продукт в якості лікарського засобу для кролів, необхідно обрати найбільш економічно вигідний метод з найбільшим ступенем очищення і найменшими втратами, так як подальший процес виділення має вирішальне значення з точки зору вартості виробництва і високої чистоти продукту. Розглянемо декілька існуючих методів виділення та очищення цільового продукту.

Згідно з методом, який наводиться в статті [71], процес виділення та очищення відбувається наступним чином:

1. Початковим етапом є відділення біомаси від культуральної рідини за допомогою сепарування;
2. Після відділення біомаси відбувається очищення з використанням методу поділу фаз (до супернатанту після центрифугування вносять сульфат амонію та н-бутанол, після чого суміш перемішують протягом 2 годин при температурі 30 °С. Отриманий розчин відправляють у ємність для відстоювання, під час якого відбувається поділ на дві фази, верхню фазу збирають і подають на наступну стадію);
3. Зібраний розчин направляють на роторно-плівковий випарник, де відбувається випарювання при 50 °С;

Згідно з описаним методом, вихід продукту становить 86 %, а чистота –

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Іщенко Ю.Б.				Розділ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми отримання молочної кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						62	8
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

93 %. Оскільки кінцевий продукт використовується у фармацевтичній промисловості, бажаний ступінь чистоти повинен бути більше 95%, отже, використання даного методу є не доцільним.

В іншій статті [72] відбувається порівняння багатьох найчастіше використовуваних методів очищення та виділення молочної кислоти. У ході порівняння було визначено, що серед відомих методів немає оптимального, який би підходив у всіх випадках, але, проаналізувавши наведені дані, можна зазначити, що використання комбінованого методу з мембранної очистки (даний метод відбувається в 3 етапи, а саме: мікрофільтрація, ультрафільтрація та нанофільтрація) та адсорбції є найоптимальнішим і задовольняє наші потреби.

Отже, умовно технологію виділення та очищення можна поділити на наступні стадії:

- Відділення біомаси від культуральної рідини
- Доочищення фільтрату
- Іонообмінне очищення
- Вакуумне випарювання

7.1.1. Відділення біомаси від культуральної рідини

Зважаючи, що даний продукт є екзометаболітом, перш за все необхідно відділити культуральну рідину від біомаси. В ході виробничого біосинтезу ми отримуємо 124 л культуральної рідини зі вмістом біомаси 5,9 г/л.

Найпоширенішими способами відділення біомаси є: фільтрування, центрифугування та сепарування [73]. Переваги та недоліки даних методів наведено в таблиці 7.1:

Таблиця 7.1

Порівняльна характеристика методів відділення біомаси

Стадія	Метод	Переваги	Недоліки
Відділення біомаси	Фільтрування	можливість застосування конструкцій фільтрів з розвинутою фільтрувальною поверхнею; можливість промивання та відтискання осаду; ефективність	зменшення швидкості процесу внаслідок накопичення осаду на фільтрувальній перегородці; необхідність попередньої обробки культуральної

		процесу менше залежить від концентрації біомаси в культуральній рідині, а також в'язкості останньої [73].	рідини. [73]
	Центрифугування	висока продуктивність процесу; компактність обладнання; відсутність допоміжного обладнання; широкі можливості механізації та автоматизації процесу [73].	складність конструкції; високі вимоги до точності виготовлення вузлів; високі витрати енергії на привід; висока вартість [73].
	Сепарування	невеликі втрати активної речовини; відсутність необхідності застосування фільтрувальних добавок; можливість автоматизації; компактність обладнання; ефективне для відділення великих за розмірами клітин [73].	великі витрати енергії; не підходить для високов'язких рідин [73].

Розглянемо більш детально дані методи і визначимо, який з них є найбільш економічно вигідним. В культуральній рідині знаходиться 5,9 г/л сухої біомаси, тобто, в 124 л культуральної рідини буде 0,73 кг біомаси. Враховуючи той факт, що в культуральній рідині біомаса буде волога, приймемо, що вологість клітин становить 85%, тобто, кількість вологої біомаси в культуральній рідині становить близько 4,9 кг. Виробничий біосинтез відбувається штамом *Escherichia coli* BLac-2106, яка має діаметр паличкоподібної клітини 0,1 – 0,5 мкм з довжиною клітини 1 – 2 мкм.

Враховуючи вище наведені фактори, можна зазначити, що використання сепарування для відділення біомаси є не сильно доцільним через невелику кількість біомаси та дорогу вартість обладнання. Також одразу можна виключити метод центрифугування: через те, що молочна кислота є екзометаболітом, використання даного методу не є економічно вигідним (необхідно тільки відділити біомасу, руйнування клітин не потрібне, отже центрифуга використовуватиметься не повною мірою).

З вище перерахованих методів залишився метод фільтрування. Розглянувши низку літературних джерел [71, 72, 74], у яких відділення біомаси відбувається за допомогою фільтрування, та врахувавши морфологічні властивості продуцента, робимо висновок, що даний метод є оптимальним. У даних статтях біомасу відділяють ультрафільтрацією враховуючи, що мембрана з плином часу забиватиметься, і, відповідно, процес фільтрування відбуватиметься не повною мірою, найкращим варіантом є використання мікрофільтраційної установки з використанням мембран з різними діаметрами пор (тобто, доцільно встановити послідовність мембран з поступовим зменшенням діаметра пор у такому порядку – 1 мкм, 0,45 мкм, що сприятиме інтенсифікації процесу).

7.1.2. Доочищення фільтрату

У процесі фільтрування ми отримуємо фільтрат без біомаси, але в даній рідині все ще наявні домішки, а саме: іони солей, та високомолекулярних розчинних домішок. Для їх вилучення та інтенсифікації наступної стадії виділення молочної кислоти ми можемо використати баромембранні процеси: мікрофільтрації або ультрафільтрації [73]. Переваги та недоліки даних методів наведено в таблиці 7.2. Обидва ці процеси передбачають пропускання оброблюваної рідини через пористі напівпроникні мембрани. Відмінність полягає лише в розмірі пор мембран: 0,1-10 мкм у мікрофільтрації, 0,01-0,1 мкм в ультрафільтрації.

Таблиця 7.2

Порівняльна характеристика методів доочищення фільтрату

Стадія	Метод	Переваги	Недоліки
Доочищення фільтрату	Мікрофільтрація	вища швидкість процесу	неможливість вилучення розчинених макромолекул
	Ультрафільтрація	можна вилучити розчинені макромолекули	нижча швидкість процесу

Зважаючи, що в попередній стадії очищення ми використовували мікрофільтрацію, то для доочищення фільтрату доцільно буде використовувати ультрафільтраційну установку. Після фільтрування культуральної рідини через мікрофільтраційну установку, з урахуванням можливих втрат, ми отримуємо близько 115 л фільтрату, в якому знаходяться високомолекулярних розчинних домішок, які пройшли крізь пори мембрани.

Оскільки молекулярна маса молочної кислоти становить 90 г/моль, для очищення фільтрату за допомогою ультрафільтраційної установки можна використати мембрану з відсіканням молекулярної маси в 1кДа. За допомогою ультрафільтраційної установки ми зможемо позбутись всіх високомолекулярних домішок. В отриманому пермеаті ще будуть наявні неорганічні іони, тому для їх видалення потрібно встановити нанофільтраційну установку з використанням мембран, які відсікатимуть молекулярну масу більше ніж

1 нм (тобто, під час даного процесу крізь мембрану будуть проходити речовини з молекулярною масою менше 100 г/моль; зважаючи на масу молочної кислоти, даний метод задовольняє наші потреби).

Отже, процес доочищення фільтрату після мікрофільтраційної установки можна поділити на дві стадії: пропускання фільтрату через ультрафільтраційну установку FlowMem-025 з продуктивністю 30 л/год [75] із фільтрувальними касетами з відсіканням молекулярної маси в 1 кДа, та пропускання отриманого пермеату через нанофільтраційну установку RNF-1812 з продуктивністю 30 л/год [76] і фільтрувальними касетами з відсіканням молекулярної маси в 0,1 кДа. В результаті даних етапів ми зможемо інтенсифікувати наступну стадію очищення та зменшити навантаження на неї.

7.1.3. Іонообмінне очищення

Після доочищення фільтрату необхідно виділити з пермеату молочну кислоту, цього можна досягти за допомогою використання іонообмінної колони.

Даний процес можна проводити двома способами. Першим з них є адсорбція молочної кислоти на смолі з подальшою десорбцією за допомогою елюенту. Другий варіант полягає у використанні смоли, яка адсорбуватиме

низькомолекулярні домішки, а молочна кислота буде проходити далі. Розглянемо більш детально ці методи.

У статті [77] наводиться порівняння смол для адсорбції молочної кислоти, в якому використовували 3 типи смол, з яких найкращою є Amberlite IRA-400 (Cl⁻) – сильноосновна аніонообмінна смола, котра показує найкращі показники адсорбції молочної кислоти при значенні рН 5,0. Це означає, що очищений розчин (рН 3,0) необхідно буде попередньо підлужити, призведе до додаткових витрат на приготування та стерилізацію підлужувального розчину. В даній статті також наводяться теоретично можливі елюенти для десорбції молочної кислоти, але оскільки наукового дослідження на дану тематику не проводилось, то точно дізнатись вихід молочної кислоти неможливо. Отже, можна сказати, що використання даної методики на сьогоднішній день не є доцільним через невідомість певних факторів (після проведення досліджень з десорбційних властивостей і порівняння отриманих даних можна буде точно визначити, чи кращий даний метод в порівнянні з іншим).

Щодо другого способу, то в літературі [78] є порівняння смол, які затримують іони солей при виділенні молочної кислоти. Враховуючи, що в пермеаті є як аніони, так і катіони, перспективним варіантом буде встановлення двох типів смол. При порівнянні смол розглядали слабо-, сильноокислі і слабо- та сильноосновні смоли. Згідно з результатами досліджень, для очищення розчину від катіонів найкраще підходить сильноокисла смола SCR-BH, а для очищення від аніонів найкраще підходить слабоосновна смола AW90.

Проаналізувавши методи іонообмінного очищення молочної кислоти, можна дійти висновку, що використання комбінованого методу з пропусканням розчину через слабоосновну та сильноокислу смолу є найкращим варіантом. Отже, процес виділення буде відбуватись так: пермеат після нанофільтрації спрямовують на іонообмінну колону, заповнену сильноокислою смолою SCR-BH, після чого розчин направляють на другу іонообмінну колону зі слабоосновною смолою AW90. У результаті, в очищеному розчині залишиться тільки молочна кислота та вода [78].

7.1.4. Концентрування

Як зазначалось раніше, після іонообмінних колон розчин складатиметься тільки з молочної кислоти та води. Для видалення залишкової води необхідно здійснити процес концентрування, за допомогою випарювання або ультрафільтрації [73]. Порівняльна характеристика методів концентрування наведена в таблиці 7.3.

Таблиця 7.3

Порівняльна характеристика методів концентрування

Стадія	Метод	Переваги	Недоліки
Концентрування	Випарювання	високий ступінь випарювання; низька металоємність конструкції; високий енергетичний потенціал вторинної пари; малий час перебування вихідного продукту в апараті за вертикального компонування [73].	можлива часткова інактивація молочної кислоти внаслідок нагрівання; потреба в надійній системі підтримки вакууму; значні витрати води на конденсацію водяної пари; чималі витрати енергії [73].
	Ультрафільтрація	одночасно з концентруванням відбувається також і очищення від низькомолекулярних домішок; компактність і герметичність обладнання; відсутність термічного впливу на продукт [73].	Складність знаходження мембрани потрібного розміру; зниження швидкості процесу через явище концентраційної поляризації; необхідність періодичної заміни мембрани; висока вартість обладнання [73].

Після іонообмінних колон ми отримуємо невелику кількість розчину – приблизно 40 л. Відсутність необхідності очищення розчину від низькомолекулярних домішок нівелює одну з основних переваг ультрафільтрації перед випарюванням – додаткове очищення розчину. Варто додати, що процес

ультрафільтрування відбувається під надлишковим тиском, а це зумовлюватиме додаткові не виправдані витрати енергії. Альтернативою ультрафільтрації є випарювання. Зважаючи на властивості молочної кислоти (вона є термолабільною речовиною), серед методів випарювання доцільно розглянути лише вакуум-випарювання. На відміну від ультрафільтрації, процес випарювання потребує меншої кількості енергії і є простішим, тому використання його для концентрування розчину є найоптимальнішим методом.

Процес концентрування буде відбуватись на вакуум-випарній установці ВВУ-100 продуктивністю 10 л/год при 80 °С і до 25 % від початкового об'єму задля отримання 76 %-го розчину молочної кислоти.

7.1.5. Пакування

Заключною стадією виділення та очищення молочної кислоти є її пакування та маркування. В результаті концентрування ми отримуємо готовий 76 % розчин молочної кислоти з чистотою продукту більше 99%. Враховуючи, що при розрахунку потреби в даному засобі орієнтувались на лікування ШКТ кролів і концентрація введення молочної кислоти для лікування становить 3 %, робимо висновок, що сушіння даного продукту є недоцільним (так як даний продукт будуть використовувати в якості водного розчину, виробництво його в порошкоподібній формі призводить до створення непотрібних стадій виділення та очищення, які, у свою чергу, призводять до непотрібних економічних витрат). Зважаючи, що ми отримуємо продукт з великою концентрацією, пропонуємо пакувати його в тару об'ємом 0,1 л для зручності експлуатації даного продукту.

РОЗДІЛ 8. ПІДБІР СУЧАСНИХ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Ідентифікація молочної кислоти

Визначити присутність молочної кислоти в зразку можна за допомогою таких якісних реакцій [79]:

➤ взаємодія з *n*-гідроксидифенілом і сірчаною кислотою – молочну кислоту нагрівають із сірчаною кислотою для утворення оцтового альдегіду, який у подальшому реагуватиме з *n*-гідроксидифенілом. Результатом реакції є фіолетове забарвлення розчину. Слід зазначити, що таку саму реакцію дає піровиноградна кислота;

➤ взаємодія з розчином перманганату калію в кислому середовищі – до розчину молочної кислоти додають підкислений сірчаною кислотою розчин калію перманганату. В результаті лактат окиснюється до оцтової кислоти, що супроводжується характерним запахом. Проміжним продуктом окиснення лактату є піровиноградна кислота;

➤ взаємодія з фенолятом заліза (реакція Уфельмана) – розчин молочної кислоти реагує з розчином хлориду заліза у фенолі синього кольору. Про наявність лактату свідчитиме зміна забарвлення розчину на жовтувато-зелене, оскільки утвориться лактат заліза.

Порівнявши наявні способи ідентифікації молочної кислоти, робимо висновок, що найбільш підходящим є реакція Уфельмана, оскільки цей метод не потребує нагрівання реакційної суміші та використання сірчаної кислоти, а також є більш специфічним.

8.2. Кількісне визначення молочної кислоти

Наразі існують різноманітні способи кількісного визначення молочної кислоти [80]:

- *високоєфективна рідинна хроматографія* – цей метод є найточнішим,

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 8. Підбір сучасних методів контролю виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іщенко Ю.Б.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					70	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

але передбачає складні процедури підготовки зразків, потребує коштовного обладнання та високої кваліфікації персоналу;

- *визначення кількості ацетальдегіду, виділеного внаслідок хімічного окиснення молочної кислоти* – проводиться з використанням бісульфіту або *n*-гідроксидифенілу. В даних методах використовуються сильні окисники, такі як калію перманганат, сірчана кислота або церій (IV), робота з якими потребує особливої обережності. Крім цього, такий аналіз займає чимало часу та не є достатньо точним через невисоку специфічність;

- *визначення кількості НАДН, виділеного внаслідок ферментативного окиснення молочної кислоти* – лактат під дією лактатдегідрогенази окиснюється до пірувату. Кількість виділеного НАДН визначається спектрофотометрично. Недоліком даного способу є висока вартість реагентів, а також нестабільність НАД і НАДН;

- *спектрофотометричне визначення* – молочна кислота реагує з ферум (III) хлоридом з утворенням лактату заліза, в результаті чого розчин набуває жовтувато-зеленого забарвлення. Оптичну густину утвореного розчину визначають на спектрофотометрі проти розчину ферум (III) хлориду. Точність даного методу не поступається ВЕРХ – різниця в результатах не перевищує 3 %. При цьому, він не потребує складної підготовки зразків і дороговартісних реагентів.

Розглянувши відомі на сьогодні методи визначення кількості молочної кислоти, віддамо перевагу спектрофотометричному через його простоту, дешевизну та точність, яка є порівнюваною з ВЕРХ.

РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ ДІЛЯНКИ

Таблиця 9.1

Специфікація обладнання післяферментаційної ділянки виробництва молочної кислоти

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Р-1	Реактор-змішувач для зберігання культуральної рідини	1	Об'єм апарату – 160 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 1650 мм, діаметр – 920. [81]
Н-2	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос Calpeda CAM 60E 230/50. Продуктивність 750 л/год [82]
МФУ-3	Мікрофільтраційна установка	1	Мікрофільтраційна установка СМР-01. Продуктивність 100 л/год, робочий тиск 0,4 МПа та встановлення мікрофільтраційної касети з діаметром пор 2, 1, 0,45 мкм. [83]
УФ-4	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка FlowMem-025. Продуктивність 30 л/год, робочий тиск 0,5 МПа та встановлення ультрафільтраційної касети з діаметром пор 0,1 мкм. [75]
НФ-5	Нанофільтраційна установка	1	Нанофільтраційна установка RNF-1812. Продуктивність 30 л/год, робочий тиск 0,55 МПа та встановлення нанофільтраційної касети з відсіканням молекулярної ваги 100 г/моль. [76]
З-6	Збірник для зберігання рідини	1	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 1550 мм, діаметр – 900. [84]
Н-7 Н-9 Н-11 Н-13 Н-15	Насос відцентровий	5	Відцентровий насос DAB EUROCOM 25/30 M; Продуктивність 120 л/год [85]
ІК-8 ІК-12	Іонообмінна колона	2	Іонообмінна колона – циліндричної форми виготовлена на замовлення в «Атомэнергомаш», висота – 1500 мм, діаметр – 500 мм, висота заповнення фільтрувального шару – 700 мм, швидкість лінійного фільтрування 100 м/г. [86]

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 9. Специфікація обладнання післяферментаційної ділянки			Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іщенко Ю.Б.								
Перевір.		Карлаш Ю.В.							72	2
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

Продовження таблиці 9.1

З-10 З-14	Збірник для зберігання рідини	2	Об'єм апарату – 63 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 1300 мм, діаметр – 900. [84]
ВВУ-16	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарна установку ВВУ-100. Продуктивність випареної вологи 10 л/год, робочий об'єм 100 л, максимальна температура нагрівання 98 °С [87].
Н-17 Н-19	Насос перистальтичний	2	Перистальтичний насос МР-8. Швидкість обертання 35 об/хв, продуктивність 140 л/год [88]
З-18	Збірник для зберігання рідини	1	Об'єм апарату – 25 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 500 мм, діаметр – 900. [84]
ФПМ-20	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна машина для розливу рідин з подальшою укупоркою МФС. Продуктивність 1500 пляшок/год, об'єм пакування 100 мл, пакувальний матеріал – пет пляшки. [89]

РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виділення та очищення молочної кислоти, синтезованої бактеріями *Escherichia coli* ВLас-2106, включає в себе технологічний процес, який складається з таких стадій: відділення біомаси, доочищення фільтрату, іонообмінне очищення молочної кислоти, концентрування та пакування.

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину після виробничого біосинтезу за допомогою перистальтичного насоса подають в реактор-змішувач (Р-1) об'ємом 160 л, де відбувається зберігання за температури 20 °С до початку стадій виділення та очищення.

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1. Фільтрація

Культуральну рідину (від ТП 1.1) за допомогою відцентрового насоса (Н-2) подають до мікрофільтраційної установки (МФУ-3) зі встановленими касетами з діаметром пор 2 мкм, 1 мкм та 0,45 мкм. Процес проводять за робочого тиску 0,4 МПа. Профільтрований розчин надходить на наступну стадію виділення.

ТП 3. Доочищення фільтрату

ТП 3.1. Ультрафільтрація

Фільтрат (від ТП 2.1) подається на ультрафільтраційну установку (УФ-4). В модулі ультрафільтраційної установки відбувається поділ розчину з діаметром пор мембрани 0,1 мкм за робочого тиску 0,5 МПа. Отриманий пермеат подається на наступну стадію виділення.

ТП 3.2. Нанофільтрація

Пермеат (від ТП 3.1) подається на нанофільтраційну установку (НФ-5). В модулі нанофільтраційної установки відбувається поділ розчину з відсіканням молекулярної маси 0,1 кДа (0,001 мкм) за робочого тиску 0,55 МПа. Отриманий

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 10. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іщенко Ю.Б.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					74	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

пермеат надходить в збірник (З-6), де зберігається до використання в наступному етапі.

ТП 4. Іонообмінне очищеннямолочної кислоти

ТП 4.1. Очищення від катіонів

В іонообмінну колону (ІК-8), вносять 25 л сильнокислої смоли SCR-BH. Пермеат зі збірника (З-6)(від ТП 3.2) за допомогою відцентрового насоса (Н-7) подають на іонообмінну колону зі швидкістю 2 л розчину на 1 літр смоли за годину.Пропущений крізь смолу розчинподаєтьсяу збірник (З-11) об'ємом 63 л, де зберігається до наступного етапу.

ТП 4.2. Очищення від аніонів

В іонообмінну колону (ІК-12), вносять 25 л слабоосновної смоли AW90. Розчин з збірника (З-10) (від ТП 4.1) за допомогою відцентрового насоса (Н-11) подають до іонообмінної колони з швидкістю 2 л розчину на 1 літр смоли за годину.Пропущений крізь смолу розчин подається у збірник (З-14) об'ємом 63 л, де зберігається до наступного етапу.

ТП 5. Концентрування

ТП 5.1. Вакуум-випарювання

Розчин (від ТП 4.2)зі збірника (З-14) за допомогою відцентрового насоса (Н-15) подають на вакуум-випарну установку (ВВУ-16). Випарювання відбувається затемпературі 80 °С до 25 % від початкового об'єму та вмісту молочної кислоти 76 %. Концентрат за допомогою перистальтичного насоса(Н-19) подаєтьсяв збірник (З-18) об'ємом 25 л, де зберігається до наступного етапу.

ПМВ 6. Пакування та маркування

ПМВ 6.1. Пакування та маркування розчину молочної кислоти

Розчин молочної кислотирозливають за допомогою фасувально-пакувальної машини (ФПМ-20) у ПЕТ-пляшки об'ємом 100 мл. Концентрат (від ТП 5.1) зі збірника (З-18) за допомогою перистальтичного насоса (Н-19) подають на ФПМ, де відбувається розлив у пляшки та закупорювання. На готовий продукт наносять маркування, вказують назву товару, дату виготовлення, номер серії та термін

придатності, пляшки поміщають в картонні коробки, які складають на палети і направляють на склад.

РОЗДІЛ 11. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА МОЛОЧНОЇ КИСЛОТИ

11.1. Контроль якості готової продукції

Опис. Жовтувата сиропоподібна рідина без запаху [90].

Ідентифікація. В пробірку з 3 мл 2 %-го розчину фенолу додають 2-3 краплі 1 %-го розчину хлориду заліза (III). Утворюється темно-фіолетове забарвлення, і розчин розводять водою до зменшення інтенсивності кольору. Далі по краплях додають досліджуваний зразок розчину молочної кислоти. Проявлення лактату свідчатиме жовтувато-зелене забарвлення розчину внаслідок утворення лактату заліза [91].

pH розчину (ДФУ 2.2.3). pH досліджуваного розчину визначають потенціометрично за температури 20-25 °С. Рівень pH повинен становити не більше 2 [90].

Вміст молочної кислоти. 1 мл досліджуваного розчину вносять у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину водою до мітки з метою отримати робочий розчин молочної кислоти концентрацією не більше 10 г/л. Робочий розчин хлориду заліза (0,2 %) готують розчиненням 0,3 г ферум (III) хлориду в 100 мл води в мірній колбі місткістю 100 мл. У пробірку вносять 2 мл робочого розчину хлориду заліза і 50 мкл робочого розчину молочної кислоти, струшують пробірку. Оптичну густину утвореного жовтувато-зеленого розчину вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 390 нм, беручи за розчин порівняння 2 мл 0,2 %-го розчину хлориду заліза. За калібрувальною кривою визначають концентрацію лактату у вихідному зразку. Вміст молочної кислоти повинен перебувати в межах 76–80 % [80].

Мікробіологічна чистота (ДФУ 2.6.12). 10 мл досліджуваного розчину розчиняють у 100 мл буферного розчину з натрію хлоридом і пептоном (pH 7,0). У чашки Петрі діаметром 9 см вносять від 15-20 мл розплавленого густого поживного середовища МПА для вирощування бактерій або середовища Сабууро

					НУХТ БТЕК 02.01.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 11. Контроль виробництва молочної кислоти	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Іценко Ю.Б.						
Перевір.		Карлаш Ю.В.					77	3
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

для вирощування грибів із температурою близько 45°C і дають середовищу застигнути. Підсушують чашки в ламінарному струмені стерильного повітря або у термостаті. 0,1 мл зразка розподіляють по поверхні живильного середовища шпателем Дригальського. Для кожного розведення використовують не менше двох чашок Петрі з кожним поживним середовищем. Посіви інкубують за температури від 30-35°C (20-25°C для грибів) протягом п'яти діб, якщо вірогідні результати випробування не будуть одержані за коротший час. Відбирають чашки, відповідні одному розведенню, для якого кількість колоній на одній чашці Петрі не перевищує 300 (100 колоній для грибів). Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній і визначають число колонієутворюючих одиниць у мілілітрі. В 1 мл досліджуваного розчину допускається не більше 10^3 клітин бактерій і 10^2 клітин мікроміцетів і дріжджів.

11.2. Карта постадійного контролю

Таблиця 11.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина, температура	Термометр	Під час зберігання КР	$t = 20^{\circ}\text{C}$
Кт 2.1 Фільтрація	Культуральна рідина, тиск, продуктивність	Манометр, ротаметр	Протягом усього часу фільтрування	$P = 0,4\text{МПа}$ $Q = 100\text{ л/год}$
Кт 3.1 Ультрафільтрація	Фільтрат, тиск, продуктивність	Манометр, ротаметр	Протягом усього часу фільтрування	$P = 0,5\text{МПа}$ $Q = 30\text{ л/год}$
Кт 3.2 Нанофільтрація	Пермеат, тиск, продуктивність	Манометр, ротаметр	Протягом усього часу фільтрування	$P = 0,55\text{МПа}$ $Q = 30\text{ л/год}$
Кт 4.1 Очищення від	Пермеат, продуктивність	Ротаметр	Протягом усього часу роботи колони	$Q = 2\text{ л розчину}/(1\text{ л смоли*год})$

катіонів				
Кт 4.2 Очищення від аніонів	<i>Розчин, продуктивність</i>	Ротаметр	Протягом усього часу роботи колони	$Q = 2 \text{ л розчину}/(1 \text{ л смоли} \cdot \text{год})$
Кт 5.1 Вакуум- випарювання	<i>Очищений розчин, температура, ступінь концентрування, концентрація молочної кислоти</i>	Термометр, спектрофото- метр	Температура – протягом усього часу роботи установки, концентрація – після закінчення процесу	$t = 80^{\circ}\text{C}$ $K = 4$ w (молочної кислоти) = 76–80 %
Кт 6.1 Пакування та маркування розчину молочної кислоти	<i>Готова продукція, точність дозування, якість пакування і маркування</i>	Мірний циліндр, візуальний огляд	Після закінчення пакування серії	$V1 = 100 \text{ мл}$ відсутність механічних пошкоджень у пакуванні, належне маркування

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Singhvi M., Zendo T., Gokhale D., Sonomoto K. Greener L-lactic acid production through in situ extractive fermentation by an acid-tolerant *Lactobacillus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102(15): 6425–6435. doi:10.1007/s00253-018-9084-4.
2. Sun W., Liu J., Xu H., Li W., Zhang J. l-Lactic acid fermentation by *Enterococcus faecium*: a new isolate from bovine rumen. *Biotechnology Letters*. 2015, 37(7): 1379–1383. doi:10.1007/s10529-015-1821-5.
3. Мингазова Л.А., Крякунова Е.В., Канарский А.В. Синтез молочной кислоты грибом *Rhizopus oryzae* на питательных средах из гидролизатов клетчатки. *Вестник технологического университета*. 2017, 20 (19):134-136.
4. Senedese A. L. C., Maciel Filho R., Maciel M. R. W. L-Lactic Acid Production by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. *The Scientific World Journal*. 2015: 1–6. doi:10.1155/2015/501029.
5. Wang Y., Meng H., Cai D., Wang B., Qin P., Wang Z., Tan T. Improvement of l-lactic acid productivity from sweet sorghum juice by repeated batch fermentation coupled with membrane separation. *Bioresource Technology*. 2016, 211: 291–297. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.095.
6. Cubas-Cano E., González-Fernández C., Ballesteros M., Tomás-Pejó E. *Lactobacillus pentosus* CECT 4023 T co-utilizes glucose and xylose to produce lactic acid from wheat straw hydrolysate: anaerobiosis as a key factor. *Biotechnology Progress*. 2018. doi:10.1002/btpr.2739.
7. Zhang Y., Vadlani P. V. d-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013, 36(12): 1897–1904. doi:10.1007/s00449-013-0965-8.
8. Tashiro Y., Kaneko W., Sun Y., Shibata K., Inokuma K., Zendo T., Sonomoto K. Continuous d-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 89(6): 1741–1750. doi:10.1007/s00253-010-3011-7.

9. Moon S.-K., Wee Y.-J., Choi G.-W. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity l-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, 114(2): 155–159. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.03.016.
10. Qin H., Gong S.-S., Ge X.-Y., Zhang W.-G. The effect of temperature on l-lactic acid production and metabolite distribution of *Lactobacillus casei*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2012, 42(6): 564–573. doi:10.1080/10826068.2012.665114.
11. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Zendo T., Shibata K., Sonomoto K. Isolation and characterisation of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo l-(+)-lactic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 89(4): 1039–1049. doi:10.1007/s00253-010-2986-4.
12. Abdel-Rahman M. A., Xiao Y., Tashiro Y., Wang Y., Zendo T., Sakai K., Sonomoto K. Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015, 119(2): 153–158. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.07.007.
13. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Zendo T., Sakai K., Sonomoto K. *Enterococcus faecium* QU 50: a novel thermophilic lactic acid bacterium for high-yield l-lactic acid production from xylose. *FEMS Microbiology Letters*. 2014, 362(2): 1–7. doi:10.1093/femsle/fnu030.
14. Abdel-Rahman M. A., Hassan S. E.-D., Azab M. S., Mahin A.-A., Gaber M. A. High Improvement in Lactic Acid Productivity by New Alkaliphilic Bacterium Using Repeated Batch Fermentation Integrated with Increased Substrate Concentration. *BioMed Research International*. 2019: 1–13. doi:10.1155/2019/7212870.
15. Yokaryo H., Tokiwa Y. Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2014, 60(6): 270–275. doi:10.2323/jgam.60.270.
16. Ye L., Zhou X., Hudari M. S. B., Li Z., Wu J. C. Highly efficient production of l-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology*. 2013, 132: 38–44. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.011.

17. Ye L., Hudari M. S. B., Zhou X., Zhang D., Li Z., Wu J. C. Conversion of acid hydrolysate of oil palm empty fruit bunch to L-lactic acid by newly isolated *Bacillus coagulans* JI12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(11): 4831–4838. doi:10.1007/s00253-013-4788-y.
18. Fu Y.-Q., Yin L.-F., Zhu H.-Y., Jiang R. High-efficiency l -lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using a novel modified one-step fermentation strategy. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 410–417. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.127.
19. Guo Y., Yan Q., Jiang Z., Teng C., Wang X. Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010, 37(11): 1137–1143. doi:10.1007/s10295-010-0761-2.
20. Shahri S. Z., Vahabzadeh F., Mogharei A. Lactic acid production by loofah-immobilized *Rhizopus oryzae* through one-step fermentation process using starch substrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019. doi:10.1007/s00449-019-02231-5.
21. Wu X., Jiang S., Liu M., Pan L., Zheng Z., Luo S. Production of l-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010, 38(4): 565–571. doi:10.1007/s10295-010-0804-8.
22. Yamane T., Tanaka R. Highly accumulative production of l(+)-lactate from glucose by crystallization fermentation with immobilized *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013, 115(1): 90–95. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.08.005.
23. Lee J. J., Crook N., Sun J., Alper H. S. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by a deletion of *ssb1*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2015, 43(1): 87–96. doi:10.1007/s10295-015-1713-7.
24. Baek S.-H., Kwon E. Y., Kim Y. H., Hahn J.-S. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 100(6): 2737–2748. doi:10.1007/s00253-015-7174-0.

25. Baek S.-H., Kwon E. Y., Bae S.-J., Cho B.-R., Kim S.-Y., Hahn J.-S. Improvement of d-Lactic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae* Under Acidic Conditions by Evolutionary and Rational Metabolic Engineering. *Biotechnology Journal*. 2017, 12(10): 1700015. doi:10.1002/biot.201700015.
26. Mimitsuka T., Sawai K., Kobayashi K., Tsukada T., Takeuchi N., Yamada K., Ogino H., Yonehara T. Production of d-lactic acid in a continuous membrane integrated fermentation reactor by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*: Enhancement in d-lactic acid carbon yield. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015, 119(1): 65–71. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.06.002.
27. Turner T. L., Zhang G.-C., Oh E. J., Subramaniam V., Adiputra A., Subramaniam V., Jin, Y.-S. Lactic acid production from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 113(5): 1075–1083. doi:10.1002/bit.25875.
28. Yamada R., Wakita K., Mitsui R., Ogino H. Enhanced d-lactic acid production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* following optimization of the global metabolic pathway. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 114(9): 2075–2084. doi:10.1002/bit.26330.
29. Mitsui R., Yamada R., Matsumoto T., Yoshihara S., Tokumoto H., Ogino H. Construction of lactic acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* by using CRISPR-Cas-mediated genome evolution for efficient D-lactic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104: 9147–9158.
30. Ilmén M., Koivuranta K., Ruohonen L., Rajgarhia V., Suominen P., Penttilä M. Production of l-lactic acid by the yeast *Candida sonorensis* expressing heterologous bacterial and fungal lactate dehydrogenases. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12(1): 53. doi:10.1186/1475-2859-12-53.
31. Sreenath H.K., Moldes A.B., Koegel R.G., Straub R.J. Lactic acid production from agricultural residues. *Biotechnol. Lett.* 2001, 23: 179–184.
32. Wang L., Zhao B., Li F., Xu K., Ma C., Tao F., Xu P. Highly efficient production of d-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic

hydrolysis of peanut meal. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 89(4): 1009–1017. doi:10.1007/s00253-010-2904-9.

33. Xiang-Yang G., Qian H., Wei-Guo Z. Enhancement of L-Lactic Acid Production in *Lactobacillus casei* from Jerusalem Artichoke Tubers by Kinetic Optimization and Citrate Metabolism. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, 20(1):101-9.

34. Laopaiboon P., Thani A., Leelavatcharamas V., Laopaiboon L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology*. 2010, 101(3): 1036–1043. doi:10.1016/j.biortech.2009.08.091.

35. Nguyen C. M., Kim J.-S., Song J. K., Choi G. J., Choi Y. H., Jang K. S., Kim J.-C. d-Lactic acid production from dry biomass of *Hydrodictyon reticulatum* by simultaneous saccharification and co-fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnology Letters*. 2012, 34(12): 2235–2240. doi:10.1007/s10529-012-1023-3.

36. Nguyen C. M., Kim J.-S., Nguyen T. N., Kim S. K., Choi G. J., Choi Y. H., Kim J.-C. Production of l - and d -lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation. *Bioresource Technology*. 2013, 146: 35–43. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.035.

37. Hama S., Mizuno S., Kihara M., Tanaka T., Ogino C., Noda H., Kondo A. Production of d -lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Bioresource Technology*. 2015, 187: 167–172. doi:10.1016/j.biortech.2015.03.106.

38. Li Q., Hudari M. S. B., Wu J. C. Production of Optically Pure D-Lactic Acid by the Combined use of *Weissella* sp. S26 and *Bacillus* sp. ADS3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, 178(2): 285–293. doi:10.1007/s12010-015-1871-0.

39. Bai Z., Gao Z., Sun J., Wu B., He B. d-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue. *Bioresource Technology*. 2016, 207: 346–352. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.007.

40. Bernardo M. P., Coelho L. F., Sass D. C., Contiero J. l -(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, 47(3): 640–646. doi:10.1016/j.bjm.2015.12.001.
41. Prasad S., Srikanth K., Limaye A. M., Sivaprakasam S. Homo-fermentative production of d-lactic acid by *Lactobacillus* sp. employing casein whey permeate as a raw feed-stock. *Biotechnology Letters*. 2014, 36(6): 1303–1307. doi:10.1007/s10529-014-1482-9.
42. Reddy L. V., Kim Y.-M., Yun J.-S., Ryu H.-W., Wee Y.-J. l-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Bioresource Technology*. 2016, 209: 187–194. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.115.
43. Zhang Y., Kumar A., Hardwidge P. R., Tanaka T., Kondo A., Vadlani P. V. d-lactic acid production from renewable lignocellulosic biomass via genetically modified *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Progress*. 2016, 32(2): 271–278. doi:10.1002/btpr.2212.
44. Зимагулова Л.А., Гематдинова В.М., Канарский А.В. Синтез молочной кислоты грибов *Rhizopus Oryzae* культивированием на питательной среде из овсяных отрубей. *Вестник Казанского технологического университета*. 2016, 19 (16): 112 – 115.
45. Mladenović D., Pejin J., Kocić-Tanackov S., Djukić-Vuković A., Mojović L. Enhanced Lactic Acid Production by Adaptive Evolution of *Lactobacillus paracasei* on Agro-industrial Substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018. doi:10.1007/s12010-018-2852-x.
46. Kim J., Jang J. H., Yeo H. J., Seol J., Kim S. R., Jung Y. H. Lactic Acid Production from a Whole Slurry of Acid-Pretreated Spent Coffee Grounds by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2019. doi:10.1007/s12010-019-03000-6.

47. Xu K., Xu P. Efficient production of l-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresource Technology*. 2014, 153: 23–29. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.057.
48. Wang Z. W., Saini M., Lin L.-J., Chiang C.-J., Chao Y.-P. Systematic Engineering of *Escherichia coli* for d-Lactate Production from Crude Glycerol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63(43): 9583–9589. doi:10.1021/acs.jafc.5b04162.
49. Murakami N., Oba M., Iwamoto M., Tashiro Y., Noguchi T., Bonkohara K., Sonomoto K. l -Lactic acid production from glycerol coupled with acetic acid metabolism by *Enterococcus faecalis* without carbon loss. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121(1): 89–95. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.05.009.
50. Mazumdar S., Clomburg J. M., Gonzalez R. *Escherichia coli* Strains Engineered for Homofermentative Production of D-Lactic Acid from Glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(13): 4327–4336. doi:10.1128/aem.00664-10.
51. Vodnar D. C., Dulf F. V., Pop O. L., Socaciu C. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol. *Microbial Cell Factories*. 2013, 12(1): 92. doi:10.1186/1475-2859-12-92.
52. Yuwa-amornpitak T., Chookietwatana K. Bioconversion of waste cooking oil glycerol from cabbage extract to lactic acid by *Rhizopus microsporus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018. doi:10.1016/j.bjm.2018.06.007.
53. Peng, L., Xie, N., Guo, L., Wang, L., Yu, B., & Ma, Y. (2014). Efficient Open Fermentative Production of Polymer-Grade L-Lactate from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by Thermotolerant *Bacillus* sp. Strain P38. *PLoS ONE*, 9(9), e107143. doi:10.1371/journal.pone.0107143.
54. Yuan S.-F., Hsu T.-C., Wang C.-A., Jang M.-F., Kuo Y.-C., Alper H. S., Hwang W.-S. Production of optically pure l(+)-lactic acid from waste plywood chips using an isolated thermotolerant *Enterococcus faecalis* SI at a pilot scale. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2018. doi:10.1007/s10295-018-2078-5.

55. ХВОРОБИ СИСТЕМИ ТРАВЛЕННЯ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://hdzva.edu.ua/vht/wp-content/uploads/sites/19/2018/01/lektsiya-7-hvoroby-rotu-glotky-stravohodu-ta-peredshlunkiv.pdf> .

56. Інфекційні та інвазійні хвороби кролів / Л.Є. Корнієнко, О.Б. Домбровський, С.І. Пономар, А.А.Антіпов.– Біла Церква, 2003.– с.

57. Профілактика захворювань кролів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://cherk-consumer.gov.ua/novyny/300-profilaktyka-zakhvoriuvan-kroliv> .

58. Инструкция по применению молочной кислоты для кроликов [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://fermagid.ru/krolikovodstvo/bolezni/477-molochnaya-kislota-dlya-krolikov.html> .

59. Український фермер поділився секретами вирощування кролів за французькими технологіями [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agroreview.com/news/ukrayinskyj-fermer-podilyvsya-sekretamy-vyroshchuvannya-kroliv-za-francuzkymy-tehnolohiyamy> .

60. Молочная кислота для кроликов: инструкция по применению [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://selo-exp.com/kroliki/molochnaya-kislota-dlya-krolikov.html> .

61. Пирог Т. П., Карлаш Ю. В., Красінько В. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв // методичні рекомендації до викон. курс. проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання. – К.: НУХТ, 2015. – 92 с.

62. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

63. Модуль 3. Частина 2. Родина кишкових бактерій : метод. вказ. з дисципліни "Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою" до практичних занять для студентів-бакалаврів III–IV курсу за спеціальністю "Лабораторна діагностика" / упор. В.В. Мінухін, Н.І. Коваленко, Т.М. Замазій. – Харків : ХНМУ, 2014. – 44 с.

64. *Escherichia coli* [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://pulmonolog.com/content/escherichia-coli> .
65. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / К.: НУХТ, 2014. – С. - 45.
66. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. / Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 217 с.
67. Рідинний хроматограф Agilent 1260 Infinity [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.alsichrom.com/ua/khromatograficheskoe-oborudovanie/zhidkostnye-khromatografy/item/33-zhidkostnyj-khromatograf-agilent-1260-infinity.html> .
68. Ruppertsberg H. S., Goebel M. R., Kleinert S. I., Wünsch D., Trautwein K., Rabus R. Photometric Determination of Ammonium and Phosphate in Seawater Medium Using a Microplate Reader. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2017, 27(2): 73–80. doi:10.1159/000454814.
69. Фотоелектроколориметр цифрової Apel AP-120 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biovet.ua/ru/fotoelektrokolorimetr-tsifrovoy-apel-ap-120> .
70. Газовий хроматограф FOCUS GC [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://itsltd.kz/thermo-fisher-scientific/gazovyj-khromatograf-focus-gc.html> .
71. Kumar, S., Yadav, N. A simple downstream processing protocol for the recovery of lactic acid from the fermentation broth. *Bioresource Technology*. 2020, 318: 124260. doi:10.1016/j.biortech.2020.124260.
72. Li C., Gao M., Zhu W. Recent advances in the separation and purification of lactic acid from fermentation broth. *Process Biochemistry*. 2021, 104: 142–151. doi: 10.1016/j.procbio.2021.03.011.
73. Карлаш Ю. В., Омельчук Є. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Ю. В. Карлаш, Є. О. Омельчук. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

74. Sikder J., Chakraborty S. Purification of lactic acid from microfiltrate fermentation broth by cross-flow nanofiltration. *Biochemical Engineering Journal*. 2012, 69 – 130–137. doi:10.1016/j.bej.2012.09.003.

75. FlowMem-025 ультрафильтрационная пилотная установка с пластинчатыми мембранами [Электронный ресурс] Режим доступа: https://bts.net.ua/membrane_filter/membrane-pilot-plants/flowmem-025-ultrafiltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-plastinchastimi-membranami/

76. RNF-1812 нанофильтрационная пилотная установка с спиральными мембранами [Электронный ресурс] Режим доступа: https://bts.net.ua/membrane_filter/membrane-pilot-plants/rnf-1812-nanofiltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-sp-ralnimi-membranami/.

77. Pradhan, N., Rene, E., Lens, P. Adsorption Behaviour of Lactic Acid on Granular Activated Carbon and Anionic Resins: Thermodynamics, Isotherms and Kinetic Studies. *Energies*. 2017, 10(5):665. doi: 10.3390/en10050665.

78. Lee, H. D., Lee, M. Y. Separation and Purification of Lactic Acid from Fermentation Broth Using Membrane-Integrated Separation Processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2017, 56(29): 8301–8310. doi: 10.1021/acs.iecr.7b02011.

79. Молочная кислота [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Молочная_кислота#Химические_свойства

80. Borshchevskaya L. N., Gordeeva T. L., Kalinina A. N., Sineokii S. P. Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*. 2016, 71(8): 755–758. doi:10.1134/s1061934816080037.

81. Реакторы химические с перемешивающим устройством [Электронный ресурс] Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php

81. Электронасос Calpeda CAM 60E 230/50 Hz 70920011000 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://nasosy.vseinstrumenti.ru/promyshlennyye/calpeda/elektronasos-cam-60e-230-50-hz-70920011000/>

83. СМР-01 микрофльтрационная пилотная установка с керамическими мембранами [Электронный ресурс] Режим доступа: https://bts.net.ua/membrane_filter/membrane-pilot-plants/cmp-01-m-krof-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-keram-chnimi-membranami/

84. Збірники сталіні емальовані [Электронный ресурс] Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ua/sborniki_emal_ua.php

85. Поверхневий відцентровий насос DAB EUROCOM 25/30 М (102960000)[Электронный ресурс] Режим доступа: https://hotline.ua/dacha_sad-nasosy-vodosnabzheniya/dab-eurocom-2530-m-102960000/

86. ИОНООБМЕННЫЕ КОЛОННЫ [Электронный ресурс] Режим доступа: [http://www.sverd.ru/products-and-services/oborudovanie/oborudovanie-dlya-opresneniya-solenyix-vod,-obessolivaniya-lyubyix-vod,-vodopodgotovki-dlya-teplosetej,-kondicionirovanie-vodyi/ionoobmennyye-kolonyi-\(filtryi\).html](http://www.sverd.ru/products-and-services/oborudovanie/oborudovanie-dlya-opresneniya-solenyix-vod,-obessolivaniya-lyubyix-vod,-vodopodgotovki-dlya-teplosetej,-kondicionirovanie-vodyi/ionoobmennyye-kolonyi-(filtryi).html)

87. Вакуум-выпарная установка 100 литров ВВУ-100 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://trubtekh.ru/katalog/vakuum_vyparnaya_ustanovka_100_litrov_vvu_1001.html

88. Перистальтические насосы МР [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.kolossal.com.ua/index.php?page=production&id=17&sid=46>

89. МОНОБЛОК МФС ДЛЯ ФАСУВАННЯ В ПЛЯШКИ[Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://nhmpak.com/ua/obladnannia/za-produktsiieiu/pobutova-khimii/monoblok-mfc-dlya-fasuvannya-v-plyashki>

90. Lacticacid80 % [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.madarcorporation.co.uk/spec-sheets/raw-materials/lactic-acid-80-standard/Lactic%20Acid%20-%204357212%20all%20docs.pdf>

91. Качественная реакция на молочную кислоту (реакция Уфельмана) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://helpiks.org/2-113049.html>