

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)

(прізвище та ініціали)

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(прізвище та ініціали)

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: Одержання біомаси *Lactobacillus plantarum* для виробництва  
силосувальної закваски

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

ХОМЕНКО Іван Юрійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Рецензент

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(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 бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

**Віктор СТАБНІКОВ**

“ 01 ” листопада 20 22 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ХОМЕНКО Івана Юрійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Lactobacillus plantarum* для виробництва силосувальної закваски

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Lactobacillus plantarum*, цільовий продукт: силосувальна закваска

4.

Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Характеристика цільового продукту; Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 5. Специфікація обладнання; Розділ 6. Опис технологічної схеми; Розділ 7. Контроль виробництва; Розділ 8. Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема ділянки виробничого біосинтезу – 1 аркуш формату А1;

Апаратурна схема ділянки виробничого біосинтезу – 1 аркуш формату А1.

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.11.2022 – 07.11.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	08.11.2022 – 21.11.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	22.11.2022 – 12.12.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	13.12.2022- 21.12.2022	
5	Специфікація обладнання	22.12.2022- 28.12.2022	
6	Опис технологічної схеми	29.12.2022- 6.01.2023	
7	Контроль виробництва	7.01.2023- 12.01.2023	
8	Охорона довкілля	13.01.2023- 20.01.2023	
9	Оформлення пояснювальної записки	21.01.2023- 31.01.2023	
10	Виконання графічної частини роботи.	20.01.2023- 31.01.2023	

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
( підпис )

Іван ХОМЕНКО  
(ім'я та прізвище)

Юрій РЕЗНІЧЕНКО  
(ім'я та прізвище)

# ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ</b> .....	4
<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b> .....	7
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b> .....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	16
2.3. Таксономічний статус біологічного агента .....	17
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</b> .....	18
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	18
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	19
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	22
3.5. Біосинтез цільового продукту.....	23
3.5. 1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента...23	
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....25	
<b>РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	26
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	26
4.2. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	28
4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	32
<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> .....	36
<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b> .....	38
<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b> .....	50
<b>РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b> .....	59
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	59
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	60
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	60

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	61
8.2.3. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	61
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>63</b>

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної схеми для виробництва силосувальної закваски шляхом культивування *Lactobacillus plantarum*.

Кваліфікаційна робота складається із вступу, восьми розділів, списку використаної літератури з 41 найменування, технологічної та апаратурної схем. Загальний обсяг роботи – 66 сторінок, 9 таблиць та 6 рисунків.

У кваліфікаційній роботі представлений біологічний агент *L. plantarum* AS14 – продуцент для отримання закваски, що використовується з метою силосування кормів у тваринництві. У порівнянні з іншими шатмами *L. plantarum* AS14 дає більший вихід біомаси. Річна потреба у препараті силосувальної закваски в Україні становить 32446,1 л. Для тримання такої кількості препарату необхідний річний об'єм культуральної рідини дорівнюватиме  $V_{\text{кріч}}=6,95 \text{ м}^3$ .

В роботі схема підготовки поживного середовища запропонована за врахування його складу, а також підібрано відповідні режими стерилізації в залежності від композицій. Вирощування *L. plantarum* AS14 буде відбуватись у колбах на качалках, культивуванні в інокуляторі об'ємом 10л, а виробниче культивування у ферментері об'ємом 100 л (всі процеси проводять в асептичних умовах). Зупинка процесу культивування відбувається коли концентрація біомаси у культуральній рідині сягає 15,41 г/л.

**Ключові слова:** силосувальна закваска, *L. plantarum*, біомаса.

## ВСТУП

Важко уявити високоефективну годівлю худоби з мінімальними витратами грошових ресурсів без використання силосу. І провідне місце серед цих кормів посідає саме кукурудзяний силос, частка якого в раціонах молочної худоби сягає 45% і більше.

Якість і поживність кукурудзяного силосу є основним фактором, що визначає ефективність виробництва молока і яловичини. Для отримання високоякісного корму важливо: правильно підібрати спеціалізовані високоврожайні гібриди кукурудзи з низьким вмістом лігніну, створити необхідні агротехнічні умови їх вирощування, забезпечити дотримання технологічних вимог заготівлі, враховуючи скошування, подрібнення, ущільнення та герметизації сировини [1, 2].

Усі технологічні операції силосування повинні бути спрямовані на створення максимально сприятливих умов для розвитку молочнокислих і знищення гнильних бактерій. Тільки при правильному молочнокислому бродінні створюються умови для зменшення втрат поживних речовин, особливо білка, у процесі консервування та зберігання [3].

Використання консервантів є одним із способів покращити якість силосу. Консерванти дозволяють впливати на перебіг ферментативних процесів таким чином, щоб сприяти його кращому зберіганню, покращувати хімічний склад силосу та його поживну цінність. [4].

За характером дії консервуючі добавки, бувають двох видів: інгібітори та стимулятори ферментації. Органічні кислоти (мурашина, оцтова, пропіонова) як інгібітори ферментації, в більшій мірі відповідають особливостям обмінних процесів в організмі тварин, оскільки вони можуть виступати додатковим джерелом енергії при їх метаболізмі. Негативною

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>		
<i>Змн</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>	<b>ВСТУП</b>		
<i>Розроб.</i>	<i>Документа</i>	<i>Хомченко</i>	<i>а</i>	<i>Літ.</i>			
<i>Перевір.</i>	<i>Розніченко</i>	<i>Ю.М.</i>				<i>5</i>	<i>2</i>
<i>Корекція</i>					<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков</i>						

В.П.

стороною їх застосування є те, що вони відносно слабкі кислоти, і тому для досягнення оптимального рівня рН силосу необхідно вносити їх значну кількість. Практичне використання органічних кислот при силосуванні також обмежене через високу їх вартість та незначні обсяги виробництва [5].

Застосування стимуляторів ферментації спрямоване на збільшення інтенсивності діяльності молочнокислих мікроорганізмів. Молочнокислі бактерії зброджують рослинні цукри до молочної та в незначній кількості оцтової кислот, внаслідок чого рН силосу знижується до 4,2-4,0 і створюються несприятливі умови для розвитку шкідливих мікроорганізмів. При селекції молочнокислих мікроорганізмів для заквасок перевага надається штамам з гомоферментативним типом бродіння та найвищою енергією розмноження, високою кислотоутворювальною активністю, здатністю зброджувати значну кількість вуглеводів та спиртів [6].

**Новизною даної роботи** є розробка економічно вигідної технології одержання біомаси *Lactobacillus plantarum* AS14 для використання в складі заквашувального препарату для біоконверсії кукурудзи, яке є дешевою сировиною, і забезпечення високоякісного харчування великого рогатого скоту.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

У регіонах з тваринництвом, які мають сезонні коливання клімату, виробництво кормів також змінюється протягом року залежно від кількості опадів, температури та тривалості дня. У помірних зонах Європи це зазвичай призводить до потенційного надлишку кормів у період піку виробництва трави, особливо пізньої весни, та дефіциту кормів протягом зимових місяців. У вищих широтах вегетаційний період коротший, тому обмежується літніми місяцями, тоді як у середземноморських широтах низька кількість літніх опадів, а це значить, що без зрошення виробництво трави найбільше лише взимку та на весні [7].

У фермерів є кілька варіантів подолання сезонної нестачі кормів, включаючи використання зерна та інших покупних кормів або збереження сезонних надлишків трави чи інших кормових культур. У 1960-х роках корм переважно консервували як сіно, яке зазвичай збирали в стадія зрілого зростання, з урахуванням невизначеної погоди в тривалі проміжки часу, що проходили між зрізанням та збиранням врожаю [7].

Зберігання корму як силосу тут визначається як збір і зберігання вологої трави, цільного зерна та побічних продуктів рослинництва, таких як ферментовані матеріали. Процес збереження включає цілий ряд наукових і технологічних дисциплін: рослинництво, машинобудування, хімія та біохімія, мікробіологія та харчування тварин [8]. Виробництво силосу передбачає розуміння фізичних, хімічних та біологічних факторів, що впливають на весь процес консервації.

Силос виконує дві важливі функції в харчуванні худоби: збережене джерело засвоєваних поживних речовин у раціоні для високої продуктивності худоби для підтримання оптимальної функції рубця та зменшення ризику таких

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>			
<i>Змн</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Документа</i>		<i>а</i>	<b>Розділ 1. Характеристика цільового продукту</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Розніченко</i>					7	5
<i>Корекція</i>		<i>Ю.М.</i>				<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						
		<i>В.П.</i>						

захворювань, як ацидоз рубця та зміщена сичуга, та як додатковий корм для використання при швидкому рості пасовищ, наприклад, взимку та в періоди посухи.

**Силос** — це корм, консервований із свіжозібраних або попередньо пров'ялених зелених рослин. В основі силосування лежить, в основному, молочнокисле бродіння, яке здійснюють лактобактерії, що потрапили у силосну траншею з рослинною масою.

Трав'яний силос з використанням бактеріальних заквасок є надійним способом заготівлі високоякісних кормів. Високоякісний силос без застосування консервантів можна отримати лише з рослин, у яких вміст цукру перевищує або рівний вмісту протеїну (кукурудза, соргові, зелений овес тощо) і вологість надземної маси не вища за 70%. Кукурудзяний силос і дрібні зернові культури краще збирати раніше, але в цьому випадку може виникнути проблема стоку силосу (тобто не можна збирати культури при вологості вище 70-75%) [9].

Силос із культур, зібраних раніше, матиме нижчий рН, вищий вміст кислоти та, можливо, вищі втрати поживних речовин із силосним стоком, ніж силос із культур, зібраних пізніше, який важче різати та ущільнювати, і він менш стійкий на повітрі. Після укладання, трамбування і укриття силососховища (для видалення повітря) лактобактерії починають ферментувати цукри, перетворюючи їх на молочну кислоту. Якщо молочна кислота утворюється швидко і в достатній кількості, кислотність середовища силосованої маси швидко піднімається до рівня, достатнього для збереження поживних речовин у рослинній масі. Основною умовою заготівлі високоякісного силосу є забезпечення достатньої кількості силосних бактерій і достатньої концентрації в рослинній сировині цукрів, необхідних для розвитку бактерій. Першокласним вважають силос, якщо в ньому міститься не менше 32% сухої речовини (тобто вологість не більша 68%), 20 мг/кг каротину, рН — 4,0–4,3, частка молочної кислоти в загальній кількості кислот становить не менше 55%. Перед тим як силосна траншея може бути відкрита для

згодовування тваринам, мають завершитися процеси ферментизації силосної маси. Зазвичай процес ферментації силосу займає два-три тижні. Силосні закваски скорочують ці строки, проте, оскільки трав'яні та бобові культури, як правило, ферментуються довше за кукурудзу, силос із них не слід згодовувати, тваринам поки не пройде хоча б три тижні після укриття траншеї. Якщо почати згодовувати силос через декілька днів після закладання, це негативно відіб'ється на споживанні корму та продуктивності тварин. Процес силосування завжди супроводжується втратою поживних речовин із соком, який витік із рослин. Застосування заквасок завдяки регулюванню процесу бродіння значно зменшує відтік соку, зберігає поживні речовини та спрямовано регулює процеси бродіння в силосі. Корм має природній колір і структуру, запах свіжоспеченого хліба, тварини його добре їдять, травлення у них поліпшується. Пропіоновокислі бактерії біологічно активні за швидкістю нарощування кислотності і поліпшують співвідношення в силосі молочної, оцтової, пропіонової кислот, забезпечуючи кислотність силосу рН 4,1–4,3 [9].

Спосіб застосування:

На 20 т силосної маси використовують 1,0 л силосної закваски, яку обережно розводять у 80–100 л води і рівномірно розпилюють на силосну масу в міру завантаження силосу. Верхній шар обприскують рясніше. При закладанні сінажу кількість розведеного розчину зменшують до 30–40 л на 20 т сінажованої маси (1,5–2 л/т робочого розчину). Верхній шар також рясно поливають. Вартість бактеріальної закваски — 16 грн/л (0,8 грн — на 1 т силосованої або сінажованої маси).

Суть силосування полягає в тому, що в силосованій масі за певних умов відбувається бурхливе молочнокисле бродіння. У результаті всі легкорозчинні цукри перетворюються на молочну кислоту. При підкисленні сировини до рН 3,7–4,2 розвиток бактерій припиняється, корм консервується і може зберігатися декілька років [10].

Силос в залежності від ботанічного складу рослин поділяють на 2 види: силос з кукурудзи і силос з однорічних і багаторічних свіжоскошених і

пров'ялених рослин. На силосування рослин сильно впливає стадія їх вегетації. В різних стадіях розвитку рослин вміст сухої речовини досягає 30- 35% але із-за високого вмісту сирої клітковини силосувати їх неможна, тому що буде низька поживність корму [10].

Кукурудза найбільш поширена культура для силосування і це не дивно, адже кукурудзяний силос має високу концентрацію обмінної енергії (ОЕ) на 1 кг сухої речовини (СР) близько 11,5 МДж. Крім того, кукурудзяний крохмаль найкраще засвоюється тваринами, на відміну від крохмалю з інших культур. Він підвищує рівень глюкози в організмі і як результат збільшуються надої, а у молодняка йде приріст маси і нормалізується обмін речовин [11].

Силос повинен мати приємний фруктовий запах або запах ферментованих овочів, який не забарвлений і без ося злості. Наявність цвілі не допускається. Зелене забарвлення при силосуванні змінюється на оливкове, іноді на коричневе.

На втрати поживних речовин і якість силосу оказує вплив ступінь засміченості зеленої маси, яка залежить від погоди і способу збирання сировини.

Класи силосу із зелених рослин визначають у ті ж терміни, що й класи сіна.

Силос з зелених рослин бурого чи темно-коричневого кольору з сильним запахом меду чи свіжовипеченого хлібу, незалежно від інших показників відносять до некласного. Згодовування тваринам такого силосу допускається по заключенню ветеринарної служби [10].

Підсумовуючи все вищеописане, можна сказати, що попит і використання силосних заквасок для виробництва силосу тільки зростає. Це зумовлено певними чинниками, а саме: збільшенням сільськогосподарських угідь з жуйними тваринами; зміна клімату, що в свою чергу призводить до зменшення виробництва сіна для худоби, якого недостатньо; Перевагою силосу є також те, що це комбінований режим харчування тварин, який є збалансованим і добре впливає на загальну роботу організму. Тому, подальшу свою роботу

зосереджую на виробництві силосної закваски, як один зі способів приготування корму для жуйних тварин

За органолептичними, фізико-хімічними та біологічними показниками СЗ повинна відповідати вимогам, зазначеним в таблиці 1.1

Табл. 1.1

### Показники препаратів силосної закваски

Найменування показника	Характеристика СЗ		Метод визначення
	Сухий порошок	Рідина	
<i>Зовнішній вигляд і запах</i>	Однорідний порошок від світло – кремового до темно – кремового кольору	Рідина від світло – коричневого до коричневого кольору	По 7.2
<i>Масова доля вологи, %, не більше</i>	10,0	-	По 7.3
<i>Кислотоутворююча активність, умовні одиниці активності</i>	50-100	50-100	По 7.4
<i>Кількість життєздатних молочнокислих бактерій в 1 г препарату з монокультур, не менше</i>	1x10	1x10	По 7.5
<i>Загальна кількість молочнокислих і пропіоновокислих бактерій в 1 г комплексної закваски, не менше</i>	1x10	1x10	По 7.5
<i>- в т.ч. пропіоновокислих бактерій в 1 г, не менше</i>	1x10	1x10	
<i>Кількість сторонніх мікроорганізмів до числа молочно-кислих і пропіоновокислих бактерій, %, не більше</i>	0,2	0,2	По 7.6
<i>Ентеропатогенні типи кишкової палички в 1 г</i>	Не допускаються		По 7.7
<i>Бактерії роду сальмонели в 25 г препарату</i>	Не допускаються		По 7.8
<i>Нешкідливість в тест-дозі</i>	Не допускаються		По 7.9
Визначаються в кожній десятій партії препарату.			

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Закваска - це спеціальні, засновані на певних властивостях, селекціоновані мікроорганізми, які використовуються в процесах бродіння у виробництві харчових продуктів. Вони можуть бути в чистій культурі або в контрольованих змішаних культурах. Їх зазвичай додають до харчових продуктів у концентраціях вище одного мільйона КУО на грам, щоб покращити їхній зовнішній вигляд, смак або термін зберігання. Закваски надходять у продаж у вигляді суспензій або ліофілізованих порошків.

Силос — корм для тварин, консервованій зі свіжозібраних або попередньо висушених зелених рослин. В основі силосування лежить переважно молочнокисле бродіння, яке здійснюють лактобактерії, що потрапили в силосну траншею разом із рослинною масою. Силосування кормових трав із застосуванням бактеріальних заквасок це найбільш перспективний спосіб заготівлі високоякісного корму.

У таблиці 2.1 наведена характеристика продуцентів силосувальних заквасок.

*Lactobacillus plantarum* LP02 – даний мікроорганізм був виділений з дитячих фекалій, має невеликий час культивування, ізолюваний штам синтезує найменшу концентрацію біомаси 9,45 г/л, та росте на дешевому поживному середовищі, але починаючи з 8 години необхідне дробне внесення джерела вуглецю і азоту через що вартість середовища збільшиться [11].

*Lactobacillus plantarum* BL011 ізолюваний з сиру Серрано, синтезують більшу кількість біомаси 10,85 г/л порівнюючи з *L. plantarum* LP02, але має

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>			
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат				
Розроб.	документа	ХОМЕНКО		а	<b>Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	РЮ	ніченко					12	6
		Ю.М.				<b>Кафедра БТМ</b> 14		
Коректор								
Затверд.	Стабніков							
	В.П.							

найбільший час культивування 48 год [12], *Lactobacillus plantarum* AS14 виділений з зіпсованих овочів і фруктів, має найбільші показники концентрації біомаси 15,41 г/л, менший час культивування (24 год) порівнюючи з *L. plantarum* BL011 та *L. plantarum* LP02, на 24 і 4 год, відповідно, але росте на більш дорожчому поживному середовищі ніж *L. plantarum* BL011 та *L. plantarum* LP02 [13].

Розглянувши порівняльну характеристику продуцентів силосувальних заквасок, можна зазначити, що найкращим продуцентом є *Lactobacillus plantarum* AS14 через утворення найбільшої концентрації біомаси 15,41, але для більш точного визначення найкращого мікроорганізму розраховуємо вартість поживних середовищ (табл 2.2).

Таблиця 2.1

**Порівняльна характеристика продуцентів силосувальних заквасок**

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Умови культивування	Література
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS14	сирна сироватка – 60 глюкоза – 15 кукурудзяний екстракт – 15 дріжджовий екстракт – 8 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0.2 натрію ацетат – 5 Твін 80 – 0.2 MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O – 0.05 FeCl <sub>3</sub> – 0.05	15,41	pH = 6.2, 40 °C, 24 год	A. Manzoor, J. I. Qazi, I. u. Haq et al. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain <i>Lactobacillus plantarum</i> (AS14) by developing low cost media cultivation strategy. <i>Journal of Biological Engineering</i> . 2017, 11(1):1-10. doi: 10.1186/s13036-017-0059-2.
<i>Lactobacillus plantarum</i> BL011	глюкоза – 40 дріжджовий екстракт – 15 MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O – 0.2 MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O – 0.04	10,85	pH = 5.5, 25 °C, 48 год	C. Coghetto, C. Vasconcelos, G. Brinques, M. Ayub. <i>Lactobacillus plantarum</i> BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. <i>Braz. J. Microbiol.</i> 2016, 47(4): 941-948. doi: 10.1016/j.bjbm.2016.06.003

Закінчення таблиці 2.1

<i>Lactobacillus plantarum</i> LP02	глюкоза – 10 дріжджовий екстракт – 40 натрію глутамат – 2 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.05 $\text{FeCl}_3$ – 0.05 після 8 год культивування додавали підживлювальний розчин (500 г/л глюкози, 50 г/л дріжджового екстракту) зі швидкістю 20 мл/хв	9,45	рН = 6.25, 37 °С, 28 год	С.-F. Hwang, J. Huang, Z.-Y. Mao. Biomass production of <i>Lactobacillus plantarum</i> LP02 isolated from instant feces with potential cholesterol-lowering ability. <i>African Journal of Biotechnology</i> . 2011, 10(36): 7010–7020. doi: 10.5897/AJB11.507.
-------------------------------------	---	------	-----------------------------	---

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування *Lactobacillus plantarum* AS14, *Lactobacillus plantarum* BL011 та *Lactobacillus plantarum* LP02**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1-12)*
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS14	Сирна сироватка – 60	40	2,4	1
	Глюкоза – 15	61	0,915	2
	Кукурудзяний екстракт – 15	65	0,975	3
	Дріжджовий екстракт – 8	1100	8,8	4
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15	16	0,24	5
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ – 0.2	75	0,015	6
	Натрію ацетат – 5	93	0,465	7
	Твін 80 – 0.2	470	0,094	8
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05	83	0,00415	9
	$\text{FeCl}_3$ – 0.05	180	0,009	10
Вартість 1 л середовища – 13,92 грн				
<i>Lactobacillus plantarum</i> BL011	Глюкоза – 40	61	2,44	2
	Дріжджовий екстракт – 15	1100	16,5	4
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2	83	0,0166	9
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.04	85	0,0034	11
	Вартість 1 л середовища – 18,96 грн			

Закінчення таблиці 2.2

<i>Lactobacillus plantarum</i> LP02	Глюкоза – 10	61	0,61	2
	Дріжджовий екстракт – 40	1100	44	4
	Натрію глутамат – 2	180	0,36	12
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0.2	75	0,015	6
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O – 0.2	83	0,00285	9
	MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O – 0.05	85	0,00425	2
	FeCl <sub>3</sub> – 0.05	180	0,009	10
Вартість 1 л середовища – 45 грн				

Примітка\*: ціни вказані станом на лютий 2023 року

1. <https://prom.ua/ua/p1508127928-syvorotka-suhaya-demineralizirovannayasirovatka.html>
2. <https://prom.ua/ua/p22960204-glyukoza-dekstroza-pishevaya.html>
3. <https://prom.ua/ua/p1310282824-ekstrakt-kukuruznyj-litrov.html>
4. <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
5. <https://plants-club.ua/sulfat-amoniya-1-kh8997>
6. <https://prom.ua/ua/p1463748737-monokalijfosfat.html?&primelead=MC43>
7. <https://prom.ua/ua/p832455311-natrij-uksusnokislyj-vodnyj.html?&primelead=MC44>
8. <https://prom.ua/ua/p1036194875-tvin-polisorbat.html?&primelead=MS45NQ>
9. <https://prom.ua/ua/p1323818049-sulfat-magniya-1kg.html>
10. <https://prom.ua/ua/p1599886047-zhelezo-hlornoe.html>
11. <https://prom.ua/ua/p1521382706-sulfat-margantsa-monogidrat.html>
12. <https://prom.ua/ua/p1634629618-glutamat-natriya-e621.html>

Провівши розрахунки, можна дійти висновку що *Lactobacillus plantarum* AS14 має найнижчу вартість 1 л поживного середовища в порівнянні з *Lactobacillus plantarum* BL011 та *Lactobacillus plantarum* LP02, у яких вартість більша в 1,5 та 3,8 разів, відповідно. Через різні значення тривалісті культивування в вище наведених мікроорганізмів, необхідно для остаточного вибору найкращого біологічного агента провести розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту та визначити кількість утвореного продукту (табл 2.3)

**Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні *Lactobacillus plantarum* AS14, *Lactobacillus plantarum* BL011 та *Lactobacillus plantarum* LP02**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної СЗ за годину, г/год
<i>Lactobacillus plantarum</i> AS14	13,92	15,41	<b>0,9</b>	24	<b>0,64</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> BL011	18,96	10,85	<b>1,75</b>	48	<b>0,22</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP02	45	9,45	<b>4,8</b>	28	<b>0,34</b>

Розглянувши показники ( табл. 2.3), а саме, умовну вартості 1 г цільового продукту та кількості утвореної силосувальної закваски, можна зазначити що, *L. plantarum* LP02 має найбільшу вартість 1 г цільового продукту в порівнянні з іншими біологічними агентами, в той час як кількість утвореної СЗ нижчий ніж у *Lactobacillus plantarum* AS14. *L. plantarum* AS14 має найменшу умовну вартість 1 г цільового продукту та виробляє в порівнянні з іншими мікроорганізмами найбільшу кількість силосувальної закваски за годину.

Підсумовуючи, в якості основного продуцента СЗ, доцільно обрати *L. plantarum* AS14 через найвищі показники кількості утвореної СЗ за годину та невелику умовну вартість 1 г цільового продукту.

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

**Морфолого – культуральні ознаки.** *Lactobacillus plantarum* – широко поширений вид грампозитивних анаеробних неспороутворюючих молочнокислих бактерій.

*L. plantarum* — грампозитивна бактерія у формі бацил. Клітини являють собою прямі палички з тупими кінцями, зазвичай 0,9-1,2 мкм завширшки і 3-8 мкм завдовжки, які зустрічаються поодинці, парами або короткими

ланцюжками. *L. plantarum* має низький вміст ГК. Він здатний рости при діапазоні температур від 15 до 45 ° С. Переносить значення рН від 4 до 9. [14].

**Фізіолого – біохімічні ознаки.** По відношенню до кисню *Lactobacillus helveticus* – є толерантний аеробний та факультативний анаероб. Джерелом вуглецю, а також енергії за процесу культивування є глюкоза. Добре ростуть на поживному середовищі MRS. Неспороутворюючі. Як правило, нерухливі і можуть виживати як в аеробних, так і в анаробних середовищах. Здатні виробляти молочну кислоту як ефективний продукт метаболізму глюкози.. Хемоорганогетеротрофи, потребують збагачених середовищ для культивування. Метаболізм бродильного типу [14].

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агента.

За класифікацією бактерії роду *Lactobacillus* мають таке систематичне положення [15]:

- Домен: *Bacteria*
- Відділ: *Firmicutes*
- Клас: *Bacili*
- Порядок: *Lactobacillales*
- Родина: *Lactobacillaceae*
- Рід: *Lactobacillus*
- Вид: *plantarum*

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат			
Розроб.	документа	Хомченко		а	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Рівніченко	Ю.М.			18	18	8
Коректор					19 <b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.	Стабніков				<b>економічне обгрунтування</b>		

В.П.

### 3.1. Потреба у цільовому продукті.

Силос – це органічний спосіб збереження кормів. Суть його полягає в зброджуванні харчових цукрів бактеріями в органічні (переважно молочну) кислоти, за рахунок чого утворюється кисле середовище (рН 4,0-4,2), в якому силосована маса добре зберігається без доступу повітря. Активна кислотність маси і відсутність доступу повітря діють як консервант при силосуванні.

Силос — соковитий корм, виготовлений із свіжозрізаної або висушеної зеленої маси (вологість не нижче 60%), збереженої в анаеробних умовах шляхом мимовільного бродіння або з додаванням консервантів.

Силос належить до об'ємистих соковитих кормів. Енергетична цінність 1 кг його становить 0,18...0,30 корм. од.

Високоякісний силос позитивно впливає на процеси травлення, стимулюючи секреторну діяльність та моторику травного каналу тварин. У річному кормовому балансі господарств, які спеціалізуються на виробництві продукції скотарства та вівчарства, його частка становить 20-30%.

За хімічним складом силос подібний до зеленої маси, яка використовується на силос, але відрізняється від нього підвищеним вмістом органічних кислот (молочної, оцтової), які утворюються при зброджуванні цукрів бактеріями. Кисла реакція середовища – основний фактор, який зумовлює тривале зберігання силосованого корму за рахунок гальмування розмноження і припинення життєдіяльності гнильних і маслянокислих мікроорганізмів [16].

У кормовому конвеєрі кукурудза на силос, як і багаторічні трави, посідає провідне місце. У структурі польової кормової площі її посіви становлять 16

— 24 % (на Поліссі менше, в Лісостепу і Степу — більше). Кукурудзяний силос поряд з сіном і сінажем становить основу зимового раціону худоби.

Принциповою відмінністю вирощування кукурудзи на силос від вирощування її в зеленому конвеєрі є набагато менша густота стеблостою (55 — 60 до 100 — 120 тис. рослин на 1 га). Висівають її з міжряддями 45 — 60 — 70 см, що дає змогу мати качани. Збирають кукурудзу на силос у фазі молочно-воскової і воскової стиглості, тоді як на зелений корм — до фази молочної стиглості.

Кукурудзу на силос, як і на зелений корм і зернові культури, вирощують лише за високого фону живлення, який визначають виходячи із запланованого врожаю та з урахуванням родючості ґрунту. У міру загущення та удобрення посіву підвищується вихід зеленої маси, але водночас може зменшуватися вихід качанів — найціннішої частини силосної маси. Тому густота посівів при вирощуванні кукурудзи на силос має бути такою, щоб можна було одержувати високі врожаї качанів. Якщо вихід їх зменшується, це означає, що посіви занадто загущені [17].

Важко уявити високоефективну годівлю великої рогатої худоби із мінімальними затратами грошових ресурсів без використання силосованих кормів. І провідне місце серед цих кормів посідає саме кукурудзяний силос, частка якого в раціонах молочної худоби сягає 45% і більше [18]. Згодовування кукурудзяного силосу, заготовленого з бактеріальною закваскою, дійним коровам у складі господарського раціону забезпечує підвищення середньодобового надою на 8,16% при зниженні витрат кормів на 1 кг молока на 0,07 енергетичних кормових одиниць. При цьому вміст жиру та білка у молоці підвищився на 0,07 та 0,05 %, що забезпечило його вищу калорійність [18].

### **3.2. Розрахунок потужності виробництва.**

Станом на 2021 р. кількість поголів'я дійних корів в Україні становить 422,1 тис. голів [19]. Для розрахунку потреби приймаємо близько 50 % від кількості поголів'я дійних корів в Україні, яких необхідно забезпечити силосом, що дорівнює 211,1 тис. голів.

У зв'язку з тим, що кукурудзяний силос становить основу зимового раціону худоби, розрахунок буде здійснюватися саме для періоду з 1 грудня до 28 лютого. Також враховуємо, те що переводити корів зі стійлового утримання на пасовище, і навпаки, необхідно впродовж 6-8 днів [20]. Тобто загальний орієнтовний період для якого потрібне забезпечення корів кукурудзяним силосом буде становити 106 днів.

За даними статті [21] у раціоні дійної корови живою масою 550 кг, яка забезпечує середньодобовий надій 20-24 кг, кількість кукурудзяного силосу становить 29 кг на добу.

Для початку розрахуємо загальну кількість кукурудзяного силосу необхідного на добу для 211100 голів дійних корів:

$$211100 \cdot 29 \text{ кг} = \mathbf{6121900 \text{ кг}}$$
 кукурудзяного силосу на добу

Розраховуємо загальну кількість спожитого кукурудзяного силосу за 106 днів:

$$\mathbf{6121900 \text{ кг}} \cdot 106 \text{ днів} = \mathbf{648921400 \text{ кг}}$$
 кукурудзяного силосу

Витрата робочого розчину при розпилюванні силосувальної закваски, яка буде виготовлятися на проектованому виробництві, становить 80-100 л на 20 т силосується маси [22] (беремо максимальну кількість препарату), тоді для отримання розрахованої кількості кукурудзяного силосу необхідно:

$$20 \text{ т} - 100 \text{ л}$$

$$\mathbf{648921,4 \text{ т}} - x \text{ л}$$

$x = (\mathbf{648921,4 \text{ т}} \cdot 100) / 20 = \mathbf{3244607 \text{ л}}$  робочого розчину силосувальної закваски

Для приготування 100 л робочого розчину силосувальної закваски необхідно 1 л препарату [22], тоді для приготування розрахованої кількості робочого розчину силосувальної закваски необхідно:

$$1 \text{ л препарату} - 100 \text{ л робочого розчину}$$

$$x \text{ л препарату} - \mathbf{3244607 \text{ л}}$$
 робочого розчину

$$x = \mathbf{3244607 \text{ л}} / 100 = \mathbf{32446,1 \text{ л}}$$
 препарату.

У зв'язку з тим, що у інструкції до використання силосувальної закваски «Пробактил» [22] вказана концентрація клітин *Lactobacillus plantarum* в КУО/мл, а саме  $1,0 \cdot 10^8$  КУО/мл, необхідно для подальших розрахунків перейти до значення в г/л. Для приблизного перерахунку використаємо дані зі статті [23], де концентрація біомаси *Lactobacillus plantarum* AS14 в 15,41 г/л відповідає значенню  $5,1 \cdot 10^8$  КУО/мл. Тоді:

$$15,41 \text{ г/л} - 5,1 \cdot 10^8 \text{ КУО/мл}$$

$$x \text{ г/л} - 1,0 \cdot 10^8 \text{ КУО/мл}$$

$$x = (1,0 \cdot 10^8 \text{ КУО/мл} \cdot 15,41 \text{ г/л}) / 5,1 \cdot 10^8 \text{ КУО/мл} = \approx 3 \text{ г/л}$$

Отже, приймаємо, що на 1 л препарату припадає 3 г біомаси *Lactobacillus plantarum* AS14. Тоді для отримання розрахованої потреби в препараті необхідно:

$$1 \text{ л} - 3 \text{ г біомаси}$$

$$32446,1 \text{ л} - x \text{ г біомаси}$$

$$x = 32446,1 \cdot 3 = 97338,3 \text{ г біомаси}$$

Для отримання розрахованої кількості біомаси необхідно:

$$15,41 \text{ г}^* - 1 \text{ л}$$

$$97338,3 \text{ г біомаси} - x \text{ л}$$

$$x = 97338,3 / 15,41 = 6320 \text{ л культуральної рідини.}$$

\* - кількість біомаси, яку можна отримати на 1 л культуральної рідини за використання штаму *Lactobacillus plantarum* AS14 [23].

З урахуванням 10% втрат під час виробництва річна потужність має становити:

$$6320 + 6320 \cdot 0,1 = 6952 \text{ л або } 6,95 \text{ м}^3$$

Отже, річна потреба у препараті силосувальної закваски в Україні становить 32446,1 л. Для тримання такої кількості препарату необхідний річний об'єм культуральної рідини дорівнюватиме  $V_{\text{крріч}} = 6,95 \text{ м}^3$ .

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

1.1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 140. Ефективний фонд робочого часу  $N_{\text{еф}} = 140 \times 24 = 3360 \text{ год.}$

1.2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 24 + 10 = 34 \text{ (год), де}$$

$T_{\text{ф}}$  – період в часі виробничого біосинтезу;

$T_{\text{др}}$  – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: охолодження (1 год), перевірка на герметичність (2 год), миття та огляд (2 год), стерилізація (2 год), завантаження середовища (1,5 год), , вивантаження культуральної рідини (1 год), засів (0,5 год).

1.3. Кількість власне циклів впродовж року становитиме:

$$n_{\text{ц}} = N_{\text{еф}} / T_{\text{цф}} = 3360 / 34 = 99$$

1.4. За цикл отримується наступний об'єм культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}}^{\text{ц}} = V_{\text{кр}}^{\text{річ}} / n_{\text{ц}} = 6,95 / 99 = 0,07 \text{ м}^3$$

Вибираємо ферментер з коефіцієнтом наповнення  $K_{\text{з}} = 0,7$  об'ємом 100 л.  $V_{\text{кр.р}} = 0,07 \text{ м}^3$  - об'єм рідини культуральної, що відповідає розрахунковому, тобто правильно підібрано.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

Ферментери, що використовують для вирощування біомаси *Lactobacillus plantarum* AS14 мають загальний об'ємом 100 л. 0,7 – це значення коефіцієнта заповнення ферментера. Загалом, ферментер має наступний робочий об'єм:

$$V_{\text{роб.}} = V_{\text{заг.}} \times K_{\text{зап.}} = 100 \times 0,7 = 70 \text{ л}$$

Для приготування 70 л культуральної рідини (КР) необхідно визначити кількість стадій підготовки посівного матеріалу. 10 % від загального об'єму поживного середовища - скільки становить кількість посівного матеріалу (ПС).

1) Для отримання 70 л КР, необхідно:  $70 \times 0,1 = 7 \text{ л ПС}$ , яку можна приготувати у інокуляторі об'ємом 10 л.

2) Для отримання 7 л КР, необхідно:  $7 \times 0,1 = 0,7$  л ПС, яку можна отримати у колбах на качалках.

Отже, з двох етапів буде складатись процес підготування поживного середовища, третій етап – виробничий біосинтез.

### **3.5. Біосинтез цільового продукту.**

**3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.** У ПС з метою біосинтезу бактеріальної біомаси *Lactobacillus plantarum* AS14, як ростовий субстрат використовується глюкоза - складова середовища для культивування [23]. У відповідності до інформації, яка розміщена в системі KEGG, катаболітичні процеси з глюкозою відбуваються за так званим шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, або гліколіз [24]. Даний факт засвідчує присутність ключового ферменту *6-фосфофруктокінази 1* (КФ.2.7.1.11). Далі зображена схема катаболізму даного вуглеводу (рис. 3.1).

Шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса є найпоширенішим і добре відомим типом розпаду цукру. Він використовує глюкозу, яка перетворюється на низку проміжних речовин і, зрештою, на піруват. Він складається з двох етапів: (1) фаза поглинання енергії та (2) фаза вивільнення енергії.

Фаза поглинання енергії — це перша фаза гліколізу, під час якої енергія (тобто дві молекули АТФ) споживається, щоб глюкоза могла бути оброблена та перетворена на два 3-вуглецевих фосфати цукру: гліцеральдегід-3-фосфат (G3P) і дигідроксіацетонфосфат. G3P переходить до наступної фази, тобто фази вивільнення енергії, тоді як його ізомер, дигідроксіацетонфосфат, має бути перетворений у G3P (через ізомеразу), щоб перейти до наступної фази.

Фаза вивільнення енергії є другою фазою гліколізу, де виробляються багаті енергією молекули (АТФ і НАДН). Кожна молекула G3P дає одну молекулу NADH і чотири молекули АТФ під час цієї фази. З перетворенням дигідроксіацетонфосфату в G3P кількість продуктів і реагентів процесів, що беруть участь у цій фазі, подвоюється. Таким чином, у фазі виплати енергії можна очікувати дві молекули NADH і чотири молекули АТФ.

Шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса дає дві молекули NADH і чотири молекули АТФ на глюкозу. Оскільки енергія від АТФ використовується під час фази поглинання енергії, тоді від цього шляху становитиме дві молекули NADH і дві молекули АТФ на глюкозу. Кінцевими продуктами є піруват і молекули води. У цьому шляху на кожен молекулу глюкози можна очікувати дві молекули пірувату та дві молекули води. Піруват перетворюється на ацетил-КоА для переходу на наступну стадію клітинного дихання, тобто цикл Кребса.

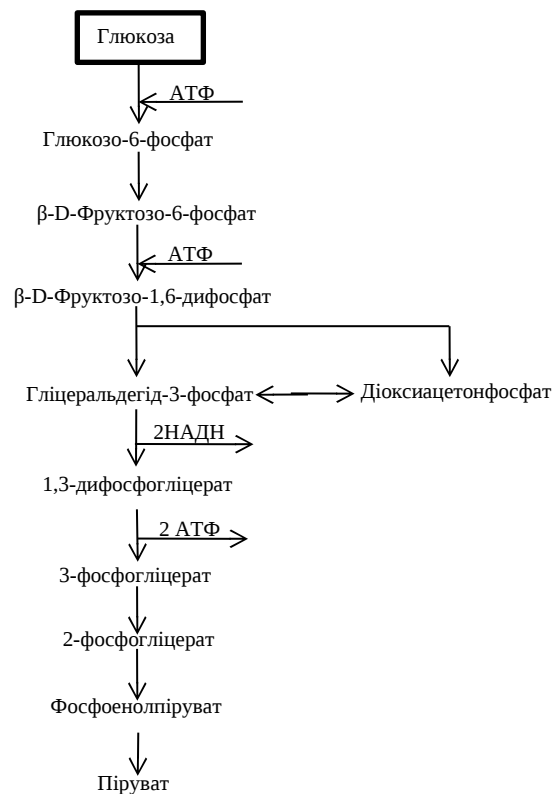


Рис. 3.1. Катаболізм глюкози у *Lactobacillus plantarum* AS14 [24].

Кожна реакція, яка є складовою гліколізу, за винятком фосфоруктокіназної, гексокіназної та піруваткіназної, є оборотними.

### 3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

На рис. 3.2. наведена схема біосинтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS14, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату – глюкози [24].

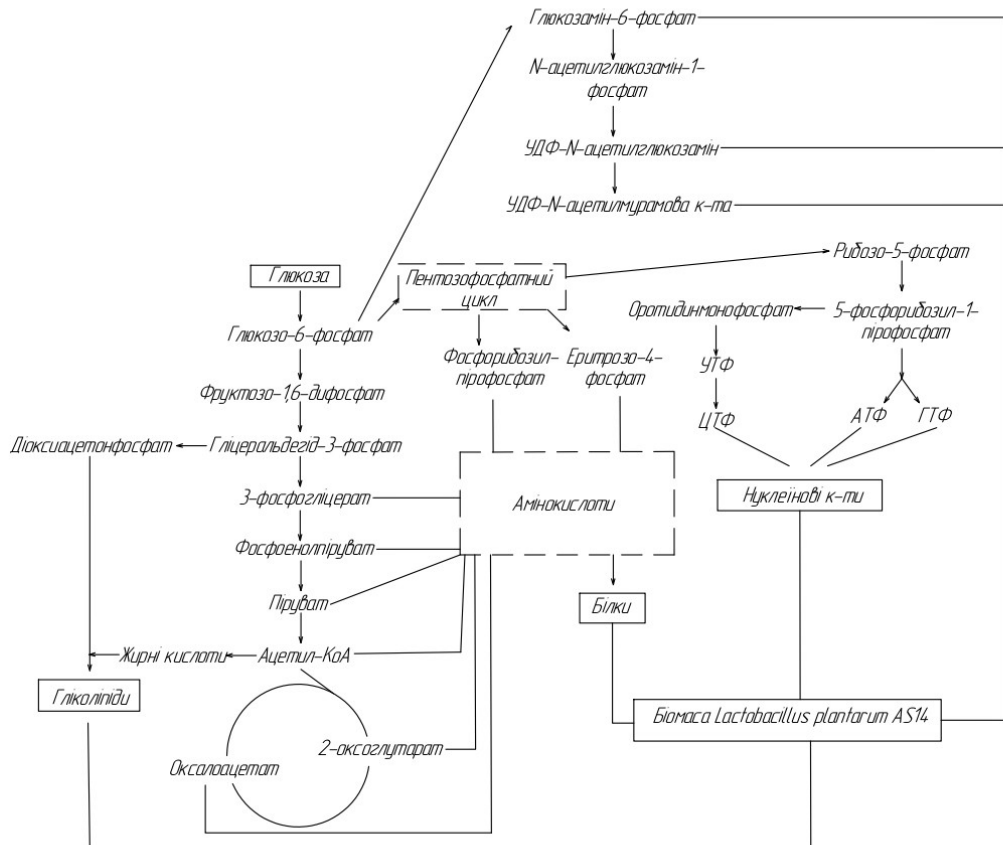


Рис. 3.2. Схема біотрансформації ростового субстрату

## РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

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

Культивування бактерії *Lactobacillus plantarum* AS14 передбачається проводити в ферментерах глибинним способом. Основним методом мікробіологічного виробництва є глибинне культивування. Він має багато переваг перед поверхневим культивуванням:

- ✓ менш трудомістке;
- ✓ потребує менше площ;
- ✓ має меншу ймовірність інфікування;
- ✓ його легше автоматизувати і контролювати;
- ✓ отримується більший вихід продукції.

Глибинне культивування передбачається проводити періодично, оскільки немає необхідності підтримувати культуру мікроорганізмів у стані експоненціального росту тривалий час. При періодичному процесі весь об'єм живильного середовища засівають посівним матеріалом і проводять культивування в оптимальних умовах протягом певного часу до накопичення необхідної кількості біомаси або цільового продукту [25].

*Lactobacillus plantarum* AS14 – анаеробний штам, тож для його культивування аерація не потрібна.

Оптимальна температура для культивування *Lactobacillus plantarum* AS14 - 40°C, а оптимальне значення рН = 6,2 , тож можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами. Необхідно провести стерилізацію обладнання та комунікацій, живильного середовища. Щоб уникнути будь-якого забруднення, у ферментері створюється надлишковий тиск.

<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>				
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат
		Документа		а
		Розроб. ХОМЕНКО		
		Перевір. РЮЗНІЧЕНКО		
		Ю.М.		
		Коректор.		
		Затверд. Стабніков		
		В.П.		
<b>Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної</b>			Літ.	Арк.
			26	10
			28	
			<b>Кафедра БТМ</b>	

Тому культивування цього продуцента відбувається при періодичному глибинному культивуванні в стерильних і анаеробних умовах.

У роботі розглядається використання ферментера з механічним перемішуванням для інтенсифікації масообміну. Оскільки процес культивування *Lactobacillus plantarum* AS14 не супроводжується утворенням міцелію, утворенням речовин, які призводили б до суттєвого підвищення в'язкості середовища, та передбачає забезпечення низької інтенсивності перемішування середовища, доцільно використовувати лопатеву мішалку (з шістьма лопатями). Для запобігання утворенню воронки під час змішування ферментер оснащений чотирма відбивними перегородками.

Ферментер повинен мати обладнання, що дозволяє забезпечити достатнє перемішування культури, підтримувати необхідну температуру, а також контрольно-вимірювальними приладами.

Підтримка оптимальної температури для росту бактеріальних клітин і підвищення фізіологічної та біохімічної активності забезпечується сорочкою ферментера або системою зміювика, яка забезпечує воду для охолодження або пару під час процесу стерилізації.

Моніторинг основних процесів життєдіяльності організму здійснюється за допомогою контрольно-вимірювальної апаратури, яка дозволяє підтримувати температуру всередині ферментера, рН середовища, тиск в середині ферментера та інші параметри на рівні, що заданий оператором. Ферментер оснащений пристроями для перенесення посівного матеріалу, внесення додаткових поживних речовин, необхідних для поліпшення розвитку продуцента, і пристроєм для відбору проб.

Для забезпечення стерильності процесу бродіння в ферментері слід використовувати торцеві ущільнення валу змішувача з захистом від пари. За допомогою такої конструкції можна майже повністю запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, що дуже важливо для дотримання асептичних умов культивування [26].

Ферментер SARTORIUS (Німеччина) [27] об'ємом 100 л задовольняє всі вище зазначені вимоги (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Ферментер SARTORIUS (Німеччина) об'ємом 100 л.

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

Для вибору мийно-дезінфікуючого засобу необхідно враховувати його вартість і витрати на обробку необхідної поверхні виробничих приміщень. На 1 м<sup>2</sup> витрачається близько 100 мл робочого розчину миючого або дезінфікуючого засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Обираючи той чи інший миючий і дезінфікуючий засоб звертати увагу в основному на об'єкта, що підлягає обробці, тобто для стін, для комунікацій, обладнання, інвентарю, підлоги або стелі.

Знаючи вимоги до мийних та дезінфікуючих засобів, такі як рівень антимікробної активності, необхідність забезпечити повне усунення механічного, білкового та ліпідного забруднення шляхом їх диспергування та емульгування, будучи при цьому найефективнішими, безпечними та недорогими миючими та дезінфікуючими засобами різних складів були проаналізовані і виробники. Проаналізовані нами мийно-дезінфікуючі засоби, наявні у «Державному реєстрі дезінфекційних засобів» (2022), що свідчить про те, що вони дозволені до використання на фармацевтичних та біотехнологічних виробництвах [28].

Проаналізовано мийно-дезінфікуючі засоби «Дезекон ОМ», «Vasept forte» та «Дезекон» для миття інвентарю, комунікацій, обладнання, тари.

**«Дезекон ОМ»:** Дуже економічний слабопінний лужний концентрований дезінфікуючий засіб на основі композиції четвертинних амонійних солей, амінів і бігуанідів для дезінфекції, комплексного миття, дезодорації.

Склад: амінопропілдодецилпропандіаміна – не менше 5,0%, синергічна полігексаметіленбігуанід гідрохлориду – не менше 0,98%, композиція дідецилдіметіламоніум хлориду – не менше 9,0%, (діючі речовини) і допоміжних компонентів.

Засіб має бактерицидні, віруліцидні, фунгіцидні властивості. З підвищенням температури розчинів підвищується їх антимікробна активність і очисна здатність.

III клас небезпеки (за ДСТУ 12.1.007-76 речовини помірнонебезпечні) при введенні в шлунок та IV клас небезпеки (за ДСТУ 12.1.007-76 малонебезпечні речовини) при нанесенні на шкіру, інгаляційній дії в умовах вільного випаровування [29].

**«Vasept forte»:** Засіб має миючі та дезінфікуючі властивості, що дозволяє економити. Усуває механічні, білкові та жирові забруднення зовнішніх поверхонь. Засіб має миючі, очищувальні та дезодоруючі властивості, не пошкоджує предмети, що підлягають дезінфекції (вироби з пластику, гуми, металу, нержавіючої сталі, міді, алюмінію, свинцю та олова, скла та інших матеріалів), не закріплюється на поверхні об'єктів очищення від органічних забруднень, не залишаючи плям і нальоту.

У порівнянні з однокомпонентними засобами склад даного засобу є комбінованим, що забезпечує більш ефективне очищення та процес дезінфекції.

«VASEPT forte», має антимікробну активність до грампозитивних та грамнегативних бактерій, має фунгіцидні, віруліцидні та спороцидні властивості.

Належить до мало небезпечних речовин (4 клас безпеки) за нанесення на шкіру та при потраплянні у шлунок [30].

**«Дезекон»:** Рідкий концентрований лужний миючий дезінфікуючий засіб з посиленою мийною дією для передстерилізаційного очищення, дезінфекції, генеральних і щоденних прибирань і санітарної обробки.

Комплекс 4-х четвертинних амонієвих солей (не менше 5,5%) виступає діючою речовиною в ньому і синергічно діючих допоміжних компонентів. Засіб має рН  $12,4 \pm 0,5$ .

Даний засіб ефективний проти грампоз. і грамнегат. бактерій, вірусів, патогенних грибів і цвілевих грибів.

III клас безпеки (за ДСТУ 12.1.007-76 речовини помірнонебезпечні) при введенні в шлунок та IV клас безпеки (за ДСТУ 12.1.007-76 малонебезпечні речовини) при нанесенні на шкіру, інгаляційній дії в умовах вільного випаровування [31].

«Vasept forte», а також «Дезекон ОМ» обираються у результаті аналізу даних щодо ефективності, вартості та безпечності.

Для миття та дезінфекції підлоги, дверей, і стін, здійснено аналіз таких мийно-дезінфікуючих засобів, як «Дезактин», «Славін-Дельта» та «Санікон».

**«Славін-Дельта»:** Концентрований універсальний засіб для миття та дезінфекції поверхонь, очищення перед стерилізацією та дезінфекції інструментів. Виражена синергія катіонних поверхнево-активних речовин - гідрохлориду ПГМГ і хлористого алкілдиметилбензиламонію, доповнених комплексом альдегід-органічна кислота, які створюють оптимальний діапазон концентрацій іонів водню і забезпечують утворення стійких хелатних комплексів з іонами Ca і Mg - дозволяє отримати стабільний склад, що володіє повним спектром протимікробної (включаючи вегетативні та спорові форми бактерій), віруліцидної та фунгіцидної дії, у тому числі зі значним біологічним навантаженням.

Склад: алкілдиметилбензиламоній хлорид - 2,5%, ПГМГ гідрохлорид - 2,5%, глутаровий альдегід - 3%, органічні кислоти, інгібітор корозії, та ін.

Спектр дії:

- Фунгіцидний;
- Бактерицидний;
- спороцидну;
- віруліцидної [32].

**«Дезактин»:** **Склад засобу%:** диспергатор - 9,0-12,0; 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4; інгібітор корозії до 10,0; дихлорантин - 21,0-23,0; аніонні поверхнево-активні речовини - 3,2-5,0; наповнювач до 100,0. Не менше 14,0% складає активний хлор.

Даний засіб має широкий спектр антимікробної активності: віруліцидні бактерицидні, фунгіцидні властивості.

Дезактин - малонебезпечна речовина [33].

**«Санікон»:** Рідкий, концентрований лужний дезінфікуючий засіб із покращеною миючою дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденного та генерального прибирання та гігієни.

III клас небезпеки (за ДСТУ 12.1.007-76 речовини помірнонебезпечні) при введенні в шлунок та IV клас небезпеки (за ДСТУ 12.1.007-76 малонебезпечні речовини) при нанесенні на шкіру, інгаляційній дії в умовах вільного випаровування [34].

«Дезактин» та «Санікон» - обираються у результаті аналізу даних щодо безпечності, ефективності, та вартості.

3 місяці – це інтервал, з яким засоби варто застосовувати для попередження розвитку стійкості штамів мікроорганізмів, що знаходяться на виробництві.

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

##### ***Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках***

Проаналізувавши склад поживного середовища для культивування *Lactobacillus plantarum* AS14, оскільки біотехнологічний процес проходить в

асептичних умовах, умовно розділимо їх на такі склади композицій (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

**Композиція А:** Глюкоза, сирна сироватка, кукурудзяний та дріжджовий екстракт, твін (112°C, 30 хв).

**Композиція Б:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (131°C, 60 хв).

**Композиція В:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , натрію ацетат (131°C, 60 хв).

Окремо готуємо запасний розчин солей:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{FeCl}_3$  (режим стерилізації: 131°C, 60хв). Для двох стадій підготовки (колби на качалках та інокулятор 10л). Після приготування запасного розчину компоненти їх додають до композиції Б.

#### *Приготування і стерилізація композиції А*

Враховуючи те, що об'єм складу композиції А невеликий, будемо готувати його в окремому флаконі і стерилізувати в автоклаві. Склад композиції змішується. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C упродовж 30 хв.

#### *Приготування та стерилізація композиції Б*

Композиція В буде стерилізуватись в окремій колбі та стерилізована в автоклаві. Масу поміщають у колбу, перемішують і додають водопровідну воду. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 60 хв.

#### *Приготування та стерилізація композиції В*

Композицію Б стерилізують в окремій колбі і стерилізують в автоклаві. Масу поміщають у колбу, перемішують і додають водопровідну воду. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 60 хв.

Об'єм живильного середовища для культивування в пляшках на гойдалках становить 700 мл, тому її доцільно стерилізувати в автоклаві в окремих флаконах (солі фосфору стерилізуються нами окремо від інших солей для запобігання осіданню).

#### *Приготування та стерилізація поживного середовища для*

### ***культивування в інокуляторі об'ємом 10 л***

**КомпозиціяА:** Глюкоза, сирна сироватка, кукурудзяний та дріжджовий екстракт, твін (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

**КомпозиціяБ:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

**КомпозиціяВ:**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , натрію ацетат (режим стерилізації: 131°C, 60 хв).

Для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л необхідно приготувати 7 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 0,7 л, тоді загальний об'єм композиції становить 6,3 л.

#### ***Приготування і стерилізація композиції А***

Враховуючи, що об'єм складу А невеликий, готуємо їх в окремі флакони і стерилізуємо в автоклаві. Композицію перемішують, бутль закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

#### ***Приготування та стерилізація композиції Б***

Враховуючи, що об'єм складу Б невеликий, готуємо їх в окремі флакони і стерилізуємо в автоклаві. Наважку поміщають у бутль, перемішують і додають водопровідну воду. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

#### ***Приготування та стерилізація композиції В***

Стерилізувати композицію В будемо в окремому бутлі, а стерилізувати будемо в автоклаві. Наважку поміщають у бутль, перемішують і додають водопровідну воду. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

#### ***Приготування і стерилізація поживного середовища для***

#### ***культивування в ферментері об'ємом 100л***

**КомпозиціяА:** Глюкоза, сирна сироватка, кукурудзяний та дріжджовий екстракт, твін (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

**Композиція Б:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , натрію ацетат,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{FeCl}_3$   
(режим стерилізації:  $131^\circ\text{C}$ , 60 хв).

Враховуючи те, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 7 л, тоді загальний об'єм композиції становить 63 л.

#### *Приготування і стерилізація композиції А*

У промислових масштабах зважують композицію А. Масу завантажують у реактор-змішувач, додають воду та перемішують. Стерилізацію проводять при температурі  $112^\circ\text{C}$  упродовж 30 хв.

#### *Приготування і стерилізація композиції Б*

Стерилізувати композицію Б будемо безпосередньо в ферментері. Наважки поміщають у збірник – змішувач, додають водопровідну воду та перемішують. Розчин переносять у попередньо простерилізований ферментер. Перед стерилізацією для уникнення утворення осаду солей композицію підкислюємо  $\text{HCl}$ . Температура стерилізації –  $131^\circ\text{C}$  (тиск – 0,05 МПа), тривалість 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

### Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д-1, Д-3, Д-5	Дозатор об'ємно-ваговий	3	Дозатор VD1-V8 (Україна). Обсяг дозуючої речовини - 0,2-400 кг [1].
РЗ-2	Реактор-змішувач для приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Дезактин»	1	Реактор-змішувач об'ємом 200 л компанії «Діоніс» (Україна), оснащений перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 50 об/хв [2].
РЗ-4	Реактор-змішувач для приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Дезекон ОМ»	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л компанії «Кабельфармтехніка» (Україна), оснащений перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 150 об/хв [3].
Ф-6, Ф-10, Ф-13	Індивідуальний фільтр високоефективного очищення	3	Фільтр Д-23. Фільтрувальний матеріал – ФП (фільтр Петрянова), пропускна здатність – 3400 м3/год, ступінь очищення E=99,999 %. Виробник: «Вентиляторний завод «Укрвентсистеми» [4].
РЗ-7	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач об'ємом 50 л компанії «Укрхемгруп» (Україна), оснащений перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 120 об/хв [5].
РЗ-8	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор об'ємом 100 л фірми «Промвіт» (Україна). Швидкість перемішування 100 об/хв. Ущільнення мішалки – торцеве [6].
ЗП-9	Засівний пристрій	1	Збірник циліндричний із днищем з нижнім спуском. Об'єм – 1 л.

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат			
Розроб.		документа		а			
Перевір.		Р.Юніченко			Літ.	Арк.	Акрушів
		Ю.М.				36	2
Коректор.					<b>Кафедра БТМ</b> 37		
Затверд.		Стабніков					
					<b>Розділ 5. Специфікація обладнання</b>		
					<b>В.П.</b>		

Закінчення табл. 5.1

ІН-11	Інокулятор об'ємом 10 л	1	Ферментер компанії «Sartorius» (Німеччина) об'ємом 10 л, швидкість перемішування 50-300 об/хв [7].
Н-12, Н-15	Насос відцентровий закритого типу	2	Відцентровий насос DM 06 компанії «Debem» (Італія) герметичний з магнітною муфтою. Продуктивність – 0,5 мЗ/год [8].
ФР-14	Виробничий ферментер	1	Ферментер компанії «Sartorius» (Німеччина) об'ємом 100 л, швидкість перемішування 50-300 об/хв [9].

Примітка:

1. <https://prom.ua> (Дозатор об'ємно-ваговий);
2. <https://odessa.flagma.ua> (Реактор-змішувач для приготування мийно-дезинфікуючого засобу);
3. <http://www.kft2.com.ua> (Реактор-змішувач для приготування мийно-дезинфікуючого засобу);
4. [http://ukrvent.ua/filtr\\_d.html](http://ukrvent.ua/filtr_d.html) (Індивідуальний фільтр вискоефективного очищення);
5. <https://ukrchemgroup.com> (Реактор-змішувач для приготування композиції А);
6. <https://promvit.com.ua> (Реактор-змішувач для приготування композиції Б);
7. <https://www.sartorius.com> (Інокулятор об'ємом 10 л);
8. <https://www.debem.com.ua> (Герметичний насос з магнітною муфтою);
9. <https://www.sartorius.com> (Виробничий ферментер об'ємом 100 л).

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Біосинтез біомаси молочнокислих бактерій здійснюється за наступною технологічною схемою, що включає допоміжні роботи (стадії наведені в описі) та технологічний процес (стадії наведені в описі).

Технологічну схему біосинтезу наведено у графічній частині проекту.

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

#### **ДР 1.1. Підготовка мийючих та дезінфікуючих засобів**

##### *ДР 1.1.1. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Дезактин»*

Для приготування робочого мийно-дезінфекційного розчину «Дезактин» необхідний концентрований розчин, який потім розбавляють водопровідною водою до необхідної концентрації (0,5%). Готується в реакторі-змішувачі (РЗ-2) об'ємом 200 л. Для одержання 0,5% розчину «Дезактину» за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-1) додають 6,81 л 11% розчину «Дезактину» і 143,2 л водопровідної води, потім проводять перемішування за допомогою мішалки. Готовий розчин не можна зберігати більше 30 днів.

##### *ДР 1.1.2. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Дезекон ОМ»*

Для приготування мийно-дезінфікуючого розчину Дезекон ОМ необхідний концентрований розчин, який потім розбавляють водопровідною водою до необхідної концентрації (0,02%). Готується в реакторі-змішувачі (РЗ-4) об'ємом 100 л. Для отримання 0,02% розчину «Дезекон ОМ» об'ємно-ваговим дозатором (Д-3) додають 100 мл 14% розчину «Дезекон ОМ» і 69,9 л водопровідної води, потім перемішують на мішальному пристрої. Готовий розчин зберігати не можна

					<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>			
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат	<b>Розділ 6. Опис технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		документа <i>Хомченко</i>		<i>а</i>			38	12
Перевір.		<i>Р.В.Зніченко</i> <i>Ю.М.</i>						39
Коректур.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Затверд.		<i>Стабніков</i> <i>В.П.</i>						

більше 14 діб.

## ***ДР 1.2. Підготовка персоналу***

### ***ДР 1.2.1 Навчання та інструктаж***

У кожній біотехнологічній компанії працівники проходять навчання та інструктаж перед початком роботи. Навчання співробітників проводиться щороку. Під час навчання з працівниками детально обговорюється поняття забезпечення якості продукції, підготовка та виконання технологічного процесу.

### ***ДР 1.2.2 Санітарна підготовка персоналу***

При прийнятті на роботу працівники повинні проходити обов'язковий медичний огляд. Безпосередньо на виробництві проводиться інструктаж з персоналом щодо дотримання правил гігієни та санітарно-гігієнічних вимог. Перед початком роботи працівники зобов'язані одягнути чистий санітарний одяг, зібрати волосся під шапочку, зняти прикраси, ретельно вимити руки з милом і продезінфікувати їх.

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

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

Після закінчення кожної зміни відповідальний персонал проводить щоденне прибирання за використання вологого способу. Прибирання здійснюють у лабораторних, виробничих, побутових, та підсобних кабінетах. 0,5 % робочий розчин «Дезактин» - використовується як основний засіб для проведення даних маніпуляцій (від ДР 1.1.2).

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

З періодичністю один раз на місяць здійснюють процес генерального прибирання за використання 0,5 %-го приготованого робочого розчину «Дезактин» (від ДР 1.1.2). Обробка всіх поверхонь здійснюється за застосування гідропульту описаним раніше розчином. Після того, як вся кімната зрошена, її закривають на 60 хвилин, і відразу після закінчення часу очікування забирають надлишок даного розчину за використання губок. Якщо залишилися забруднені місця миють додатково розчином цим же.

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

### ***ДР 1.4.1. Миття обладнання***

Ємнісне обладнання мийуть водопровідною водою та робочим розчином «Дезекон ОМ»(від ДР 1.1.1). Тривалість процесу миття комунікацій та власне обладнання займає 1-2 години. Візуальний огляд є невід'ємною частиною закінчення даного етапу.

### ***ДР 1.4.2. Ополіскування обладнання***

Після миття, щоб змити залишки мийного засобу, промити очищеною водою протягом 30 хвилин, щоб виключити можливість заподіяння шкоди здоров'ю персоналу розчином засобу.

### ***ДР 1.4.3. Технічний огляд***

Процесу стерилізації передує процес візуальної оцінки устаткування на наявність будь-яких вм'ятин, пошкоджень, впадин, та ін., в просторі яких може залишатись забруднення, що в свою чергу тягне за собою перехресну контамінацію. Несправності, що були виявленні на даному етапі негайно усувають.

### ***ДР 1.4.4. Перевірка обладнання на герметичність***

Після обробки, промивання та ремонтних робіт установки перевіряють на герметичність, для цього в апарат вводять невелику кількість легкої галогеновмісної речовини (дифторхлорметану). Потім закривають усі запірні крани сховища і подають підготовлене повітря до значення надлишкового тиску  $P = 0,2$  МПа. Потім закривають кран подачі повітря і записують в робочий журнал показання манометра на кришці приладу і час витримки (до 1 години). Після часу витримки порівнюють показання манометра, якщо різниця менше 0,01Мпа, прилад вважається герметичним. Якщо є велике відхилення, пошук витоку за допомогою галогенного течедетектора починається з перевірки всіх точок підключення. При наближенні щупа течешукача до витоку реєструються пари галогеновмісної речовини, що вказує на наявність витоку. Коли всі ці плями виявлені, їх усувають шляхом

підтягування різьбових з'єднань або заміни прокладок. Потім пристрій ще раз перевіряють на герметичність.

#### *ДР 1.4.5. Стерилізація обладнання*

Для стерилізації в сорочку установки подають насичену пару і нагрівають її до 80–90 °С. Відкрийте всі запірні крани на відкритих кінцях труб і з'єднаннях, що ведуть до пристрою, і введіть насичену пару безпосередньо в пристрій через нижню трубу, в той же час обов'язково відкрийте випускний клапан витяжного повітря, щоб видалити повітря з пристрою. При досягненні температури стерилізації (125-130 °С) всі запірні вентиля, крім парового, закривають і витримують протягом 1 години. Після закінчення витримки паровий вентиль закривають, в апарат вводять стерильний повітря, а в сорочку — холодну воду. Процес охолодження проводять до досягнення температури 30-40 °С і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа.

### **ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів**

*ДР 2.1. Приготування та стерилізація титрувального агента NaOH для ферментера об'ємом 100 л.*

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{140 \times 6}{100} = 8,4 \text{ г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 140 мл)}$$

На технічних вагах зважують 8,4 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 400 мл, і додають 132 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

*ДР 2.2 Підготовка титрувального агента HCl для ферментера об'ємом 100 л.*

*Приготування розчину відбувається під витяжною шафою в асептичних умовах.*

Розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 140 мл):

$$0,36x = 0,06 \times 140$$

$$0,36x = 8,4$$

$$x = 23,3 \text{ мл} \approx 24 \text{ мл (36\% – і HCl)}$$

Розрахунок кількості дистильованої води необхідної для приготування 140 мл

6 % HCl:

$$140 - 24 = 116 \text{ мл}$$

Приготування кислоти відбувається у стерильній колбі об'ємом 400 мл.

В асептичних умовах (під витяжною шафою) відміряють 24 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають в стерильну колбу об'ємом 400 мл, і додають 116 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

### **ДР 3. Приготування запасного розчину солей**

#### ***ДР 3.1 Приготування та стерилізація запасного розчину солей***

Наважку  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{FeCl}_3$  завантажують у бутль та додають воду водопровідну. Закривають ватно – марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 60 хв.

### **ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища**

***ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.***

У даному середовищі для культивування продуцента, джерелом азоту (основним) є сирна сироватка, а джерелом вуглецю – глюкоза та кукурудзяний екстракт.

Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища об'ємом 0,7 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках (табл.4.1.)

Таблиця 4.1.

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування в посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,7л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	60	42	А	0,4
Глюкоза	15	10,5		
Кукурудзяний екстракт	15	10,5		
Дріжджовий екстракт	8	5,6		
Твін 80	0,2	0,14		
<b>Вода</b>		<b>331,3 (мл)</b>	Б	0,2
$K_2HPO_4$	0,2	0,14		
<b>Вода</b>		<b>200 (мл)</b>	В	0,1
$(NH_4)_2SO_4$	0,2	0,14		
Натрію ацетат	5	3,5		
<b>Вода</b>		<b>96,4 (мл)</b>		
<b>Разом:</b>		0,7		<b>0,7</b>

*Усі композиції готують у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві*

*ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А.*

На технічних вагах зважують сирної сироватки 42 г, глюкози 10,5 г, кукурудзяний екстракт 10,5 г та дріжджового екстракту 5,6 г та 0,14 г твін 80. Наважку поміщають до колби об'ємом 2 л та додають 400 мл води очищеної. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

*ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 0,14 г  $K_2HPO_4$ . Наважку поміщають у колбу об'ємом 400 мл, і додають 200 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

### ДР 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,14 г  $(NH_4)_2SO_4$  та 3,5 г натрій ацетату. Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл, і додають 100 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

### ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 10 л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 7 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 7 л поживного середовища наведено в (табл. 4.2.).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 0,7 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 6,3 л.

Таблиця 4.2.

#### Розрахунок вмісту компонентів для приготування 7 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 7л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	60	420	А	2,5
Глюкоза	15	105		
Кукурудзяний екстракт	15	105		
Дріжджовий екстракт	8	56		
Твін 80	0,2	1,4		
<b>Вода</b>		<b>2,5 (л)</b>		
$K_2HPO_4$	0,2	1,4	Б	2,5
<b>Вода</b>		<b>2,5 (л)</b>		
$(NH_4)_2SO_4$	0,2	1,4	В	1,3
Натрію ацетат	5	35		
<b>Вода</b>		<b>1,3 (л)</b>		
<b>Разом:</b>		<b>6,3</b>		<b>6,3</b>

Усі композиції готують у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві

#### ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А.

На технічних вагах зважують сирної сироватки 420 г глюкози 105 г, кукурудзяний екстракт 105 г та дріжджового екстракту 56 г та 1,4 г твін 80. Наважку композиції завантажують до колби бутля 4 л та додають мірником 2,5 л води очищеної. Бутль закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

*ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 1,4 г  $K_2HPO_4$ . Наважку поміщають у бутль об'ємом 4 л, і додають мірником 2,5 л водопровідної води, перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

*ДР 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 1,4 г  $(NH_4)_2SO_4$  та 35 г натрій ацетату. Наважки поміщають у бутль об'ємом 4л, і додають 1,3 л водопровідної води, перемішують. Закривають бутль ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 60 хв.

***ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 100 л.***

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 70 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 70 л поживного середовища наведено в (табл. 4.3.).

Для засіву поживного середовища в ферментер необхідно внести 7 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 63 л (з урахуванням конденсату).

Таблиця 4.3.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 70 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 70л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сирна сироватка	60	4200	<b>А</b>	25
Глюкоза	15	1050		
Кукурудзяний екстракт	15	1050		

Дріжджовий екстракт	8	560				
Твін 80	0,2	14				
<b>Вода</b>		<b>22,4 (л)</b>				
<b>Конденсат</b>		<b>2,5 (л)</b>				
$K_2HPO_4$	0,2	14	<b>Б</b>	38		
$(NH_4)_2SO_4$	0,2	14				
Натрію ацетат	5	350				
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05	3,5				
$FeCl_3$	0,05	3,5				
<b>Вода</b>		<b>34,1 (л)</b>				
<b>Конденсат</b>		<b>3,8 (л)</b>				
<b>Разом:</b>		63				<b>63</b>

#### *ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А.*

Через об'ємно ваговий дозатор (Д-5) зважують сирної сироватки 4200 г глюкози 1050 г, кукурудзяний екстракт 1050 г та дріжджового екстракту 560 г та 14 г твін 80. Наважку композиції завантажують до реактора-змішувача (РЗ-7) об'ємом 50 л та додають 22,4 л водопровідної води. Для досягнення температури стерилізації в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 112°C, тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Тоді, самоплином стерильна композиція А перекачується до ферментеру.

#### *ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 14 г  $K_2HPO_4$ , 14 г  $(NH_4)_2SO_4$ , 350 г натрій ацетату, 3,5 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  та 3,5 г  $FeCl_3$ . Наважку поміщають до збірника-змішувача (РЗ-8) об'ємом 100 л, і додають 42,3 л водопровідної води, перемішують. Тоді, готовий розчин солей самоплином перекачують до ферментера. Стерилізація композиції Б буде відбуватися безпосередньо в ферментері. Для досягнення температури стерилізації в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 60 хв з моменту досягнення температури стерилізації (перед стерилізацією розчин підкислюємо HCl до рН 4-4,5, для унеможливлення утворення осаду). Після стерилізації рН середовища доводять до оптимального значення розчином 6% NaOH.

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

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

Колекційну культуру *Lactobacillus plantarum* AS14, зберігають у стані ліофілізації в запаяних флаконах (ампулах), при температурі 4°C 3-4 місяці.

### **ТП 5.2. Одержання робочої культури**

Відкривають запаяні флакони та піпеткою в асептичних умовах вносять 5 мл ізотонічного розчину хлориду натрію та перемішують. Тією ж піпеткою переносять в пробірки з приготованим середовищем MRS. Вирощуємо протягом 48 год при температурі 40°C.

### **ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках**

Для вирощування рідкого посівного матеріалу, у 5 стерильних качалочних колб об'ємом 750мл, в асептичних умовах наливають по 140 мл поживного середовища від ДР 4.1 та запасний розчин солей від ДР 3.1.

У пробірку з робочою культурою *L. plantarum* AS14, вирощеною на агаризованому MRS середовищі, додають 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (промивають культуру), збирають отриману суспензію піпеткою і поміщають у колби, наповнені живильним середовищем. Бактеріальну суспензію, отриману з пробірки, використовують для засіву колби.

Температура 40°C , час 48 год - саме за таких умов проводиться культивування *L. plantarum* AS14 у колбах на качалці (частота обертання качалки, на якій закріплені колби, становить 150 об/хв). Після цього посівний матеріал із флаконів переносять уже у стерильний посівний флакон об'ємом 2 л. Для мікробіологічного контролю з колби відбирають пробу.

### **ТП 5.4. Вирощування в інокуляторі 10 л**

У попередньо простерилізований інокулятор (ІН-11) стерильно вносять композицію А (від ДР 4.2.1), композицію Б (від ДР 4.2.2), композицію В (від ДР 4.2.3) та запасний розчин солей (від ДР 3.1). Подача холодної води в рубашку устаткування здійснюється з метою охолодження компонентів суміші. Після цього, через факел (зі засівної колби) вносять посівний

матеріал (від *ТП 5.3.*). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку, температура  $40\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , тривалість 24 год.

## ***ТП 6. Біосинтез***

### ***ТП 6.1. Виробниче культивування***

Біосинтез проводять у ферментері (ФР-14) об'ємом 100 л (робочий об'єм – 70 л). У попередньо простерилізований ферментер з розчином солей (від *ДР 4.3.2*) самоплином вносять композицію А (від *ДР 4.3.1*). Охолоджують компоненти суміші у ферментері. Середовище доводять за допомогою розчину лугу до оптимального. Далі через трубопровід, за допомогою насосу (Н-12), подається посівний матеріал (від *ТП 5.4*). Вмикають мішалку, температура  $40\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , тривалість культивування 24 год. Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині біомаси 15,41 г/л.

З метою проведення аналізів мікробіологічного аналізу, у період через кожні 4 год з біореактора відбирається певна кількість культуральної рідини, а саме 20 мл, на дослідження відсутності сторонньої мікробіоти та концентрація біомаси молочнокислих бактерій.

## ***ЗВ 7. Знешкодження відходів.***

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

Рідкі відходи виробництва утилізуються шляхом біологічного очищення, а саме через резервуари для активного мулу.

Аеротенки – це бетонні або залізобетонні резервуари, крізь які повільно протікає суміш активного мулу і попередньо відстояної стічної рідини. Аеротенки відносяться до гомогенних біореакторів. Типова їх конструкція являє собою глибокий герметичний залізобетонний резервуар прямокутної форми висотою 3-6 м, обладнаний аераційними пристроями і сполучений з відстійником. Аеротенк розділений на 3-4 секції. Активний мул являє собою речовину у вигляді темно-коричневих шарів і складається на 70% з природного поєднання аеробних мікроорганізмів (бактерій і найпростіших) і на 30% з твердих частинок неорганічного походження.

Мікроорганізми разом із твердими елементами, до яких вони прикріплені, утворюють зооглію – симбіоз популяцій організмів, вкритих спільною слизовою оболонкою. Активний мул адсорбує і окислює за участю кисню і органічної сечовини, що міститься в стічних водах. Суміш стічної води та активного мулу безпечно обробляється, щоб підтримувати мул у зваженому стані та подавати кисень.

Басейни встановлюють разом з відстійниками, в яких осідає мул, що накопичується у великій кількості. Частина активного мулу повертається в систему очищення, а надлишок активного мулу, який утворився в результаті заселення мікроорганізмів, після зневоднення досягає мулових полів, а потім транспортується на поля [35].

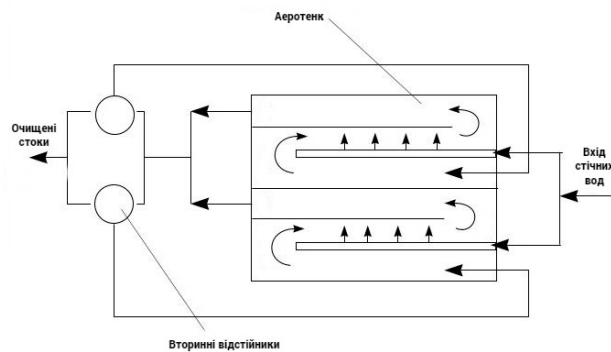


Рис. 6.1. Схема роботи аеротенку з відстійниками

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Враховуючи те, що культивування *Lactobacillus plantarum* проводиться за дотримання асептичних умов, необхідно на всіх етапах проводити мікробіологічний контроль на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою. 20 мл культуральної рідини необхідна для проведення аналізів, і вона відбирається кожної 4 години з біореактора.

### 7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Далі наведено таблицю точок контролю виробництва біомаси *Lactobacillus plantarum*.

Таблиця 7.1

#### Карта контрольних точок виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Дезефект»	Розчин мийно-дезінфікуючого розчину Концентрація	Рефрактометр р	Концентрація перевіряється після приготування розчину	C=0,5%
Кх 1.1.2 Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Дезекон ОМ»	Розчин мийно-дезінфікуючого розчину Концентрація	Рефрактометр р	Концентрація перевіряється після приготування розчину	C=0,02%
Км, Кх 1.3.1 Генеральне прибирання	Підлога, стіна, обладнання Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 300/см <sup>2</sup>

<b>НУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>				
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат
Розроб.	документа	Хомченко		а
Перевір.	Розніченко	Ю.М.		
Консульт.				
Затверд.	Стабніков			
<b>Розділ 7. Контроль виробництва</b>				
Продовження табл. 7.1				
Діт. Арк. Акр. 50 51				
<b>Кафедра БТМ</b>				

Км, Кх 1.3.2 <i>Щоденне прибирання виробничих приміщень</i>	<b>Підлога, стіна, обладнання</b> Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 800/см <sup>2</sup>
Кт 1.4.1 <i>Миття обладнання</i>	<b>Мийно-дезинфікуючий розчин, обладнання</b> Температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	t = 30°C, τ = 1-2год
Кт 1.4.2 <i>Ополіскування обладнання</i>	<b>Мийно-дезинфікуючий розчин, обладнання</b> Температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	t = 30°C, τ = 30 хв
Кт 1.4.4 <i>Перевірка на герметичність обладнання</i>	<b>Герметичність роботи обладнання</b> Час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,2 МПа, τ = 1 год
Кт 1.4.5 <i>Стерилізація обладнання</i>	<b>Обладнання</b> Температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник, термометр технічний	Тиск, температура визначається безперервно під час стерилізації	P = 0,28 МПа, τ = 1 год, t = 125 – 130°C
Кт, 2.1 <i>Приготування та стерилізація титрувального агенту гідроксиду натрію для ферментера об'ємом 100 л</i>	<b>Розчин гідроксиду натрію</b> Температура, час, концентрація, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, концентрація розчину визначається після приготування, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, τ = 60 хв, C = 6 %, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, 2.2 Підготовка титрувального агенту соляної кислоти для ферментера об'ємом 100 л	<b>Розчин соляної кислоти</b> Концентрація	Хімічний метод	Концентрація розчину визначається після приготування	C = 6 %
Кт, Км 3.1 Приготування та стерилізація запасного розчину солей	<b>Запасний розчин солей</b> Температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, концентрація розчину визначається після приготування, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ = 60 хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	<b>Композиція А</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, = 30 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2, 4.2.2, 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	<b>Композиція Б</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, = 60 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3, 4.2.3 Приготування і стерилізація композиції В	<b>Композиція В</b> Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, = 60 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти

<p>Кт, Км 5.1 <i>Підтримання колекційної культури</i></p>	<p><b>Колекційна культура <i>Lactobacillus plantarum</i> AS14</b> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій</p>	<p>Мікробіологічний контроль, Термометр технічний</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 3-4 місяці при пересіві культури</p>	<p>t = 4°C, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.2 <i>Одержання робочої культури</i></p>	<p><b>Робоча культура <i>Lactobacillus plantarum</i> AS14</b> Тривалість вирощування, температура, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність</p>	<p>Годинник, термометр технічний, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура контролюється і підтримується автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин</p>	<p>t= 40 °C, = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.3 <i>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</i></p>	<p><b>Посівний матеріал,</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин</p>	<p>t= 40 °C, = 48 год, n = 150 об/хв, рН = 6.2, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.4 <i>Вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л</i></p>	<p><b>Посівний матеріал,</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів</p>	<p>Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин</p>	<p>t= 40 °C, = 48 год, n = 150 об/хв, рН = 6.2, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Закінчення табл. 7.1

Кт, Км 6.1 Виробниче культивування	<b>Посівний матеріал,</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіюванн я – кожні 4 годин	t= 40 °С, = 48 год, n = 150 об/хв, рН = 6.2, Сбіомаса = 15,41 г/л відсутність сторонньої мікробіоти
--	--	--	---	---

**Мікробіологічний контроль виробничого синтезу може здійснюватись двома шляхами: мікроскопіюванням та висів на агаризовані поживні середовища.**

У світловому мікроскопі проводять процес мікроскопіювання. Препарат, відомий під назвою «роздавлена крапля», приготовлюється на поверхні знежиреного предметного скельця, на котре крапають маленьку краплю дистильованої води. Відповідно до правил асептики у воду бактеріологічною петлею додають невелику кількість культуральної рідини, перемішуючи і накриваючи покривним скельцем. У полі зору мають спостерігатися лише клітини біологічного агента *Lactobacillus plantarum*: клітини *L. plantarum* являють собою стрижні з закругленими кінцями, прямі, звичайно 0,9-1,2 мкм завширшки і 3-8 мкм в довжину, що зустрічаються поодинці, парами або короткими ланцюжками [36]. Загальний вигляд *L. plantarum* зображено на *рис. 7.1*.

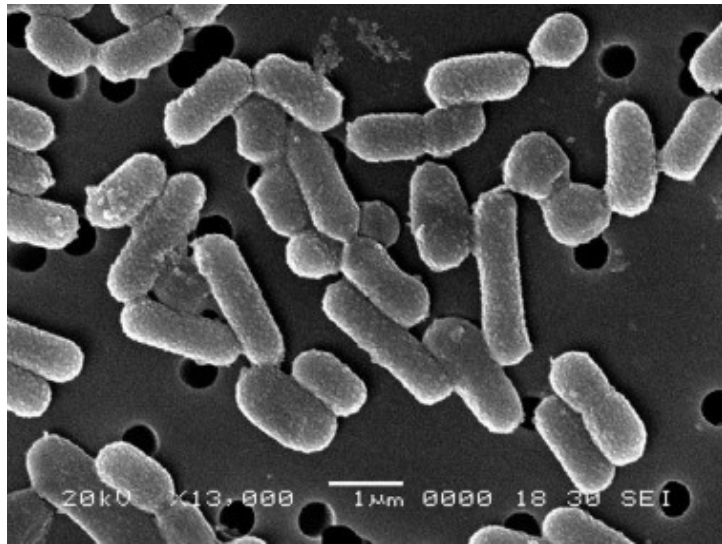


Рис.7.1 *Lactobacillus plantarum*

### **Визначення мікробіологічної чистоти**

Для цього визначення культуральну рідину висівають на чашки Петрі з середовищем MRS для виявлення бактерій (інкубують протягом 24 годин при температурі 40°C) і на чашки з сусло-агаром (СА) або глюкозно-картопляним агаром (НКА) для виявлення бактерій, дріжджі та гриби (інкубувати 7 діб при температурі 40°C). Для цього 0,1 мл суспензії відбирають піпеткою в асептичних умовах і поміщають у чашку Петрі. Шпатель Дригальського обпалюють і охолоджують, проводячи ним над кришкою чашки Петрі. Потім з обережністю розподіляють суспензію по всій поверхні живильного середовища за допомогою шпателя. Чашку необхідно перевернути, загорнути у папір і поставити у термостат. Після інкубації чашки Петрі з посівами дістають з термостата і візуально перевіряють культури на наявність сторонньої мікрофлори [37].

**Кількості життєздатних клітин** проводять посівом на чашки Петрі із середовищем MRS за методом послідовних десятикратних розведень (метод Коха). Культивування триває 24 години при температурі 40°C.

Для аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл суспензії клітин і поміщають її в 9 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, потім новою піпеткою послідовно переносять 1 мл в серію пробірок, що містять 9 мл стерильного крапа. води. З отриманих (попередньо

ретельно перемішаних) розведень проводять посів на поверхню агаризованого середовища в чашки Петрі. Посів проводять з кроком 0,1 мл, починаючи з найбільшого розведення. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні агаризованого середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Для кожного розведення використовують нову стерильну піпетку та шпатель. Чашки Петрі поміщають у термостат. Культивування триває 24 години при температурі 42°C. Після завершення культивування проводиться підрахунок колоній [38].

## **7.2 Концентрація біомаси**

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод), на фотоелектроколориметрі з довжиною хвилі 540 нм в кюветах з товщиною 0,5 см. Перерахунок на суху біомасу здійснюють за калібрувальним графіком [39].

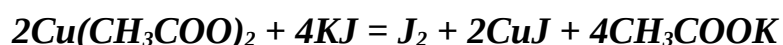
## **7.3 Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю**

**Визначення концентрації азоту.** Виходячи зі складу ПС, основними джерелами азоту будуть такі компоненти як: сирна сироватка, кукурудзяний та дріжджовий екстракти. Тому вміст амінного азоту в середовищі визначаємо мідним способом [40].

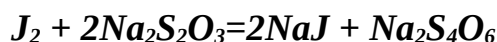
### ***Принцип методу***

Метод заснований на визначенні йодометричним титруванням кількості розчинних сполук амінокислот з міддю. За процедурою до слаболужного амінокислотного розчину додається надлишок розчину ортофосфату міді в буферному боратному розчині. При цьому утворюються розчинні сполуки міді. Суміш фільтрують для відділення її від нерозчинної ортофосфату міді. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відокремлює мідь від комплексної сполуки та перетворює її на ацетат міді.

Для визначення кількості міді, що бере участь у реакції, до розчину додають йодистий калій:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, що дорівнює кількості міді і, відповідно, азоту амінокислот, титрованих розчином тіосульфату натрію:



1 см<sup>3</sup> 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу Cu(RCHNH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub>.

### **Техніка аналізу**

У мірну колбу об'ємом 50 см<sup>3</sup> відберіть 5 см<sup>3</sup> досліджуваного розчину, додайте 3-4 краплі індикатора тимолфталеїну і по краплях розчин натрій гідроксиду концентрацією 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до появи слабкого синього забарвлення. У слаболужний розчин з циліндра при перемішуванні обережно вливають 30 см<sup>3</sup> суспензії ортофосфату міді, доливають вміст колби до мітки дистильованою водою, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

Перенесіть піпеткою 10 см<sup>3</sup> абсолютно прозорого фільтрату в порцелянову склянку або колбу Ерленмейєра, додайте 0,5 см<sup>3</sup> 80%-ї оцтової кислоти (підкислити) і 10 см<sup>3</sup> розчину калій йодату. Після перемішування йод, що виділився, титрують з мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм<sup>3</sup>. Після закінчення титрування до розчину додають 1-2 краплі розчину крохмалю. Про закінчення титрування свідчить зникнення синього забарвлення краплі натрій тіосульфату [40].

При передбачуваному розведенні кількість амінного азоту в 10 см<sup>3</sup> фільтрату отримують шляхом множення на 0,28 маси тіосульфату натрію, використаного для титрування. Це відповідає роздільній здатності 1 см<sup>3</sup> сусла. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

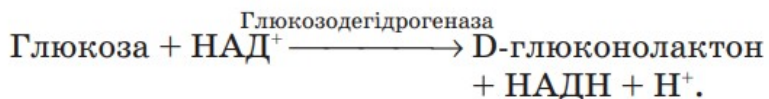
$$X = \frac{a \times 0,28 \times b \times 10 \times 100}{50} \text{ мг в } 100 \text{ см}^3 \text{ сусла, (}$$

де а – розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, який пішов на титрування, см<sup>3</sup>; б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, см<sup>3</sup>

**Визначення концентрації вуглецю.** Згідно поживного середовища для культивування, основним джерелом вуглецю у середовищі є глюкоза.

*Дегідрогеназний метод визначення глюкози*

Ензим глюкозодегідрогеназа каталізує окиснення глюкози до глюконолактону:



Для прискорення перетворення  $\alpha$ -глюкози в  $\beta$ -форму до вищевказаної реакційної середовища додають фермент мутаротазу. Кількість утвореного NADH пропорційна концентрації глюкози в досліджуваному зразку. Швидкість реакції контролюється при 340 нм у кінетичному або фіксованому варіанті часу інкубації [41].

				<b>НОУХТ БТЕК 05.01.21 КР ПЗ</b>					
				<b>Розділ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ</b>					
Змн	Арк.	№	Підпис	<b>Розділ 8. Охорона доквілля</b>		Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.	документа	Хомченко	а					59	4
Перевір.	Розніченко	Ю.М.				<b>Кафедра БТМ</b>			
Корекція	Фр.					59			
Затверд.	Стабніков			<b>Кафедра БТМ</b>					

В.П.

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

Виробництво з синтезу біомаси молочнокислих бактерій для одержання силосувальної закваски включає доферментаційні процеси та власне ферментаційні процеси.

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

На цьому етапі проводиться щоденне та генеральне прибирання приміщень з використанням мийно-дезінфікуючого засобу «Дезактин». Відпрацьований розчин зливають в каналізацію.

CIP-мийки використовуються для здійснення процесу миття обладнання мийно-дезінфікуючим засобом «Дезекон ОМ». Після процесу очищення використаний розчин надходить у збірний резервуар і може бути використаний повторно, а промивні води скидаються в каналізацію. *Даний етап є місцем емісії рідких відходів.*

### **2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу**

Даний етап включає в себе перевірку на відповідність показників якості компонентів поживного середовища, які надійшли на виробництво. У разі невідповідності показникам сировина відбраковується. Пакувальні матеріали від сировини, які залишаються після її використання, є твердими відходами, що зазвичай утворюються на даному етапі. *Даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

### **3. Підготовка посівного матеріалу**

На цьому етапі в інокуляторах відбувається ріст посівного матеріалу. Оскільки ПС використовується для пророщування в наступному ферментері, відходи ПС не враховуються. Газоподібних відходів немає, оскільки при отриманні насіння живильне середовище не аерується.

#### **4. Виробничий біосинтез**

На цьому етапі біологічний агент *Lactobacillus plantarum* AS14 культивується для отримання фактичної біомаси, яка згодом використовується для виробництва силосної закваски. Після завершення біосинтезу культуральна рідина надходить у збірник перед відділенням біомаси, тому рідкі відходи на цьому етапі не розглядаються. Газоподібні відходи не утворюються, тому що в процесі виробничого біосинтезу не відбувається аерації живильного середовища.

### **8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.**

**8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.** Рідкі відходи виробництва утилізуються шляхом біологічного очищення, а саме через резервуари для активного мулу.

Аеротенки – це бетонні або залізобетонні резервуари, крізь які повільно протікає суміш активного мулу і попередньо відстояної стічної рідини. Аеротенки відносяться до гомогенних біореакторів. Типова їх конструкція являє собою глибокий герметичний залізобетонний резервуар прямокутної форми висотою 3-6 м, обладнаний аераційними пристроями і сполучений з відстійником. Аеротенк розділений на 3-4 секції. Активний мул являє собою речовину у вигляді темно-коричневих шарів і складається на 70% з природного поєднання аеробних мікроорганізмів (бактерій і найпростіших) і на 30% з твердих частинок неорганічного походження. Мікроорганізми разом із твердими елементами, до яких вони прикріплені, утворюють зооглію – симбіоз популяцій організмів, вкритих спільною слизовою оболонкою. Активний мул адсорбує і окислює за участю кисню і органічної сечовини, що міститься в стічних водах. Суміш стічної води та

активного мулу безпечно обробляється, щоб підтримувати мул у зваженому стані та подавати кисень.

Басейни встановлюють разом з відстійниками, в яких осідає мул, що накопичується у великій кількості. Частина активного мулу повертається в систему очищення, а надлишок активного мулу, який утворився в результаті заселення мікроорганізмів, після зневоднення досягає мулових полів, а потім транспортується на поля [35].

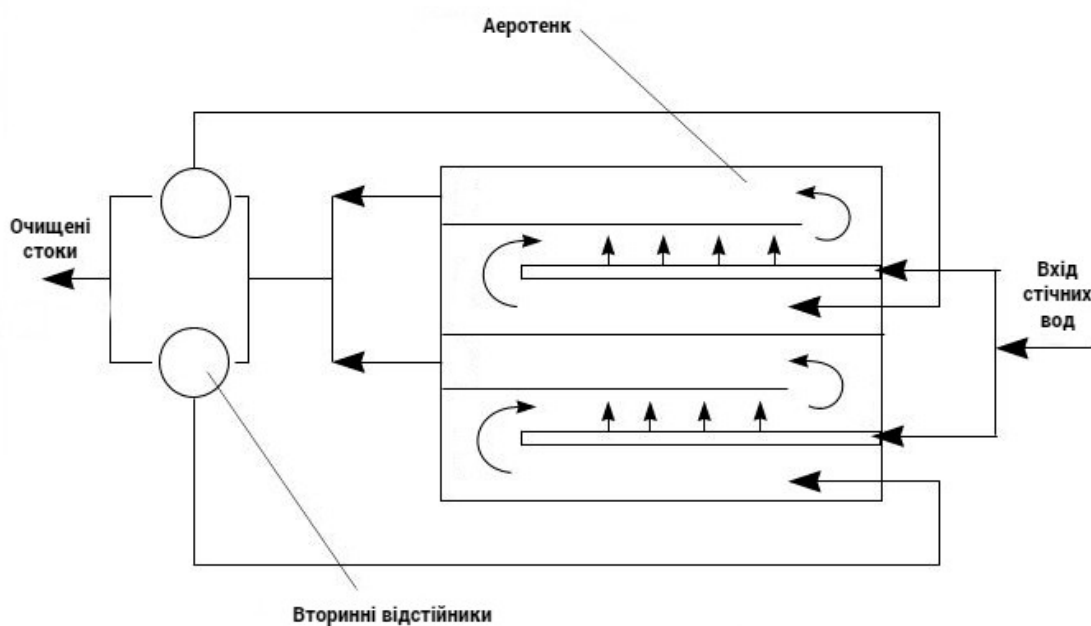


Рис.8.1. Схема роботи аеротенку з відстійниками

### 8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.

Упаковка від миючих засобів і компонентів поживного середовища, що використовувались у приготуванні середовища для культивування, сортується (відокремлюється від поліетилену, полівінілхлориду та паперу) і відправляється на переробку в центри переробки.

### 8.2.3. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.

Під час біосинтезу біомаси *Lactobacillus plantarum* AS14, яка згодом використовується для виробництва силосної закваски, виділяється невелика кількість відходів, які не становлять небезпеки для навколишнього

середовища. Рідкі відходи складаються зі стічних вод, отриманих на етапі санітарної підготовки виробництва. Очищення цієї води пропонується проводити в резервуарах активного мулу. Щоб зменшити кількість стічної води, процес миття відбувається за допомогою промивання СІР. Це дозволяє використовувати менше миючого та дезінфікуючого засобу та повторно використовувати розчин після чищення.

Тверді відходи пропонується утилізувати шляхом відправлення їх до пунктів прийому вторинної сировини для переробки.

Отже, враховуючи використання технологій очищення та нейтралізації домішок у стічних водах перед їх відправленням у центральну систему каналізації, плановане виробництво матиме мінімальний вплив на навколишнє середовище.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кулик М.Ф. Технологія силосування кормів. *Ефективне тваринництво*. 2018; 2: 34-39.
2. Подобед Л.І. Питання заготівлі, зберігання та використання кормів в умовах промислової технології виробництва молока. *Одеса: Друкарський дім*. 2012; 456 с.
3. Божок Л. Мікробні консерванта для кормів. *Аграрний тиждень. Україна*. 2015; 6: 62-64.
4. Нові консерванти і технології кормів / [Кулик М.Ф., Петриченко В.Ф., Засуха Т.В. та ін.] -Вінниця: ПП Видавництво «Тезис», 2004. - 230 с.
5. Єрмакова Л.М. Консерванти у приготуванні силосу. *Пропозиція*. 2014; С. 22-23.
6. Победнов Ю.А. Эффективность и особенности силосования трав с препаратами молочнокислых бактерий. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2008; С. 93-102.
7. Wilkinson J. M., & Rinne M. "Highlights of progress in silage conservation and future perspectives." *Grass and Forage Science* 73.1. 2018: 40-52. doi:10.1111/gfs.12327.
8. Kung Jr. L., Stokes M. R., & Lin C. J. "Silage additives." *Silage science and technology* 42. 2003: 305-360.
9. Силос і бактеріальні закваски [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://propozitsiya.com/ua/silos-i-bakterialni-zakvaski>
10. Стандартизація і управління якістю кормів [Електронний ресурс] //Режим доступу: <http://www.tsatu.edu.ua/rosl/wp-content/uploads/sites/20/pr.8.standartyzacija-i-upravlinnja-jakistju-kormiv>
11. Етапи заготівлі силосу: як заготовити якісний силос. [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://planetaplast.com/etapy-zagotivli-sylosu-yk-zagotovty-yakisny-sylos/>

2. C.-F. Hwang, J. Huang, Z.-Y. Mao. Biomass production of *Lactobacillus plantarum* LP02 isolated from instant feces with potential cholesterol-lowering ability. *African Journal of Biotechnology*. 2011, 10(36): 7010–7020. doi: 10.5897/AJB11.507.
3. C. Coghetto, C. Vasconcelos, G. Brinques, M. Ayub. *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *Braz. J. Microbiol.* 2016, 47(4): 941-948. doi: 10.1016/j.bjm.2016.06.003
14. Технологія пробіотиків : підручник / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог ; НУХТ, 2012. — 318 с.
15. Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. "Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study." *International journal of food microbiology* 144.2. 2010: 270-279.
16. Кравченко О. О. Зберігання та контроль якості кормів : конспект лекцій / О. О. Кравченко. – Миколаїв : МНАУ, 2016. – 112 с.
17. Кукурудза на силос [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://buklib.net/books/34740/>
18. Сироватко К.М. Ефективність використання в раціонах корів кукурудзяного силосу, заготовленого з бактеріальним консервантом. *The scientific heritage*. 2020; 48: 13-18.
19. Чисельність дійних корів в Україні продовжує скорочуватися [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://avm-ua.org/uk/post/ciselnist-dijnih-koriv-v-ukraini-prodovzue-skorocuvatisa>
20. Перехід на весняно – літнє утримання тварин [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.hrytsivrada.gov.ua/news/perekhid-na-vesniano-litnie-utrymannia-tvaryn/>
21. Сироватко К.М. Житньо-люцерновий силос у повнозмішаному раціоні дійних корів. *Годівля тварин та технологія кормів*. 2019; 5(108): 38-48.

22. Пробактил [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.biona.biz/shop/probaktil/>
23. A. Manzoor, J. I. Qazi, I. u. Haq et al. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS14) by developing low cost media cultivation strategy. *Journal of Biological Engineering*. 2017, 11(1):1-10.
24. KEGG [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp>
25. Загальна характеристика мікроорганізмів і способи їх культивування [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php?file=/236895/mod\\_resource/content/1/2.pdf](https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php?file=/236895/mod_resource/content/1/2.pdf)
26. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Обладнання мікробіологічних виробництв – М.: Агропромиздат, 2001. – 398с.
27. The Biostat STR® Generation 3 with Biobrain® Automation Platform [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors/single-use-bioreactors/biostat-str>
- 28.. Державний реєстр дезінфекційних засобів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/e4cf84a5-25fa-46e8-aa14-dbfa240b974a>
29. Дезекон ОМ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>
30. Інструкція з використання дезінфікуючого засобу «VASEPT forte» [Електронний ресурс]. Режим доступу: [file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/Інструкція%20з%20використання%20VASEPT%20forte%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/Інструкція%20з%20використання%20VASEPT%20forte%20(2).pdf)
31. Дезекон [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/product/dezekon-unvcpd>

32. Славин-Дельта [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.deltasept.com/disinfection/aldegid/aldegidy\\_13.html](http://www.deltasept.com/disinfection/aldegid/aldegidy_13.html)
33. Дезактін порошок д/дезінфек. по 20 г у пак. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/Дезактин/1013686/>
34. Санікон [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanikon-interdez-kiev>
35. Очищення стічних вод в Україні [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://eprints.zu.edu.ua/32367/1/УДК%2057.pdf>
36. **Біологія клітин** [Електронний ресурс]. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. Форм навчання / уклад.: В.О. Красінько, І.М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с.
37. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.
38. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: Лаборатор. Практикум. – К.: НУХТ, 2009. – 302 с.
39. A. Manzoor, J. I. Qazi, I. u. Haq et al. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS14) by developing low cost media cultivation strategy. *Journal of Biological Engineering*. 2017, 11(1):1-10. doi: 10.1186/s13036-017-0059-2.
40. Визначення вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>
41. Традиційні та біосенсорні методи визначення моно5 і дисахаридів [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://biotechnology.kiev.ua/storage/2010/3\\_2010/Peshkova%233\\_2010.pdf](http://biotechnology.kiev.ua/storage/2010/3_2010/Peshkova%233_2010.pdf)