

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)

\_\_\_\_\_  
(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК  
(прізвище та ініціали)

«\_\_\_» лютого 2024 р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_  
(підпис) Віктор СТАБНІКОВ  
(прізвище та ініціали)

«\_\_\_» лютого 2024 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: «Культивування *Lactobacillus bulgaricus* з метою використання у  
складі заквашувальних композицій»

Виконав: здобувач V курсу, групи 1

\_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) МИЩЕНКО Аліна Євгенівна  
(підпис)

Керівник БЕЛЕМЕЦЬ Тетяна Олександрівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) \_\_\_\_\_  
(підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(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) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2024 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

“ 30 ” жовтня 2023 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МИЩЕНКО Аліни Євгенівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Lactobacillus bulgaricus* з метою використання у складі заквашувальних композицій»

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент *Lactobacillus bulgaricus*; цільовий продукт: закваска молочнокисла; геометричний об'єм ферментеру 0,2м<sup>3</sup>; коефіцієнт заповнення: 0,65

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

Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема культивування *Lactobacillus bulgaricus* - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема культивування *Lactobacillus bulgaricus* - 1 аркуш формату А1

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>30.10.2023-09.11.2023</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>10.11.2023-31.11.2023</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>01.12.2023-06.12.2023</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>07.12.2023-12.12.2023</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>13.12.2023-26.12.2023</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>28.12.2023-02.01.2024</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>03.01.2024-10.01.2024</i>	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>11.01.2024-19.01.2024</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>19.01.2024-22.01.2024</i>	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

Аліна МИЩЕНКО  
(ім'я та прізвище)

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

Тетяна БЕЛЕМЕЦЬ  
(ім'я та прізвище)

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту .....	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування .....	11
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента .....	19
2.3. Таксономічний статус біологічного агента .....	23
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування .....	25
3.1. Потреба у цільовому продукті .....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва .....	28
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів .....	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	30
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту .....	32
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента .....	32
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт .....	34
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	37
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера .....	37
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря....	39
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів .....	40
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища .....	41
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	48
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми .....	50
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва .....	59
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів .....	59
8.2. Мікробіологічний контроль .....	61
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	67

8.3.1. Концентрація біомаси.....	67
8.3.2. Концентрація цільового продукту .....	67
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту .....	68
РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля.....	72
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих,рідких та газоподібних відходів.....	72
9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	75
9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів .....	76
9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	80
9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів .....	83
9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів.....	85
ЛІТЕРАТУРА .....	88

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу культури *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081, для виробництва молочнокислих заквасок.

Завдання на розробку технологічної та апаратурної схем біосинтезу культури *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 для виробництва молочнокислих заквасок є важливою ініціативою в галузі харчової промисловості. З метою високоякісного та сталого виробництва молочнокислих продуктів, була розрахована потужність виробництва, яка становить 20 501 тон щорічно (еквівалент 3845,3 літрів культуральної рідини). Технологія виробництва заквашувальної композиції включає в себе комплекс допоміжних робіт та технологічний процес.

Допоміжні роботи охоплюють підготовку стерильного аераційного повітря, приготування розчинів соляної кислоти та натрію гідроксиду для стерилізації середовища, а також приготування резервного розчину кальцію хлориду та поживних середовищ. Технологічний процес складається з чотирьох стадій вирощування посівного матеріалу у різних об'ємних реакторах та біосинтезу у ферментері об'ємом 20 м<sup>3</sup>. Процес включає змінні коефіцієнти заповнення ферментера для оптимізації умов.

Окрім цього, розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. Вона включає методики контролю концентрації біомаси, цільового продукту, амонійного азоту.

Дипломний проєкт обсягом 94 сторінки включає в себе 15 таблиць та 8 рисунків. Він складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури з 71 джерела, а також містить технологічну і апаратурну схеми у форматі A1 на 2 аркушах.

**Ключові слова:** закваска, *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081, молочнокисле, йогурт, дисбактеріоз.

## ВСТУП

Корисні властивості кисломолочних продуктів широко відомі в усьому світі. Зокрема, вони позитивно впливають на систему травлення, кровообігу та організм в цілому.

Кисломолочні продукти класифікуються за типом бактерій, які додаються в процесі сквашування. Це продукти молочнокислого бродіння та змішаного молочнокислого і спиртового бродіння. Молочнокислі продукти виробляються, коли лактоза розщеплюється бактеріями в молоці. В результаті утворюється молочна кислота, яка сприяє коагуляції білків казеїну. Отриманий напій на 60% краще засвоюється організмом, ніж звичайне молоко.

Продукт, отриманий шляхом молочнокислого бродіння, засвоюється краще, ніж чисте молоко: 32% проти 90%. Крім того, вони містять більше амінокислот, вітамінів і мікроелементів (вітаміни А, В, D, аргінін, лізин, фосфор, калій, кальцій, цинк та ін.).

Мета кваліфікаційної роботи – проектування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) заквашувальної композиції штамом *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081.

Новизною даної роботи є використання біологічного агента бактеріального штаму *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 для промислового виробництва життєздатних клітин *Lactobacillus bulgaricus* з метою подальшого застосування в складі йогуртових заквасок.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Вступ</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Мищенко А.Є.</i>					7	94
<i>Перевір.</i>		<i>Белемець Т.О.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

## РОЗДІЛ 1.

### Характеристика цільового продукту

Закваску для молочних продуктів одержують з різних джерел, включаючи сичуг трав'яних (сичужний фермент), грибові культури (кепірний грибок), бактерії (болгарська паличка, ацидофільна паличка, швейцарська паличка, молочнокислий термофільний стрептокок, молочнокисла паличка Лейхмана та інші) і навіть із уже заквашених продуктів, таких як сметана. Крім того, існують нетрадиційні джерела закваски, такі як внутрішня частина кори молодої шелюги верби, пророщена пшениця, корка свіжоспеченого житнього хліба, срібні предмети, шматочок цегельного зеленого калмицького чаю .

Зокрема, болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*) відома своїми корисними властивостями у заквашеному молоці та була досліджена І. І. Мечниковим. Продукт, заквашений болгарською паличкою, одержав назву «мечниківський кисляк».

Закваски доступні у різних формах, включаючи рідку та таблеткову. Для приготування закваски, таблетку чистих культур мікроорганізмів розчиняють в прокип'яченому і остудженому молоці при температурі 40-45 °С і залишають протягом 1,5-2 годин в теплом місці. Після цього молоко перемішують і залишають ферментуватися протягом 18-20 годин. Утворений згусток може бути використаний як готова закваска.

					НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Мищенко А.Є.				РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Белемець Т.О.						8	94
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Залежно від кількості мікроорганізмів, закваски поділяються на звичайні сухі закваски (одиниці мільярдів клітин в 1 г) і бактеріальні препарати (не менше 150 млрд клітин в 1 г). Також існують рідкі закваски, які містять чисті культури молочнокислих бактерій в молоці.

Бактеріальні культури для виробництва заквасок виготовляються у спеціалізованих лабораторіях. Молочнокислі бактерії і дріжджі надсилаються до цих лабораторій у вигляді чистих культур у формі рідких або сухих заквасок, або окремих штамів. Якість закваски визначається чистотою культури (відсутність небажаних мікроорганізмів), її здатністю до утворення кислоти, аромату, та нагромадження антибіотиків [1]. Вибір культур впливає на смак, консистенцію та інші якості готового продукту.

У нашому випадку, кінцевим продуктом є бактеріальна закваска з болгарською паличкою. Зовнішні характеристики і фізико-хімічні властивості продукції відповідають вимогам діючого Нормативно-технічного документа (НТД) та специфіки виробництва:

- Смак та запах: кисломолочний, чистий, без сторонніх запахів та присмаків.
- Консистенція: однорідна, ніжна, з порушеним або непорушеним згустком, у міру щільна, без газоутворення.
- Колір: від білого до світло-жовтого [2].

Упаковка, маркування, транспортування, зберігання та термін придатності продукту також регулюються відповідними нормативними вимогами:

- Форма випуску: флакон з масою вмісту 0,5 г.
- Маркування повинне відповідати національному законодавству, де це прийнятно, і містити інформацію про назву продукту, вид продукту або бактеріальний склад, вид продукту, вміст, ім'я та адресу виробника, термін придатності, умови зберігання та іншу обов'язкову інформацію [2].

Отже, весь цей процес регулюється нормативами і стандартами для забезпечення якості та безпеки продукції.

а) **Сфера застосування:** Бактеріальна закваска з болгарською паличкою використовується у харчовій промисловості для виробництва йогурту та інших молочних продуктів.

б) **Інструкції по використанню:**

- Тривалість сквашування: 18-20 годин.
- Температура інкубації: від +2 до +6°C протягом 9 місяців або від -16 до -20°C протягом 12 місяців.

в) **Склад:**

- Вид бактерій: болгарська паличка (*Lactobacillus bulgaricus*).
- Вид культури: бактеріальна закваска.

г) **Сертифікат аналізу та сертифікат відповідності або аналогічна інформація:** Бактеріальна закваска відповідає всім вимогам ДСТУ.

• **Класифікація:**

- Фізичний стан і спосіб виробництва: суха - культури заквасочних мікроорганізмів, виготовлені за допомогою ліофільної або розпилювальної сушки.
- Число мікроорганізмів: багатоштамова закваска, що складається з декількох штамів заквасочних мікроорганізмів, таких як *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* у співвідношенні 1,0:1,0:1,0.
- Температурні інтервали розвитку видів: мезофільно-термофільні закваски, охоплюють як мезофільні, так і термофільні заквасочні культури.
- **Основне призначення:** Бактеріальна закваска з болгарською паличкою використовується як харчова домішка та має позитивний вплив на організм людини, зокрема сприяє поліпшенню мікрофлори кишківника, стимулює функції травної та імунної системи, сприяє виведенню шкідливих продуктів обміну речовин.

## РОЗДІЛ 2.

### Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

*Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 був вибраний як біологічний агент для даного дослідження з ряду причин. По-перше, цей вид бактерій є важливим компонентом у виробництві йогурту, відіграючи ключову роль у процесі ферментації молока [6]. Він є основою багатьох промислових заквасок і визнаний своєю здатністю до перетворення лактози в молочну кислоту, що сприяє згортанню білків молока і формуванню характерного смаку йогурту [7].

По-друге, *Lactobacillus bulgaricus* є пробіотиком, тобто бактерією, яка, за наявності в достатній кількості, сприяє здоров'ю людини [8]. Він покращує баланс мікрофлори кишківника, сприяє кращому засвоєнню поживних речовин.

По-третє, варто відзначити, що *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 відноситься до мезофільних бактерій, що ростуть при помірних температурах (від 20 до 45 °C), і це робить його особливо підходящим для використання в заквасках [9].

					НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мищенко А.Є.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.					11	94
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

На основі проведеного аналізу, *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 має ряд переваг у порівнянні з іншими мікроорганізмами, які можуть бути використані в заквашувальних композиціях. До них належать здатність до надсинтезу молочної кислоти, можливість культивування на простих та відносно дешевих середовищах, висока стійкість до контамінації, швидкий ріст та хороша адаптованість до різних умов середовища [10].

Крім того, *Lactobacillus bulgaricus* DSM 200 81 є грам-позитивною бактерією, що відрізняється високою толерантністю до кислого середовища і солоних розчинів, що робить його стійким до викликів, що можуть виникнути під час виробництва йогурту [11].

Отже, на основі зазначених характеристик *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 був обраний як біологічний агент для дослідження в цій дипломній роботі. Цей вибір обумовлений перевагами, які надає *Lactobacillus bulgaricus* у контексті виробництва заквашувальних композицій, і оцінкою його потенціалу відповідно до мети цього дослідження.

### **Визначення оптимальних умов культивування *Lactobacillus bulgaricus***

*Lactobacillus bulgaricus* – це один з ключових видів бактерій, які використовуються у виробництві йогурту. Ці бактерії відіграють важливу роль у ферментації молока, створюючи характерний смак і текстуру йогурту. Оптимальні умови для культивування *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 включають певні температурні режими, відповідний рівень кислотності (рН) і наявність певних живильних речовин.

Температура є одним з найважливіших факторів для росту *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081. Найкращі результати зазвичай досягаються при температурі від 42 до 45° за Цельсієм [9]. Це температурний діапазон, в якому бактерії найактивніше розмножуються і ферментують молоко.

Кислотність середовища також впливає на ріст *Lactobacillus bulgaricus*. Більшість штамів цих бактерій виживають і активно функціонують при рН від 4.5 до 5.5. Якщо рН занадто високий або низький, це може призвести до зниження активності бактерій і їх спроможності до ферментації молока [12].

Поживні речовини, які потрібні для росту *Lactobacillus bulgaricus*, включають цукри, амінокислоти і вітаміни, зокрема групу В. Ці речовини зазвичай містяться у достатній кількості в молоці, що використовується для виробництва йогурту [13].

Оптимальні умови для культивування можуть змінюватися залежно від конкретного штаму *Lactobacillus bulgaricus*, а також від специфічних умов виробництва. Тому важливо проводити ретельне тестування і контроль культури, щоб забезпечити її стабільність і продуктивність в умовах виробництва.

*Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081, як і інші види роду *Lactobacillus*, є мікроаерофільними організмами, що здатні переживати як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Однак, вони переважно ферментують цукри анаеробним шляхом, навіть при наявності кисню. Тому, для культивування *Lactobacillus bulgaricus*, зазвичай використовують умови з обмеженим доступом кисню, що схоже на умови, які вони знаходять в природному середовищі – молоці [14].

Світло може вплинути на ріст *Lactobacillus bulgaricus*, але вони можуть вижити як в умовах освітлення, так і в темряві. Тим не менш, для зберігання культур вони зазвичай розміщуються в темному місці [15].

При виробництві заквашувальних композицій важливо забезпечити чистоту культури *Lactobacillus bulgaricus*. Будь-яка контамінація іншими мікроорганізмами може вплинути на якість закваски і кінцевого продукту. Тому процес культивування повинен включати жорсткі міри контролю для запобігання контамінації [1].

Ми вже знаємо, що *Lactobacillus bulgaricus* є термофільними мікроорганізмами, тобто вони віддають перевагу теплому середовищу. Це означає, що вони мають здатність виживати і розмножуватися при високих температурах, що є нормою при виробництві йогурту. Однак важливо контролювати температуру протягом всього процесу культивування, щоб забезпечити стабільність і якість культури.

Враховуючи всі ці фактори, можна встановити оптимальні умови для культивування *Lactobacillus bulgaricus*. Проте необхідно провести додаткові дослідження, щоб краще зрозуміти вплив різних факторів на ріст і активність цих бактерій у виробництві йогурту.

Наприклад, при виробництві йогурту, де швидкість процесу ферментації

важлива, можливо, знадобиться вища температура вище 45° для прискорення росту бактерій. Втім, це може призвести до зниження виживання культури на пізніших стадіях виробництва .

Також варто зазначити, що під час виробництва складних заквашувальних композицій може бути необхідно змінювати умови культивування для досягнення потрібного балансу між різними видами бактерій [5].

Наостанок, для ефективного виробництва йогурту або інших молочних продуктів на основі *Lactobacillus bulgaricus*, важливо постійно контролювати умови культивування та регулярно проводити аналіз якості для забезпечення стабільності та якості заквашувальних композицій [19, 20].

У цьому контексті, дотримання оптимальних умов для культивування *Lactobacillus bulgaricus* не тільки підвищує ефективність процесу виробництва, але і гарантує високу якість кінцевого продукту про що кажуть ці три джерела [18].

Відносно способу проведення біосинтезу, глибинне культивування є найкращим варіантом для *Lactobacillus bulgaricus*. Поверхнєве культивування, хоча і використовується в деяких випадках, має ряд недоліків, які включають обмежений об'єм середовища та ризик контамінації. Натомість, глибинне культивування дозволяє більш ефективно контролювати умови середовища і забезпечує високу продуктивність [19].

Культивування *Lactobacillus bulgaricus* зазвичай вимагає стерильних умов, оскільки ці бактерії конкурують з іншими мікроорганізмами за ресурси. Однак, оскільки *Lactobacillus bulgaricus* є термофільними і кислотостійкими організмами, вони здатні виживати в умовах, які непридатні для більшості інших мікроорганізмів. Таким чином, культивування цих бактерій може проводитись за високих температур (50+ °C) і низького рН (4,5 – 5,5), що складає умови, небезпечні для більшості контамінуючих мікроорганізмів [20].

Оптимальні умови для культивування *Lactobacillus bulgaricus* зазвичай включають температуру від 37°C до 43°C і рН від 5,5 до 6,5. Ці бактерії можуть рости в широкому діапазоні рН, але найбільш активний ріст спостерігається при рН в районі 6,0. Що стосується температури, то *Lactobacillus bulgaricus* є термофільними

бактеріями, тому вони найбільш ефективно ростуть при високих температурах, близьких до температури тіла людини. Однак, вони можуть переживати і при більш низьких температурах, хоча і з меншою швидкістю росту [16].

Тривалість культивування *Lactobacillus bulgaricus* може варіюватися в залежності від конкретних умов і цілей. Зазвичай, для виробництва заквасок для йогурту або інших молочних продуктів, процес культивування триває від 12 до 16 годин [17].

Враховуючи ці фактори, для культивування *Lactobacillus bulgaricus* було вибрано умови глибинного культивування в стерильних умовах, при температурі 42°C, рН 6,0, і тривалості процесу 15 годин.

### **Розрахунок етапів підготовки посівного матеріалу для культивування (Підготовка посівного матеріалу)**

Відповідно до завдання на проектування, нам дано ферментер на 200 літрів, та коефіцієнт заповнення 0,65. Для визначення робочого об'єму ферментера, необхідно використати формулу:

$$V_{\text{роб.}} = V_{\text{г.ф.}} \times K_{\text{зап.}}$$

В нашому випадку  $V_{\text{г.ф.}}$  (геометричний об'єм ферментера) становить 200 літрів, а  $K_{\text{зап.}}$  (коефіцієнт заповнення) – 0,65.

$$V_{\text{роб.}} = 200 \times 0,65 = 130 \text{ літрів}$$

Доза посівного матеріалу, як правило, становить 10 % від об'єму поживного середовища (робочого об'єму ферментера) [21]. Отже, для одержання 130 літрів культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 130 \times 0,1 = 13 \text{ літрів посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 20 літрів з коефіцієнтом заповнення 0,65.

Для засіву посівного апарату (одержання 13 літрів культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 13 \times 0,1 = 1,3 \text{ літри посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом 2 літри з коефіцієнтом заповнення 0,65.

1,3 літри (1300 мл) культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 1300 \times 0,1 = 130 \text{ мл посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 0,2 літра (200 мл) з коефіцієнтом заповнення 0,65.

Для одержання 130 мл культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.4}} = 130 \times 0,1 = 13 \text{ мл посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати культивуванням бактерій в інокуляторі об'ємом 0,02 літри (20 мл).

Для отримання 13 мл культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.5}} = 13 \times 0,1 = 1,3 \text{ мл посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 200 літрів з коефіцієнтом заповнення 0,65 буде проходити у п'ять етапів.

### **Склад та підготовка поживного середовища для культивування**

Поживне середовище для культивування *Lactobacillus bulgaricus* включає наступні компоненти (у г/л):

- М'ясний пептон: 10.0
- Лактоза: 15.0
- Екстракт дріжджів: 10.0
- Цитрат амонію: 2.0
- Аскорбінова кислота: 0.05
- Ацетат натрію  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ : 5.0
- Гідроортофосфат калію  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 2.0
- Сульфат магнію  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ : 0.2
- Вода дистильована (до 1 л)

Згідно з літературними джерелами, цей склад поживного середовища забезпечує оптимальні умови для росту *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 [18].

Для культивування *Lactobacillus bulgaricus* часто використовують середовище

MRS (де Man, Rogosa та Sharpe). Це середовище було розроблено спеціально для культивування лактобацил, включаючи *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081.

MRS середовище містить наступні основні компоненти:

1. Пептони: вони служать джерелом амінокислот і білка.
2. М'ясний екстракт та екстракт дріжджів: ці інгредієнти служать джерелами вітамінів.
3. Полісахариди: вони забезпечують джерело вуглеводів для енергії та росту.
4. Ацетати: вони забезпечують необхідне середовище для росту лактобацил.
5. Фосфати: вони служать джерелами фосфору та допомагають утримувати рівновагу рН середовища.

В деяких випадках до середовища можуть бути додані спеціальні компоненти, залежно від конкретного штаму *Lactobacillus bulgaricus*.

Після внесення в середовище MRS, культура *Lactobacillus bulgaricus* інкубується при відповідних температурах, які зазвичай становлять близько 43° С, але можуть варіюватися в залежності від конкретного штаму.

### **Методи приготування та стерилізації поживного середовища для інокуляції та біосинтезу**

Приготування поживного середовища задля культивування *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 включає кілька ключових етапів, які були обгрунтовані у попередньому підрозділі. Для початку, водорозчинні джерела вуглецю, наприклад лактоза, розчиняють у дистильованій воді [19, 20]. Для цього можна використовувати окремий збірник.

М'ясний пептон та екстракт дріжджів, які служать джерелами азоту, також розчиняються у воді. Цитрат амонію, який використовується як джерело азоту і фосфату, додають до розчину.

Водорозчинні мінеральні солі, такі як ацетат натрію, дигідрофосфат калію, гідрофосфат калію та сульфат магнію, також додаються до розчину. Ці компоненти забезпечують важливі мікроелементи, які необхідні для росту бактерій.

Аскорбінова кислота є важливими регулятором рН, додається до розчину. Вона

допомагає забезпечити оптимальний рівень кислотності, який є важливим для росту *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081.

Після того, як всі компоненти розчинені, середовище нагрівають за допомогою глухої пари або гарячої води, поданої у рубашку апарату [22]. Це дозволяє розчину рівномірно нагрітися, що є важливим для забезпечення оптимальних умов для росту бактерій.

Після нагрівання середовище стерилізують, що дозволяє усунути будь-які потенційні контамінанти. Цей процес включає автоклавування або фільтрацію:

1. Розподіляють компоненти поживного середовища на окремі групи згідно з їх термолабільністю. Враховують, що розчинення, суспендування та розварювання компонентів поживного середовища мають проводитися в окремих ємностях.

2. Стерилізують кожен групу окремо. Термостабільні компоненти, такі як м'ясний пептон, екстракт дріжджів, цитрат амонію, ацетат натрію, дигідрофосфат калію, гідрофосфат калію та сульфат магнію можна стерилізувати при високій температурі (131 °C при 0,15 МПа) протягом 40 – 60 хв.

3. Стерилізують термолабільні компоненти окремо. Це включає лактозу та аскорбінову кислоту. Ці компоненти можна стерилізувати при нижчій температурі (112 – 115 °C при 0,05 МПа) протягом 20 – 30 хв.

4. Особливу увагу потребує стерилізація води. Вона повинна бути дистильована та стерилізована до її використання в поживному середовищі.

5. Об'єднують стерилізовані компоненти в певному порядку, зазвичай від найстійкіших до найменш стійких, щоб уникнути перегрівання та знищення термолабільних компонентів.

6. Корекція рН середовища. Тож, після охолодження до внесення посівного матеріалу рН потрібно довести до оптимального рівня. Для цього використовують відповідні розчини кислоти (зазвичай 6 % соляна кислота) і лугу (зазвичай розчин аміаку чи 6 % гідроксид натрію).

7. Процес стерилізації повинен бути контрольованим. Використовують відповідні показники та інструменти для вимірювання та контролю температури, тиску та часу стерилізації.

8. Після стерилізації відстежують стан поживного середовища. Переконаються, що воно не містить небажані частинки або осад, і що всі компоненти добре змішані.

9. Зберігають стерилізоване поживне середовище в стерильних умовах. Це важливо, щоб запобігти контамінації після стерилізації.

10. Введення посівного матеріалу. Після відповідної підготовки поживного середовища, вносять в нього біологічний агент для культивування.

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

*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (лат.), болгарська паличка - підвид *Lactobacillus delbrueckii*, одна з двох бактерій, що використовуються для виробництва йогурту. Раніше бактерія була відома як вид *Lactobacillus bulgaricus*, названа на честь Болгарії, в якій була вперше відкрита та використана.

*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, відомий як *L. bulgaricus*, є бактерією, що відноситься до роду *Lactobacillus* у сімействі *Lactobacillaceae*. Ця бактерія є важливим складником стартер-культур для виробництва багатьох видів кисломолочних продуктів, включаючи йогурт [23]. Її таксономічний статус було встановлено на основі філогенетичної систематики, і вона відноситься до групи бактерій, що використовують молочний цукор (лактозу) для виробництва молочної кислоти [24].

Штам *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081, який ми використовуємо в цьому дослідженні, не є мутантним або генно – модифікованим. Це штам, що використовується в традиційному виробництві йогурту, і його було вибрано на основі його високої кислотоутворюючої активності і відмінних органолептичних властивостей [25].

*L. bulgaricus* культивується в середовищі MRS бульйону, який включає в себе цукри, амінокислоти, вітаміни та мінерали, необхідні для росту і метаболізму цього організму [25].

В процесі метаболізму лактози, *L. bulgaricus* використовує фермент  $\beta$ -

галактозидазу для розщеплення лактози на глюкозу та галактозу. Глюкоза потім використовується в гліколітичному шляху для виробництва енергії та молочної кислоти, основного продукту його метаболізму [30, 31]. Гліколіз, також відомий як шлях Емпа, є основним шляхом катаболізму глюкози в клітинах *L. bulgaricus*, і це є ключовим фактором виробництва молочної кислоти [28].

Галактоза, інший продукт розщеплення лактози, також може бути використана для додаткового виробництва енергії та молочної кислоти через шлях Лелуара. Це, в свою чергу, веде до накопичення молочної кислоти в середовищі культивування, що є важливим фактором у процесі заквашування молока та виробництва йогурту.

Основними ферментами, задіяними в катаболізмі глюкози та галактози в *L. bulgaricus*, є гексокіназа, фосфоглюкоізомераза, фосфофруктокіназа та піруваткіназа, що входять до складу гліколітичного шляху, а також  $\beta$ -галактозидаза, яка бере участь у розщепленні лактози [34, 35].

Схема біосинтезу цільового продукту, молочної кислоти, включає перетворення глюкози та галактози в піруват через гліколітичний шлях та шлях Лелуара відповідно, а потім перетворення пірувату в молочну кислоту за допомогою ферменту лактатдегідрогенази [35].

*Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 – це специфічний штам варіанта бактерій *Lactobacillus bulgaricus*, який показує особливу чутливість при низьких температурах.

#### Морфологічні властивості:

- Штам має форму стрижня.
- Він нерухомий.
- Він не має спор.
- Позитивна реакція на фарбування за Грамом.
- Він має метахроматичні гранули.

#### Фізіологічні властивості:

- Штам не має властивості редукції нітратів.
- Він не синтезує індол.
- Він не здатний розплавити желатину.

- Негативна каталазна реакція.
- Не розщеплює крохмаль.
- Факультативно анаеробний організм.
- Виробляє D(-) молочну кислоту з глюкози через гомолактичну ферментацію без виділення газів.
- Не виробляє CO<sub>2</sub> з малатів.
- Не може розмножуватися або слабо розмножується при 25° С на МРС середовищі. Однак він може інтенсивно розмножуватися при 45° С.
- Може або не може розкласти різні вуглеводи. Наприклад, здатний розкласти глюкозу, лактозу, фруктозу, манозу, але не може розкласти галактозу, сахарозу, мальтозу, целобіозу та інші.

Штам *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081, ізольований у дослідженні, показує незначне збільшення вмісту молочної кислоти при зберіганні при низькій температурі. Це важливо, оскільки під час холодного зберігання використання штаму *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 дозволяє підтримувати властивий кислий смак кисломолочних продуктів.

#### Приклади використання:

1. У приготуванні йогурту, *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 використовується як стартер. Він дозволяє підтримувати смак продукту під час зберігання та дистрибуції.

2. У продукті з фруктами, використання *Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081 дозволяє знизити швидкість збільшення вмісту молочної кислоти при зберіганні при низькій температурі.

3. Штам також може використовуватися у комбінації з іншими штамми, наприклад *Lactobacillus acidophilus*, для створення кисломолочних напоїв.

### **Морфологічні та культурні властивості *Lactobacillus bulgaricus* (морфолого-культуральні ознаки)**

*Lactobacillus bulgaricus* є грам-позитивною, нерухомою паличковидною бактерією. Вона має розміри приблизно 0.8-0.9 мкм в ширину і 2-3 мкм в довжину

[23].

За умов росту на середовищі MRS-агар, колонії *L. bulgaricus* досягають діаметра в 1-2 мм за 72 години при 37°C. Колонії щільні, прозорі, з гладкими краями. Вони мають білу або біло-сірувату кольорову гаму [24].

За умов росту в глибинних умовах на середовищі MRS-бульйон, *L. bulgaricus* утворює турбідну культуру, що свідчить про активний ріст бактерій [25].

*L. bulgaricus* не росте на середовищі з глюкозою або фруктозою як основним джерелом вуглецю. Однак, він здатний рости на середовищі з лактозою, що робить його ідеальним кандидатом для використання в заквашувальних культурах для виробництва молочних продуктів [25].

Також, *L. bulgaricus* вимагає середовища з певним рівнем кислотності (рН 5, 4 – 6, 7) для оптимального росту [24].

Вивчення морфологічних та культурних властивостей *L. Bulgaricus* допомагає розуміти його способи пристосування до різних умов середовища та розробляти ефективні стратегії його культивування.

### **Фізіологічні та біохімічні особливості *Lactobacillus bulgaricus***

*Lactobacillus bulgaricus* є бактерією, яка відома своєю спроможністю до перетворення лактози в молочну кислоту, що є ключовим процесом при виробництві кисломолочних продуктів [25]. Додатково, *L. bulgaricus* відіграє важливу роль у виробництві специфічного аромату й смаку йогурту, використовуючи свої різноманітні ферменти [34].

*Lactobacillus bulgaricus* має кілька особливостей, які роблять його ідеальним для використання в промисловості. Однією з них є те, що він володіє термофільними властивостями, що означає, що він може рости при високих температурах, які часто використовуються в процесах виробництва йогурту [35].

*L. bulgaricus* має високу стійкість до кислотного середовища шлунка і жовчі, що робить його потенційно пробіотичним організмом. Крім того, він має здатність до адгезії до епітелію шлунково – кишкового тракту, що є важливою властивістю для пробіотиків [30].

*L. bulgaricus* також відомий своєю спроможністю виробляти бактеріоцини,

білкові речовини, які мають антимікробну активність проти інших мікроорганізмів, що може мати важливе значення для здоров'я людини та безпеки харчових продуктів [28].

### **Одержання *Lactobacillus bulgaricus***

Стосовно культивування *Lactobacillus bulgaricus* то він є термофільною бактерією, що вимагає високих температур для оптимального росту [36]. Він зазвичай культивується в спеціальних середовищах, таких як MRS (де Man, Rogosa and Sharpe) бульйон, при температурі 37 – 45°C [37].

Однак, культивування *L. bulgaricus* може бути викликом через його вимогливість до умов середовища. Наприклад, ця бактерія вимагає високого вмісту цукрів і певного рівня кислотності для оптимального росту. Крім того, вона може бути чутливою до стресових умов, таких як висока солоність або низька температура, що може обмежувати її використання в деяких продуктах або процесах [41, 43].

Враховуючи ці виклики, важливо вивчити більше про фактори, які впливають на ріст і активність *L. bulgaricus*, щоб розробити ефективні стратегії його культивування і використання в харчовій промисловості.

### **2.3. Таксономічний статус біологічного агента**

*Lactobacillus bulgaricus*, відомий також як *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, є видом бактерій, що належить до роду *Lactobacillus* в межах сімейства *Lactobacillaceae* [32]. Він входить до групи *homofermentative lactic acid bacteria* (LAB), що може проводити гомоферментативну лактатну ферментацію [25].

*Lactobacillus* є родом бактерій, який відноситься до відділу *Firmicutes*. Вони є важливою частиною нормальної мікрофлори багатьох організмів, включаючи людей. Ось базова таксономічна класифікація *Lactobacillus*:

Домен: *Bacteria* – Бактерії

Царство: *Eubacteria* – Суббактерії

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Ряд: *Lactobacillales*

Родина: *Lactobacillaceae*

Рід: *Lactobacillus*

Цей рід містить більше 200 визнаних видів. Однак, одним з найбільш вивчених та комерційно важливих видів є *Lactobacillus bulgaricus*, який використовується в основному у виробництві йогурту та інших заквашених молочних продуктів.

*Lactobacillus bulgaricus* був вперше ізольований в Болгарії на початку ХХ століття. Спочатку його визначили як *Bacillus bulgaricus*, пізніше його було перекласифіковано до роду *Lactobacillus* [33].

## РОЗДІЛ 3.

### Техніко-економічне обґрунтування

#### 3.1. Потреба у цільовому продукті

*Lactobacillus bulgaricus* є гомоферментативною молочнокислою бактерією яка відіграє важливе значення при виробництві йогурту. Для виробництва йогурту зазвичай використовують закваски молочнокислих бактерій: *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* subs *bulgaricus*. Комбінована дія даних молочнокислих бактерій призводить до утворення великої кількості ароматичних летких речовин і нелетких метаболітів, відповідальних за чудові органолептичні якості йогурту [2].

Йогурт це кисломолочний продукт отриманий в результаті сквашування молока, але зважаючи на велику кількість поживних речовин які містить даний продукт він підвищує ситість та покращує глікемічний контроль [3], наявні дослідження демонструють що вживання йогурту може покращити переносимість лактози що є особливо важливим для людей з її непереносимістю [4]. Враховуючи корисні властивості даного продукту, виробництво йогурту з кожним роком збільшується, згідно даних Державної служби статистики України [5], дані наведено в табл. 3.1.

					НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мищенко А.Є.			РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.					25	94
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 3.1

## Кількість виробленого йогурту за роками

Найменування продукції за Номенклатурою продукції промисловості (НПП)	2017 рік, т	2018 рік, т	2019 рік, т	2020 рік, т	2021 рік, т
Йогурт неароматизований, без додавання фруктів, горіхів, какао та інших наповнювачів	10 599	12 308	12 341,5	12 381,2	13 476
Йогурт рідкий та сквашене молоко ароматизовані (молоко і вершки коагульовані, йогурт, кефір, сметана та інші ферментовані продукти, ароматизовані або з додаванням фруктів, горіхів або какао)	116 277	125 928	135 790,6	138 758,5	140 505,1

Підприємства не розголошують інформацію по кількісному та якісному складу заквасок, так як поєднання різних мікроорганізмів призводить до отримання індивідуальних органолептичних характеристик продукту, тому враховуючи цей факт розглядатимемо характеристики наявних на сьогодні в вільному продажі йогуртових заквасок, за допомогою яких можна приготувати йогурт в домашніх умовах, компонентний склад даних заквасок наведено в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

## Компонентний склад заквасок для виробництва йогурту

Назва товару	Склад	Виробник
Йогурт VIVO	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	ТОВ ВІВО-АКТИВ, Україна [14]
Пробіо Йогурт VIVO	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> (2штами), <i>Bifidobacterium lactis</i> (2 штами), <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	ТОВ ВІВО-АКТИВ, Україна [15]
Веган йогурт VIVO	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	ТОВ ВІВО-АКТИВ, Україна [16]

FIT-Йогурт VIVO	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i>	ТОВ ВІВО-АКТИВ, Україна [17]
Закваска для йогурту	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus filant</i>	Виробник: Dalton, Італія, Фасування: Cheese master, Україна [17]
Іпровіт-Йогурт	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Інститут продовольчих ресурсів, Україна [16]
Іпровіт-Йогурт з ацидофільною паличкою	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Інститут продовольчих ресурсів, Україна [16]
Іпровіт-Йогурт з біфідобактеріями	<i>Bifidobacterium longum</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> ; <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Інститут продовольчих ресурсів, Україна [17]

З наведених даних в табл. 3.2, можна впевнитись що в кожній заквасці наявна молочнокисла бактерія *Lactobacillus bulgaricus*, в подальшому щоб визначити річну потребу в даному цільовому продукті, слід розглянути яка кількість йогурту виробляється в Україні.

Для встановлення кількості виробленого йогурту розглянемо дані представленні Державною службою статистики України за 2021 рік [5], в яких продемонстровано що за 2021 рік було виготовлено: йогурт неароматизований, без додавання фруктів, горіхів, какао та інших наповнювачів – 13 476 т, та йогурт рідкий та сквашене молоко ароматизовані (молоко і вершки коагульовані, йогурт, кефір, сметана та інші ферментовані продукти, ароматизовані або з додаванням фруктів, горіхів або какао) – 140 505,1 т.

Наведена друга група товарів вміщує велику кількість одиниць, тому припустимо що на йогурт ароматизований припадає 5 % від даної кількості виробленої продукції, тоді його кількість становитиме  $140\,505,1 * 0,05 = 7\,025$  т.

Отже, загально річне виробництво йогурту становить  $13\,476\text{ т} + 7\,025\text{ т} = 20\,501$  т.

Підсумовуючи вище наведену інформацію, *Lactobacillus bulgaricus* є основним компонентом бактеріальних заквасок для виробництва йогурту, який надає йому характерні для даного продукту властивості, виробництво йогурту за 2021 рік становить 20 501 т, та щороку збільшується, отже на сьогодні наявна потреба в промисловому культивуванні *Lactobacillus bulgaricus* для отримання компоненту заквашуваних композицій.

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Визначивши кількість виробленого йогурту за 2021 рік, слід розрахувати яку кількість клітин *Lactobacillus bulgaricus* необхідно використати для виробництва даної кількості продукту. Враховуючи що в різних виробників йогуртових заквасок різна кількість клітин використовується для ферментації 1 л молока, а в деяких випадках взагалі не зазначено яка кількість клітин використовується, для розрахунку кількості клітин використовуватимемо дані від виробника заквасок *Vacillus Bulgaricus*, Болгарія [14]. Згідно інструкції [15] для виробництва 100 л йогурту необхідно використовувати 20 г закваски, отже для задоволення річної потреби необхідно:

$$20\ 501\ \text{т} / 100 * 20\ \text{г} = 4\ 100\ \text{кг закваски}$$

Закваска вміщує  $2,5 \times 10^{10}$  КУО/г *Lactobacillus bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus* [16], припустимо що співвідношення даних мікроорганізмів 1 до 1, тоді кількість клітин *Lactobacillus bulgaricus* в 1 г закваски становить:  $1,25 \times 10^{10}$  КУО/г. Визначивши кількість клітин в 1 г заквасці розрахуємо кількість клітин яка знаходиться в 4 100 кг:

$$4\ 100\ \text{кг} * 1,25 \times 10^{10}\ \text{КУО/г} = 5\ 125\ 000\ 10^{10}\ \text{КУО}$$

Враховуючи велику кількість виробників бактеріальних заквасок, приймемо що серед розрахованого значення можливо задовольнити лише 5 % потреби, тоді необхідно отримати:

$$5\ 125\ 000 \times 10^{10}\ \text{КУО} * 0,05 = 256\ 250 \times 10^{10}\ \text{КУО } Lactobacillus\ bulgaricus$$

Виробничий синтез життєздатних клітин *Lactobacillus bulgaricus* відбувається культивуванням *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081, яка спроможна

утворювати  $9,52 \times 10^8$  КУО/мл за 72 год культивування [17], тоді кількість культуральної рідини становитиме:

$$256\,250 \times 10^{10} \text{ КУО} / 9,52 \times 10^8 \text{ КУО/мл} = 2\,691\,701 \text{ мл, або } 2\,691,7 \text{ л}$$

Дізнавшись кількість культуральної рідини необхідну для задоволення потреби, також слід врахувати втрати які відбуваються на стадіях виділення цільового продукту, прийmemo що дане значення становить 30 %, тоді необхідна кількість культуральної рідини становитиме:

$$2\,691,7 \text{ л} / (1 - 0,3) = 3\,845,3 \text{ л}$$

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

*Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту і геометричного об'єму ферментера*

Розрахувавши річну потребу культуральної рідини, потрібно визначити кількість отримуваної культуральної рідини за добу, прийнявши що технологічний процес триватиме 110 діб.

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{3\,845,3}{110} = 34,96 \text{ л/добу}$$

Визначивши кількість культуральної рідини отримуваної за добу, розрахуємо кількість культуральної рідини за цикл ( $V_{пц}$ ), врахувавши що виробничий цикл становитиме 80 год (72 год культивування та 8 год підготовка ферментера), а також заклавши відсоток на можливі нестерильні операції - 1,1, тоді:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 34,96 * 80}{24} = 128,2 \text{ л/цикл}$$

За виробничий цикл отримуємо 128,2 л культуральної рідини, враховуючи коефіцієнт заповнення ферментеру 0,65, можна визначити необхідний об'єм ферментеру для отримання даної кількості культуральної рідини.

$$V_r = 128,2 \text{ л} / 0,65 = 197,23 \text{ л}$$

Найближчий стандартний за об'ємом ферментер  $V_r = 0,2 \text{ м}^3$ , обравши об'єм ферментера проведемо перевірочний розрахунок коефіцієнта заповнення:

$$K_{зап} = V_{пц} / V_r = 128,2 / 200 = 0,64$$

Дане значення задовольняє наші потреби, тому виробниче культивування

*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 відбуватиметься в обраному ферментері об'ємом 200 л.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

В результаті одного виробничого цикл отримуємо  $V_{\text{пц}} = 128,2$  л культуральної рідини. Враховуючи що під час ферментації відбуватимуться втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (приблизно 10 %), слід збільшити початковий об'єм поживного середовища з врахуванням втрат, тоді кількість середовища перед початком біосинтезу становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{пц}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 128,2 / (1 - 0,1) = 142,4 \text{ л}$$

Робочий об'єм ферментера складається з об'єму поживного середовища  $V_{\text{пс1}}$  та об'єму посівного матеріалу необхідного для засіву даного середовища  $V_{\text{пм1}}$ , об'єм посівного матеріалу становить 10 % від об'єму середовища, тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 142,4 / (1 + 0,1) = 129,5 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 142,4 - 129,5 = 12,9 \text{ л}$$

*Розрахунок кількості поживного середовища та посівного матеріалу для посівного апарату*

Визначивши необхідний об'єм посівного матеріалу (12,9 л) для засіву ферментера, розрахуємо робочий об'єм посівного апарату в якому він готується:

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{пм}}) = 12,9 / (1 - 0,1) = 14,3 \text{ л}$$

де  $E_{\text{пм}} = 0,1$  – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в посівному апараті за рахунок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс2}}$  та кількість посівного матеріалу  $V_{\text{пм2}}$  який становить 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{пм2}}) = 14,3 / (1 + 0,1) = 13 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 14,3 - 13 = 1,3 \text{ л}$$

Для розрахунку геометричного об'єму посівного апарату  $V_{\text{па1}}$  використовуємо

робочий об'єм апарату та коефіцієнт заповнення 0,65:

$$V_{\text{па1}} = V_{\text{роб2}} / K_{\text{зап}} = 14,3 / 0,65 = 22 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus DSM 20081* можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом  $V_{\text{па}} = 20$  л. Тоді дійсний коефіцієнт заповнення становитиме:

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{па}} = 14,3 / 20 = 0,71, \text{ що допустимо.}$$

*Розрахунок кількості поживного середовища та посівного матеріалу для колб в термостаті*

Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах  $V_{\text{пм4}} = 1,3$  л. Втратами при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб3}} = V_{\text{пм2}} = 1,3 \text{ л}$$

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс3}}$  та кількість посівного матеріалу  $V_{\text{пс3}}$ , що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб3}} / (1 + X_{\text{пм3}}) = 1,3 / (1 + 0,1) = 1,18 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 1,3 - 1,18 = 0,12 \text{ л}$$

Для культивування використовуємо колби об'ємом  $V_{\text{кол}} = 0,75$  л та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,2$ , тоді кількість колб становитиме:

$$N_{\text{к}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{кол}} \times K_{\text{зап}} = 1,3 / 0,75 \cdot 0,2 = 8,6 \text{ колби (прийmemo 9)}$$

Підсумовуючи можна зазначити, що процес одержання посівного матеріалу для виробничого культивування *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus DSM 20081* у ферментері об'ємом  $0,2 \text{ м}^3$  і з коефіцієнтом заповнення 0,65 буде проходити у два етапи.

Таблиця 3.3

**Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus DSM 20081* та виробничого культивування**

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{Г}}$ , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$ , частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$ , л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$ , л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$ , л
1	$0,750 \times 9$ колб	0,2	1,3	1,18	0,12
2	20	0,71	14,3	13	1,3
3	200	0,71	142,4	129,5	12,9

## РОЗДІЛ 4

### Біосинтез цільового продукту

#### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

При гомоферментативному молочнокислому бродінні цукру зброджуються через гліколіз, і близько 90% кінцевого продукту припадає на лактат (інші 10% складають ацетат, ацетоїн та етанол) (рис. 4.1). Субстратом для гомоферментативного молочнокислого бродіння є лактоза, інші моно-і дисахариди, а також органічні кислоти. Загальне рівняння гомоферментативного бродіння: глюкоза  $\rightarrow$  2 лактати + 2 АТФ [35].

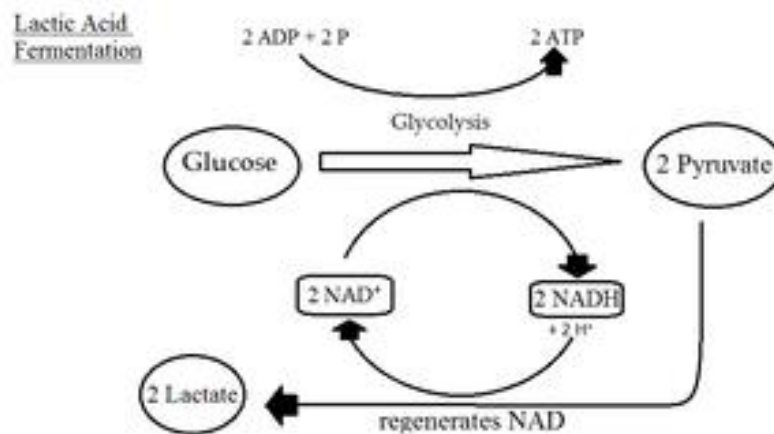


Рис. 4.1. Загальна схема гомоферментативного молочнокислого бродіння [35]

					НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Мищенко А.Є.				<b>РОЗДІЛ 4.</b> <b>Біосинтез цільового продукту</b>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Белемець Т.О.						32	94
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Гомоферментативне бродіння здійснюють представники *Streptococcus*, *Pediococcus*, багатьох видів роду *Lactobacillus*, які мешкають у шлунково-кишковому тракті та молочних залозах ссавців, а також на поверхні рослин[3].

При гетероферментативному молочнокислому бродінні цукру зброджуються через пентозофосфатний шлях, і на частку молочної кислоти припадає лише близько половини кінцевого продукту. Крім лактату, при гетероферментативному бродінні утворюються ацетат, етанол та вуглекислий газ.

Основним субстратом для гетероферментативного молочнокислого бродіння є мальтоза. Ацетил-КоА може перетворюватися на двох напрямках: або окислюватися до ацетату, даючи ще одну молекулу АТФ, або відновлюватися до етанолу рахунок  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Гетероферментативні бактерії не мають ключових ферментів гліколізу — альдолази та тріозофосфатизомераз[en] — через що бактерії не можуть окислювати цукру за допомогою гліколізу. У деяких лактобактерій гідроліз мальтози супроводжується її фосфорилуванням з утворенням глюкозо-6-фосфату та галактози. У цьому енергетичний вихід бродіння підвищується[36].

До гетероферментативних молочнокислих бактерій відносяться деякі види роду *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. brevis* та інші), а також представники роду *Leuconostoc* [37].

Деякі гомоферментативні бактерії, опиняючись у середовищі, що містить пентози, починають виробляти каталазу і можуть переходити на гетероферментативне бродіння. Так, *Lactobacillus plantarum*, що мешкає на рослинних рештках, використовує гліколіз для окислення гексоз, а пентози окислює по пентозофосфатному шляху з утворенням лактату та ацетату [38].

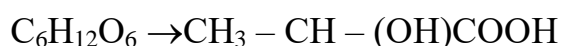
Ряд гетероферментативних бактерій дуже чутливий до навколишніх умов. Так, *Leuconostoc mesenteroides*, яка як один з продуктів утворює етанол, при зіткненні з киснем виробляє значну кількість полісахаридів і через це виділяється велика кількість слизу [39].

## 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Молочнокисле бродіння відоме з давніх часів і було вивчено Луї Пастером у 1857 році, коли він встановив його біологічну природу. Один з видів молочнокислого бродіння, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, відомий своєю здатністю утворювати переважно молочну кислоту (85% і більше), а також невеликі кількості фумарової, бурштинової, летючих кислот, етилового спирту і вуглекислого газу під час бродіння.

Цей вид молочнокислих бактерій використовує метаболічний шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз) для перетворення глюкози в 2 молекули лактату. При цьому процесі виробляється 2 молекули АТФ. Важливим аспектом є оптична активність утвореного лактату, яка може відрізнятися у різних видів і залежить від стереоспецифічності ферменту лактатдегідрогенази, що каталізує реакцію відновлення пірувату до лактату, а також від наявності в клітині лактатрацемази, яка перетворює D-лактат у L-форму. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* утворює ендомер лактату - D-лактат.

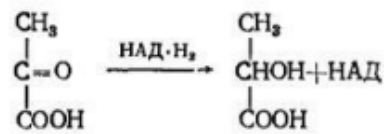
Гомоферментативне молочнокисле бродіння може бути виражене сумарною хімічною реакцією і представляє собою важливий процес у виробництві молочних продуктів:



Фактично, процес складається з декількох кроків, і він поділяється на кілька послідовних реакцій. Спочатку, після гліколізу, одна молекула моносахариду перетворюється в дві молекули піровиноградної кислоти і дві молекули НАДН<sub>2</sub>. Піровиноградна кислота, яка утворилася, перетворюється в оцтовий альдегід, а не в молочну кислоту, як це відбувається у спиртовому бродінні. Це через відсутність ферменту піруваткарбоксилази в молочнокислих бактеріях.

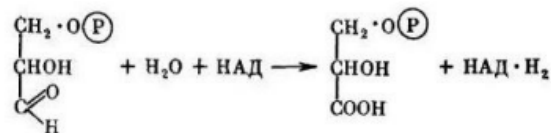
Потім саме піровиноградна кислота приймає водень від відновленої форми НАДН<sub>2</sub> і перетворюється в молочну кислоту. Цей процес є складнішим, ніж здається на перший погляд і включає кілька хімічних реакцій.

Такий складний метаболізм молочнокислих бактерій грає важливу роль у виробництві молочних продуктів і забезпечує утворення молочної кислоти, що надає продуктам характерний смак і консистенцію[41]:

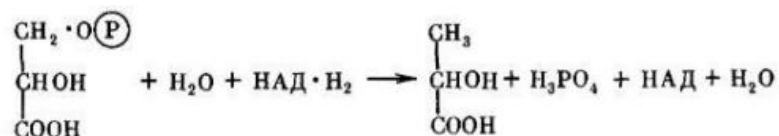


Реакція, в якій молочна кислота утворюється з 3-фосфогліцерінового альдегіду шляхом окислення його альдегідної групи і відновлення спиртового гідроксилу, каталізується ферментом лактатдегідрогеназою. Згідно з В. Н. Шапошніковою, цей процес не включає пірвіноградну кислоту, а прямо перетворює 3-фосфогліцеріновий альдегід у молочну кислоту.

Молочнокисле гомоферментативне бродіння відбувається в дві стадії. Під час першої стадії, яка відбувається в експоненційній фазі росту бактерій, 3-фосфогліцеріновий альдегід окислюється в 3-фосфогліцерінову кислоту з одночасним відновленням НАДН<sub>2</sub>.



У другій стадії молочнокислого гомоферментативного бродіння, паралельно з утворенням НАДН<sub>2</sub>, відбувається поступове зниження рівня рН, що призводить до передачі водню з НАДН<sub>2</sub> на 3-фосфогліцерінову кислоту. Це процес відновлює 3-фосфогліцерінову кислоту, перетворюючи її в молочну кислоту[27]:



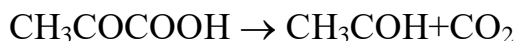
Автори підтверджують своє уявлення тим, що додана в середовище пірвіноградна кислота не відновлюється в молочну кислоту, а з неї утворюються оксалоуксусна кислота (ОС) і сукцинат (С-з'єднання). За даними К. Нейберга, останнім продуктом перед утворенням молочної кислоти є метилгліоксаль [42]:



У розчині можуть відбуватися складні перетворення:

Гліцерінальдегід → Гліцерин- Гіпотетична С<sub>3</sub>- сполука → Молочна кислота →  
Піровиноградна кислота → Оцтова кислота + CO<sub>2</sub> + 2H. [28]

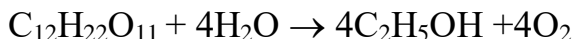
При змішаному молочно-спиртовому бродінні на лактозу діють ферменти молочних дріжджів і молочнокислих бактерій. Молочний цукор спочатку розчеплюється на галактозу та глюкозу, з подальшим перетворенням на піровиноградну кислоту. Частина піровиноградної кислоти відновлюється до молочної кислоти під дією ферментів молочнокислих мікроорганізмів. А інша частина піровиноградної кислоти під впливом ферменту карбоксилази, що міститься в клітинах молочних дріжджів, розчеплюється на оцтовий альдегід і вуглекислий газ [43]:



Оцтовий альдегід відновлюється до етанолу:



У загальному вигляді спиртове бродіння:



Під час молочнокислого та змішаного бродіння утворюється молочна кислота, яка взаємодіє з казеїнат-кальцій-фосфатним комплексом молока. Це призводить до відщеплення кальцію та звільнення казеїну, що сприяє утворенню згустку.

Біохімічні перетворення, що відбуваються при заквашуванні, надають кисломолочним продуктам корисні властивості. Вони стають легше засвоюваними порівняно з звичайним молоком. Наприклад, кисляк засвоюється на 95%, в той час як звичайне молоко лише на 44%. Це пояснюється розкладом білків молока на більш прості сполуки під час пентанізації.

Молочна кислота, вуглекислий газ і спирт, які утворюються під час бродіння, мають вплив на секреторну діяльність шлунково-кишкового тракту. Виділення молочної кислоти в шлунку призводить до підвищення рівня рН, що має антагоністичний ефект щодо хвороботворних бактерій. Деякі кисломолочні бактерії також здатні синтезувати вітаміни С та В12.

## РОЗДІЛ 5.

### Обґрунтування вибору технологічної схеми

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

*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* є анаеробною бактерією яка росте при оптимальних значеннях рН 5,2-6,2 та температурі 30-40 °С. Враховуючи оптимальні значення температури та рН, для унеможливлення контамінації під час виробничого синтезу, так як зазначені параметри є сприятливими для росту більшості мікроорганізмів, необхідно передбачити проведення виробничого синтезу в асептичних умовах з глибинним способом культивування.

Цільовим продуктом виробничого синтезу є життєздатні клітини *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* зважаючи на те що найбільша кількість життєздатних клітин формується на стаціонарній фазі росту біологічного агента, процес ферментації слід проводити періодичним способом.

Так як цільовий біологічний агент є анаеробом, необхідно забезпечити дані умови для оптимального росту, для цього слід вносити інертний газ в процесі культивування в ферментер.

З вищезазначених факторів можна зробити висновок що виробничий ферментер повинен оснащуватись сорочкою, для підтримання сталого температурного режиму культивування, датчиком рівня рН, перемішувачим пристроєм, для рівномірного розподілу компонентів, а також датчиком кисню [45].

					НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ			
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мищенко А.Є.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.					37	94
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Розрахувавши річну потребу в життєздатних клітинах *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* та визначивши робочий об'єм ферментера (200 л), серед наявних в вільному доступі ферментерів можна розглянути наступні варіанти:

SiDoLin SDS200L: ферментер вироблений на замовлення в «Silver Double Limited» США, з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою датчиками тиску, температури (0-80 °C), рівнями рН, швидкості перемішування та аерації [46].

200 л ферментер виготовлений на замовлення в «KeyoPharmachine» Китай, дана компанія спеціалізується на обладнанні для роботи з *Lactobacillus*, тому даний ферментер повністю призначений для виробничого синтезу клітин *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, вироблений з нержавіючої сталі, оснащений датчиком рН (0-14), температури (0-150 °C), перемішувачем, та датчиком аерації. [47].

Оглядаючи представлені ферментери, доцільно обрати ферментер від компанії «KeyoPharmachine», яка спеціалізується на виробництві обладнання для роботи з *Lactobacillus*, через оснащеність кращими датчиками та схожим цільовим призначенням. Зображення обраного ферментеру наведено на рис. 2.1.



**Рис. 5.1. Візуальний вигляд ферментеру об'ємом 200 л для виробничого культивування клітин *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus***

## 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Як зазначалось в попередньому пункті, біологічний агент *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* є анаеробом, тому під час виробничого синтезу життєздатних клітин та на стадії отримання посівного матеріалу необхідно передбачити наявність інертного газу. Зважаючи на дані описані в статті [17], для оптимального синтезу біомаси необхідно під час культивування вносити очищений азот з швидкістю 0,1 л/л\*хв.

Для внесення азоту в процесі культивування можна закуповувати балони з очищеним азотом, або передбачити наявність азотогенератора, для встановлення оптимального методу забезпечення подачі азоту розраховуємо теоретичну кількість азоту необхідну на процес виробничого синтезу. Швидкість подачі азоту становить 0,1 л/л\*хв, робочий об'єм ферментера 142,4, час ферментації становить 72 год, тоді за одну ферментацію витратиться:

$$142,4 \text{ л} * 0,1 \text{ л/л*хв} * 72 \text{ год} * 60 = 61\ 516,8 \text{ л}$$

Отже, за один виробничий синтез витрачається приблизно 61,5 м<sup>3</sup> азоту, враховуючи що стандартний балон з азотом містить 40 л газу, то на виробничий біосинтез необхідно приблизно 1500 балонів з газом, враховуючи що дана кількість балонів буде займати велику кількість місця, а також постійне заповнення даних балонів газом, буде займати час та гроші на їх подальше транспортування, доцільно використовувати азотогенератори, які безпосередньо будуть виробляти очищений азот.

Для виготовлення очищеного азоту пропонується використовувати установку з мембранною технологією яка в порівнянні з адсорбційною технологією потребує меншу кількість стадій попередньої підготовки повітря. В стадії попередньої підготовки повітря входять наступні етапи:

1. Забір атмосферного повітря;
2. Очищення на фільтрі грубого очищення від крупних часток пилу
3. Стиснення повітря
4. Охолодження стиснутого повітря

## 5. Видалення надлишкової вологи

Після охолодження повітря подають на мембранну установку в якій повітря під час проходження крізь мембрани поділяється на азот та інші гази, отриманий азот направляють в подальшому на виробничі потреби.

В якості мембранної установки для виробництва азоту пропонується використовувати генератор азоту IMT SN 3350 який є компактною установкою та спроможний виробляти 1,9 м<sup>3</sup>/год очищеного азоту з ступенем очищення 95 % [48], враховуючи що необхідно забезпечити асептичні умови перед внесенням азоту в посівний апарат та в виробничий ферментер необхідно пропустити даний газ крізь індивідуальний фільтр який дозволить отримати очищений азот з ступенем очищення 99,995 %.

### 5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Одним із важливих етапів на всіх біотехнологічних виробництвах є миття та дезінфекція обладнання, даний етап дозволяє забезпечити чистоту приміщень та дотримання асептичних умов. Вибір миючих засобів в основному відбувається за миючою здатністю та ціною, в основному в якості миючого засобу використовують каустичну соду, безбарвну гігроскопічну кристалічну речовину без запаху, яка розчиняється у воді з виділенням великої кількості тепла. Ця речовина – лужної природи (завдяки чому є ефективною проти органічних забруднень). Концентрація робочого розчину – 2 %, його температура – від 50 до 60 °C [49].

Під час вибору дезінфекційних засобів слід передбачити наявність декількох засобів для чергування їх з інтервалом 2 тижні, для уникнення формування резистентності мікроорганізмів. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів проводитимемо з реєстру дезінфекційних засобів, з даного реєстру в якості дезінфікуючих засобів доцільно обрати «Dezaldum 20» та «Ексан Про Дез», через найменшу вартість.

«Dezaldum 20» - діючі речовини: 15+ % алкілдиметилбензиламоній хлорид; 10+ % глутаровий альдегід). Концентрація робочого розчину – 1,0 %, норма витрат готового розчину під час протирання становить 100 мл на 1 м<sup>2</sup> [49].

«Ексан Про Дез» - діючі речовини поверхнево-активні речовини 15 – 30%, неіоногенні поверхнево-активні речовини (ПАР) більше 5 %, ізопропанол, дезінфектант, концентрація робочого розчину – 1,5 % [50].

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

*Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу*

Для отримання посівного матеріалу використовують простіше поживне середовище, а саме середовище deMan, Rogosa Sharpe (MRS), яке має наступний компонентний склад, г/л [39]:

- Глюкоза – 20;
- Пептон – 10;
- Яловичий екстракт – 8;
- Дріжджовий екстракт – 4;
- Натрій ацетат – 5;
- Цитрат амонію – 2;
- Гідроортофосфат калію – 2;
- Твін 80 – 1;
- Сульфат магнію – 0,2
- Сульфат мангану – 0,05.

##### Отримання посівного матеріалу в колбах

На дану стадію необхідно приготувати 1,18 л поживного середовища, через невеликий об'єм стерилізацію можна провести в автоклаві, тому враховуючи відношення компонентів наведеного складу поживного середовища до температури поділ на композиції виглядатиме наступним чином:

*Композиція А:* Глюкоза, пептон, яловичий екстракт та дріжджовий екстракт (112 °С, 20 хв);

*Композиція Б:* Гідроортофосфат калію (131 °С, 40 хв);

*Композиція В:* Ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію та сульфат мангану (131 °С, 40 хв).

Термолабільні компоненти (глюкоза, пептон, яловичий екстракт та дріжджовий екстракт) готують та стерилізують об'єднавши їх разом в композицію А, приготування та стерилізація відбувається в колбі. Фосфатні солі готують та стерилізують окремо від усіх інших солей, для уникнення випадіння небажаного осаду, тому гідроортофосфат калію поміщають в композицію Б, а всі інші солі в композицію В, приготування композицій солей відбувається в колбах. Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування 1,18 л поживного середовища наведено в табл. 5.1 [51].

Таблиця 5.1

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу в колбах**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 1,18 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20	23,6	А	0,25
Пептон	10	11,8		
Яловичий екстракт	8	9,44		
Дріжджовий екстракт	4	4,72		
Вода		250 (мл)		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	2,36	Б	0,15
Вода		150 (мл)		
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	5	5,9	В	0,779
C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	2	2,36		
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,2	0,24		
MnSO <sub>4</sub>	0,05	0,06		
Вода		779 (мл)		
Твін 80	1	1,18	Г	0,001
<b>Усього</b>				<b>1,18</b>

Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л

На дану стадію необхідно приготувати 13 л поживного середовища, враховуючи що об'єм поживного середовища значно більший за об'єм попередньої стадії приготування та стерилізації композицій відбуватиметься в реакторах. Поділ компонентів на композиції відбувається як і на попередній стадії з однією відмінністю

композиції солей об'єднують в одну. Поділ компонентів на композиції виглядає наступним чином:

*Композиція А:* Глюкоза, пептон, яловичий екстракт та дріжджовий екстракт (112 °С, 20 хв);

*Композиція Б:* Гідроортофосфат калію, ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію та сульфат мангану (131 °С, 40 хв).

Термолабільні компоненти готують та стерилізують в реакторі об'ємом 5 л, стерилізація відбуватиметься гострою парою при 112 °С впродовж 20 хв. Приготування композиції солей відбуватиметься в реакторі невеликого об'єму, а стерилізація в посівному апараті, що дозволить зменшити економічні витрати.

Процес приготування та стерилізації композиції солей виглядатиме наступним чином, всі компоненти вносять в невеликий реактор додають частину води, перемішують, та переливають в посівний апарат в який в подальшому додають іншу частину води, перемішують, та проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С впродовж 40 хв.

Розрахунок необхідної кількості компонентів для приготування 13 л поживного середовища наведено в табл. 5.2.

*Таблиця 5.2*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування поживного середовища на стадію отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 13 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	20	260	А	3,0
Пептон	10	130		
Яловичий екстракт	8	104		
Дріжджовий екстракт	4	52		
Вода		3 (л)		
Конденсат		0,3	Б	8,81
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	26		
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	5	65		
C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	2	26		
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,2	2,6		

MnSO <sub>4</sub>	0,05	0,65		
Вода		8,81		
Конденсат		0,88		0,88
Твін 80	1	13 (мл)	В	0,013
<b>Усього</b>				<b>13</b>

Середовище для виробничого синтезу життєздатних клітин *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus DSM 20081* має наступний компонентний склад, г/л:

Лактоза – 36;

Казеїновий пептон – 10;

Дріжджова азотна основа – 5 [25];

Ацетат натрію – 5;

Гідроортофосфат калію – 2;

Діамоній гідроген цитрат – 2;

Твін 80 – 1;

Сульфат магнію – 0,2

Сульфат мангану – 0,05;

Аденін – 50 мг;

Гуанін – 50 мг;

Ксантин – 50 мг;

Урацил – 50 мг;

Фолієва кислота – 0,03 мг;

Рибофлавін – 0,2 мг;

Кобаламін – 0,01 мг;

Дигідрофосфат натрію – 0,8;

Хлорид кальцію – 0,36;

Тіогліколят натрію – 0,5;

Форміат натрію – 0,3;

Оротова кислота – 0,5

Розглянувши наведений компонентний склад для виробничого культивування, можна відзначити, що вітаміни та нуклеїнові основи, готують та стерилізують разом методом холодної стерилізації, через низьку температуру деградації даних

компонентів. Необхідна кількість даних компонентів для поживного середовища наведено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

**Необхідна кількість компонентів для приготування розчину мікроелементів на виробничий синтез біомаси**

Компонент поживного середовища	Концентрація, мг/л	Кількість для приготування 129,5 л середовища, мг	Об'єм композиції V, л
Аденін	50	6 475	1
Гуанін	50	6 475	
Урацил	50	6 475	
Кстантин	50	6 475	
Фолієва кислота	0,03	3,89	
Рибофлавін	0,2	25,9	
Кобаламін	0,01	1,29	
Вода		1 (л)	
<b>Разом:</b>			<b>1</b>

Не зважаючи на відмінність компонентного складу поживного середовища на виробничий синтез в порівнянні з поживним середовищем для посівного матеріалу, принцип поділу компонентів на композиції залишається незмінним, в композицію А поміщають всі термолабільні компоненти, а всі солі об'єднують разом в одну композицію Б, поділ компонентів на композиції має наступний вигляд:

*Композиція А:* Лактоза та казеїновий пептон (112 °С, 20 хв);

*Композиція Б:* Дріжджова азотна основа, ацетат натрію, гідроортофосфат калію, діамоній гідроген цитрат, сульфат магнію, сульфат мангану, дигідрофосфат натрію, хлорид кальцію, тіогліколят натрію, формиат натрію та оротова кислота (131 °С, 40 хв).

Таблиця 5.4

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування поживного середовища на стадію виробничого синтезу життєздатних клітин в ферментері об'ємом 200 л**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 129,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
--------------------------------	-------------------	--	------------	-----------------------

Лактоза	36	4 662	А	30
Казеїновий пептон	10	1 295		
Вода		30		
Конденсат		3		3
Дріжджова азотна основа	5	647,5	Б	86,7
$C_2H_3NaO_2$	5	647,5		
$C_6H_{14}N_2O_7$	2	259		
$K_2HPO_4$	2	259		
$NaH_2PO_4$	0,8	103,6		
$C_2H_3NaO_2S$	0,5	64,75		
$C_5H_4N_2O_4$	0,5	64,75		
$HCOONa$	0,3	38,85		
$CaCl_2$	0,36	46,62		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2	25,9		
$MnSO_4$	0,05	6,475		
Вода		86,7		
Конденсат		8,67		
Твін 80	1	129,5	В	0,13
Розчин мікроелементів		1 (л)	Г	1
<b>Усього</b>				<b>129,5</b>

### Приготування титрувальних агентів

З огляду не те що приготування та стерилізація солей на стадії отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л та на виробничий синтез відбувається разом, для уникнення утворення небажаного осаду під час нагрівання розчину, слід зменшити рівень рН до позначки 4,0-4,5.

Для зменшення рівня рН необхідно передбачити приготування 6 % розчину хлоридної кислоти, яка дозволить підкислити поживне середовище до необхідного рівня рН.

Також слід зазначити що оптимальне значення рН необхідне для росту біологічного агента становить 6,0 тому після стерилізації поживних середовищ необхідно передбачити наявність титрувального агента який дозволить збільшити рівень рН до необхідного значення.

Для цього слід передбачити приготування та стерилізацію 6 % розчину гідроксиду натрію. Розрахунок необхідної кількості титрувальних агентів наведено в табл. 5.5.

**Розрахунок вмісту та особливості приготування титрувальних агентів**

Об'єм середовища, л	NaOH (6%)		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
1,18	-		-	
13	26	у колбі об'ємом 1 л	26	у колбі об'ємом 1 л
129,5	259		259	

## РОЗДІЛ 6.

### Специфікація обладнання

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 6.1.

*Таблиця 6.1*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою, яка забезпечує вилучення забруднюючих частинок
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр сітчастий, фільтроматеріал – гофровані ткани сітки з високолегованих сталей, корпус – із високолегованої сталі. Продуктивність – 1100 м <sup>3</sup> /год, стартовий опір – 50 Па. Розміри: 495*247*48 мм. Клас очищення: G2/G3 (Е = 90 %) [25]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий Tidy 4. Максимальний тиск – 7,5 бар, потужність – 3 кВт, продуктивність 410 л/хв [26]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник ОРЕКС-3-СТ з нержавіючої сталі. Робочий тиск – від 6 до 40 бар, діапазон робочих температур – від -60 до 400 °С [27]

*НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ*

Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мищенко А.Є.			<b>РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання</b>	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Белемець Т.О.					48	94
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

МА-5	Мембранний азотогенератор	1	Мембранний азотогенератор ІМТ SN 3350, продуктивність 1,9 м <sup>3</sup> /год, з ступенем очищення 95 % [20].
ПЄ-6 ПЄ-7 ПЄ-8	Пересувна ємність	3	Реактор об'ємом 20 л, з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, габаритні розміри 450*450*1150 (мм) [28].
Р-9 Р-10	Реактор	2	Реактор об'ємом 5 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, габаритні розміри 450*480*1500 (мм) .
ІФ-11 ІФ-17	Індивідуальний фільтр	2	Фільтр НЕРА, фільтроматеріал – мікроскловолокно, корпус – із пластику, алюмінію, оцинкованої або нержавіючої сталі. Продуктивність – 1000 м <sup>3</sup> /год, стартовий опір – 250 Па, кінцевий опір – 650 Па. Розміри: 610*610*78 мм. Клас очищення: Е10-12/Н13/Н14/У15-17 (Е = 99,995 %) [29]
ПА-12	Посівний апарат	1	Посівний апарат GUCT-20 об'ємом 20 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою – 50-500 об/хв, датчиками температури, рН, аерації, габаритні розміри 520*520*1000 [30]
Р-13 Р15	Реактор	2	Реактор об'ємом 40 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений мішалкою, габаритні розміри 600*500*750 (мм) [35].
Н-14 Н-19	Насос перистальтичний	2	Перистальтичний насос з продуктивністю до 198 л/год [32].
Н-16	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос JS-600 з продуктивністю 2,7 м <sup>3</sup> /год [33].
Фр-18	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 200 л, виготовлений з нержавіючої сталі, оснащений сорочкою, датчиками температури, рН, аерації, перемішування, габаритні розміри 1000*1000*2000 (мм) [19]

## РОЗДІЛ 7.

### Опис технологічної схеми.

Виробничий процес синтезу життєздатних клітин *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 складається з допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, приготування азоту, приготування титрувальних агентів, підготовка розчину мікроелементів, приготування та стерилізація поживного середовища) та технологічного процесу (отримання посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081, виробнича ферментація).

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

##### ***ДР 1.1. Підготовка мийних та дезінфекційних засобів***

##### ***ДР 1.1.1. Приготування 2% розчину каустичної соди***

У переносну ємність для приготування мийних розчинів, реактор об'ємом 20 л (ПЄ-6), вносять 360 г каустичної соди зваженої на технічних вагах і доливають питну воду для досягнення об'єму 18 л, вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) та одержують готовий до застосування 2% робочий розчин каустичної соди.

##### ***ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину засобу «Dezaldum 20»***

У переносну ємність для приготування мийних та дезінфекційних розчинів, реактор об'ємом 20 л (ПЄ-7) вносять 180 мл «Dezaldum 20» і доливають питну воду температурою (30-40 °С) для досягнення об'єму 18 л, вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів та одержують готовий до застосування 1,0 % робочий розчин Dezaldum 20.

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.</b>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Мищенко А.Є.</i>					50	94
<i>Перевір.</i>		<i>Белемець Т.О.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

### ***ДР 1.1.3. Приготування робочого розчину засобу «Ексан Про Дез»***

У переносну ємність для приготування мийних та дезінфекційних розчинів, реактор об'ємом 20 л (ПЄ-8) вносять 270 мл «Ексан Про Дез» і доливають питну воду температурою (30-40 °С) для досягнення об'єму 18 л, вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів та одержують готовий до застосування 1,5 % робочий розчин Ексан Про Дез.

### ***ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень***

Перед початком роботи персонал повинен пройти санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфекцію 76%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

#### ***ДР 1.2.1. Генеральне прибирання***

1 раз на місяць проводять генеральне прибирання, для прибирання витрата готового дезінфекційного розчину становить 200 мл/м<sup>2</sup>.

#### ***ДР 1.2.2. Щоденне прибирання***

Щоденне прибирання приміщень відбувається способом протирання поверхні з використанням мийних розчинів (від ДР 1.1.2, ДР 1.1.3) прибирання проводиться 1 раз на добу, витрата розчинів становить 100 мл/м<sup>2</sup>.

### ***ДР 1.3. Підготовка обладнання***

#### ***ДР 1.3.1. Миття обладнання***

Миття обладнання проводять вручну, при використанні 2 % розчину каустичної соди (від ДР 1.1.1). Температура миючого засобу 70-80 °С.

#### ***ДР 1.3.2. Технічний огляд обладнання***

Після етапу миття, обладнання проходить технічний огляд, який складається з: загального технічного огляду, перевірки на герметичність, пробного пуску, налаштування параметрів.

#### ***ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність***

Під час даної стадії в першу чергу проводять перевірку інокуляторів, посівних апаратів та основного ферментера. Для цього у апарат на якому герметично затягнута вся арматура подається аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-

МПа. Перекривають прохід повітря та фіксують показання манометра на протязі 40-60 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації методом омилення: на місця опорних з'єднань апарату наносять мильний розчин та чекають певний час, у місцях розгерметизації виникають невеликі бульбашки, операція триває 30-40 хв. При знаходженні місця розгерметизації затягують з'єднувальну арматуру. І повторюють операцію, якщо це не дало результатів, то міняють прокладки з'єднань.

#### ***ДР 1.3.4 Стерилізація***

Після проходження всіх перевірок обладнання стерилізують подачею гострої пари в апарат за температури 131 °С, упродовж 1,5 год.

#### ***ДР 2. Приготування азоту***

##### ***ДР 2.1. Забір повітря***

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 15 м використовуючи вертикальну трубу з повітрязабірником (ПЗ-1).

##### ***ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря***

Повітря подають на фільтр грубого очищення (Ф-2), для видалення крупних частинок бруду та пилу (розмір часток до 1 мкм). Ступінь очищення – 90 %.

##### ***ДР 2.3. подача повітря на компресор***

Повітря після грубого очищення подається в компресор (К-3), де відбувається стиснення повітря до тиску 0,4 МПа та збільшення температури повітря до 250°С.

##### ***ДР 2.4. Охолодження повітря***

На виході з компресора вміст вологи у повітрі збільшується, тому для видалення вологи повітря охолоджують до 20 °С у теплообміннику (Т-4).

##### ***ДР 2.5. Виділення азоту***

Після досягнення необхідної температури повітря, його подають на мембранний азотогенератор (МА-5), в якому знаходяться мембрани, під час проходження яких відбувається сепарація газових сумішей, і на виході виділяється азот на потреби виробництва, а всі інші гази на утилізацію.

##### ***ДР 2.6. Очищення азоту на індивідуальних фільтрах***

Перед подаванням азоту в посівний апарат та ферментер його пропускають крізь індивідуальні фільтри (ІФ-11, ІФ-17) для досягнення ступеня очищення 99,995%.

### ***ДР 3. Приготування титрувальних агентів***

#### ***ДР 3.1. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти***

На технологічний процес необхідно приготувати 285 мл 6 % хлоридної кислоти, для цього в колбу об'ємом 1 л вносять 47 мл 36 % хлоридної кислоти, попередньо відміряної мірним циліндром, та додають при постійному перемішуванні 238 мл води питної.

#### ***ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію***

На технологічний процес необхідно приготувати 285 мл 6 % розчину гідроксиду натрію, для цього в колбу об'ємом 1 л вносять 17 мг гідроксиду натрію, зваженого на аналітичних вагах, та додають відміряну за допомогою мірного циліндра 285 мл води питної. Вміст колби перемішують до повного розчинення та закривають ватно-марлевым корком і поміщають в автоклав де впродовж 40 хв при 131 °С відбувається стерилізація.

### ***ДР 4. Підготовка розчину мікроелементів***

#### ***ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів на виробничий синтез***

За допомогою аналітичних ваг зважують: 6,475 г аденіну, 6,475 г гуаніну, 6,475 г ксантину, 6,475 г урацилу, 3,89 мг фолієвої кислоти, 25,9 мг рибофлавіну та 1,29 мг кобаламіну. Зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 2 л та вносять, відміряну за допомогою мірного циліндра, воду питну, об'ємом 1 л. Помістивши усі компоненти вміст колби перемішують та в подальшому пропускають крізь фільтр-шприц, діаметр пор фільтрувального матеріалу 0,22 мкм, фільтрат подають в стерильну колбу об'ємом 2 л, та зберігають в ній до використання на стадії виробничого синтезу.

### ***ДР 5. Приготування та стерилізація поживного середовища***

#### ***ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для***

### ***отримання посівного матеріалу в колбах***

Для отримання посівного матеріалу в колбах необхідно приготувати 1,18 л поживного середовища, розрахунок кількості компонентів необхідних для приготування даного середовища наведено в табл. 2.1.

#### ***ДР 5.1.1. Приготування та стерилізація композиції А***

За допомогою технічних ваг зважують: 23,6 г глюкози, 11,8 г пептону, 9,44 г яловичого екстракту та 4,72 г дріжджового екстракту. Зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 1 л та вносять, відміряну за допомогою мірного циліндра, воду питну, об'ємом 250 мл. Помістивши усі компоненти вміст колби добре перемішують та в подальшому колбу закривають ватно-марлевым корком. Для стерилізації колбу поміщають в автоклав де відбувається стерилізація впродовж 20 хв при температурі 112 °С.

#### ***ДР 5.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

За допомогою технічних ваг зважують: 2,36 г гідроортофосфату калію. Зважений компонент поміщають в колбу об'ємом 0,5 л та вносять, відміряну за допомогою мірного циліндра, воду питну, об'ємом 150 мл. Помістивши сіль та воду, вміст колби добре перемішують та в подальшому колбу закривають ватно-марлевым корком. Для стерилізації колбу поміщають в автоклав де відбувається стерилізація впродовж 40 хв при температурі 131 °С.

#### ***ДР 5.1.3. Приготування та стерилізація композиції В***

За допомогою технічних ваг зважують: 5,9 г ацетату натрію, 2,36 г цитрату амонію, 0,24 г сульфату магнію та 0,06 г сульфату мангану. Зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 2 л та вносять, відміряну за допомогою мірного циліндра, воду питну, об'ємом 779 мл. Помістивши солі та воду в колбу, вміст колби добре перемішують та в подальшому колбу закривають ватно-марлевым корком.

Для стерилізації колбу поміщають в автоклав де відбувається стерилізація впродовж 40 хв при температурі 131 °С.

### ***ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л***

Для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л необхідно

приготувати 13 л поживного середовища, з огляду на те що стерилізація відбуватиметься в реакторах внесений об'єм води зменшений з урахуванням утворюваного конденсату при стерилізації парою, розрахунок кількості компонентів необхідних для приготування даного середовища наведено в табл. 2.2.

#### ***ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції А***

За допомогою технічних ваг зважують: 260 г глюкози, 130 г пептону, 104 г яловичого екстракту та 52 г дріжджового екстракту. Зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 5 л (Р-9) та вносять, відміряну за допомогою мірного циліндра, воду питну, об'ємом 3 л. Помістивши усі компоненти в реактор, вмикають перемішуючи пристрій (100 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування в реактор подають гостру пару для проведення стерилізації, впродовж 20 хв при температурі 112 °С.

#### ***ДР 5.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

За допомогою технічних ваг зважують: 26 г гідроортофосфату калію, 65 г ацетату натрію, 26 г цитрату амонію, 2,6 г сульфату магнію та 0,65 г сульфату мангану. Зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 5 л (Р-10) та вносять, відміряну за допомогою мірного циліндра, воду питну, об'ємом 3,81 л.

Помістивши солі та воду в реактор, вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв), для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вміст реактора самоплином подають в посівний апарат об'ємом 20 л та додають 5 л води питної.

Вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) та вносять 6 % розчин хлоридної кислоти (від ДР 3.1). В подальшому в посівний апарат подають гостру пару для проведення стерилізації при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

#### ***ДР 5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування в ферментері об'ємом 200 л***

Для виробничого культивування в ферментері об'ємом 200 л (Фр-18) необхідно приготувати 129,5 л поживного середовища, з огляду на те що стерилізація відбуватиметься в реакторах внесений об'єм води зменшений з урахуванням утворюваного конденсату при стерилізації парою, розрахунок кількості компонентів необхідних для приготування даного середовища наведено в табл. 2.4.

### ***ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А***

За допомогою технічних ваг зважують: 4 662 г лактози та 1 295 г казеїнового пептону. Зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 40 л (Р-13) та вносять воду питну, об'ємом 30 л. Помістивши усі компоненти в реактор, в ньому вмикають перемішуючи пристрій (100 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування в реактор подають гостру пару для проведення стерилізації, впродовж 20 хв при температурі 112 °С.

### ***ДР 5.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б***

За допомогою технічних ваг зважують: 647,5 г дріжджової азотної основи, 647,5 г ацетату натрію, 259 г цитрату амонію, 259 г гідроортофосфату калію, 103,6 г дигідрофосфату натрію, 64,75 г тіогліколяту натрію, 64,75 г оротової кислоти, 38,85 г форміату натрію, 46,62 г хлориду кальцію, 25,9 г сульфату магнію та 6,475 г сульфату мангану. Зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 40 л (Р-15) та вносять воду питну, об'ємом 26,7 л.

Помістивши солі та воду в реактор, в ньому вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв), для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вміст реактора за допомогою відцентрового насоса (Н-16) подають в ферментер об'ємом 200 л (Фр-18) та додають 60 л води питної. Вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) та вносять 6 % розчин хлоридної кислоти (*від ДР 3.1*). В подальшому в ферментер подають гостру пару для проведення стерилізації при температурі 131 °С впродовж 40 хв.

## ***ТП 6. Отримання посівного матеріалу *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM 20081***

### ***ТП 6.1 Підтримання колекційної культури***

Колекційну культуру *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM 20081 зберігають у пробірках зі скошеним MRS агаром. Пересіви здійснюють кожні 2 – 3 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять у суворо асептичних умовах.

### ***ТП 6.2. Отримання робочої культури***

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з MRS агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із MRS агаром і вирощують при

температурі 40 °С упродовж 48 годин.

### ***ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках***

Отримані ізольовані колонії (від ТП 6.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним MRS агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 40 °С та вирощують впродовж 48 годин. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

### ***ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах***

У колбу з стерильною композицією В об'ємом 2 л (від ДР 5.1.3) в асептичних умовах вносять стерильні композиції А (від ДР 5.1.1) та Б (від ДР 5.1.2), а також 1,18 мл твін 80. Помістивши всі розчини в одну колбу її перемішують, та в строго асептичних умовах розливають в 9 стерильних колб. У пробірку з робочою культурою *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колбу з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Вирощування посівного матеріалу у колбах проводять за наступних умов: температура – 40 °С, частота обертання – 200 об/хв, час вирощування – 48 год. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 2 л.

### ***ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л***

В посівний апарат об'ємом 20 л з стерильною композицією Б, самоплином вносять стерильну композицію А (від ДР 5.2.1), та в строго асептичних умовах вносять 13 мл твін 80 та 6 % розчин гідроксиду натрію (від ДР 3.2). Після внесення всіх компонентів в посівний апарат в ньому вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів. В подальшому в асептичних умовах в посівний апарат вносять посівний матеріал з засівної колби (від ТП 6.4), та подають азот (від ДР 2.5) з швидкістю 0,1 л /л\*хв.

Процес вирощування посівного матеріалу проводять за наступних умов:

температура – 40 °С, частота обертання – 200 об/хв, час вирощування – 48 год. В процесі культивування через кожні 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

### ***ТП 7. Виробнича ферментація***

#### ***ТП 7.1. Виробничий синтез клітин *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM 20081***

В ферментер об'ємом 200 л з стерильною композицією Б, за допомогою перистальтичного насоса вносять стерильну композицію А (від ДР 5.3.1), а також 130 мл твін 80, 1 л стерильного розчину мікроелементів (від ДР 4.1) та 6 % розчин гідроксиду натрію (від ДР 3.2). Помістивши всі розчини в ферментері в ньому вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв), та через трубу перетискування вносять посівний матеріал (від ТП 6.5).

Процес виробничого синтезу відбувається з постійним внесенням очищеного азоту (від ДР 2.5) з швидкістю 0,1 л/л\*хв, при постійному перемішуванні 200 об/хв, та дотриманні сталої температури 40 °С, тривалість процесу 72 год.

Під час ферментації через кожні 8 год відбувається відбір проб для мікробіологічного контролю.

## РОЗДІЛ 8.

### Контроль виробництва

#### 8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1.

#### Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР1.1 Підготовка персоналу	Навчання Спецодяг	Компетентність Чистота	Періодично По мірі забруднення	Достатній рівень компетенції Чистота
ДР1.2. Приготування дезінфікуючих, миючих	Розчин NaOH, Кількість NaOH Хлорне вапно, кількість Ca(ClO) <sub>2</sub>	Ваги, мірний посуд, візуально Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію Кожну операцію	1% 2%
ДР1.3 Підготовка обладнання та кумонікацій	Ступінь чистоти, вміст мікроорганізмів та часток Герметичність	Візуально Мазки з внутрішніх та зовнішніх поверхонь Або використання тест системи. Метод омилення.	Кожну операцію	Стерильні Герметичні

<i>НУХТ БТЕК 05.01.21. КР ПЗ</i>				
Змн.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Мищенко А.С.		
Перевір.		Белемець Т.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
<b>РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва</b>				
		Літ.	Арк.	Аркушів
			59	94
<i>Кафедра БТМ</i>				

ДР2. Підготовка повітря	Ступінь чистоти,вміст мікроорганізмів в та часток	Мікробна контамінація (проба повітря КУО/м <sup>3</sup> ) Седиментаці йний метод	Кожну операцію	Не повинно бути життєздатних мікроорганізм ів, та максимально допустиме число часток
-------------------------------	--	--	-------------------	---

Продовження таблиці 8.1

1	2	3	4	5
			(седиментація на пластинку КУО/м <sup>3</sup> )	в 1м <sup>3</sup> повітря 200. Е = 95 %
ДР 3. Підготовка упаковки	Режим стерилізації	Термометр Манометр Візуально Мікробіологічна чистота	Кожну операцію	t=125°C, P=0,1МПа, T=30хв. Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4. Підготовка та стерилізація поживних середовищ	Режим стерилізації	Термометр Манометр Візуально Мікробіологічна чистота	Кожну операцію	t=125°C, P=0,1МПа, T=30хв. Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 5. Підготовка захисного середовища	Ступінь чистоти Маса	Ваги	Кожну операцію	t=125°C, P=0,1МПа, T=15хв. Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП6.Вирощування посівного матеріалу	Режим культивування. Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	t= 45°C
ТП7.1.Підготовка та кип'ятіння молока	Режим кип'ятіння Режим обезжирення	Термометр Візуально	Кожну операцію	t=95°C, T=30-45хв, C(ср)=12% Відсутність сторонньої мікрофлори

ТП7.2. Культивування	Режим культивування. Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	n=200об/хв, рН=5,0-4,2; t=45°C; T= 7-8год.
ТП7.3 Охолодження	Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	t=5°C, T=5-10хв

Закінчення таблиці 8.1

1	2	3	4	5
ТП10. Ліофільна сушка	Температура час	Термометр, візуально	Кожну операцію	t=30°C, P=10Па T=24год
ТП11. Гомогенізація	Однорідність	Візуально	Кожну операцію	D=0,09- 0,095мм
ПМВ.12 Фасування та пакування	Маса Стерильність	Ваги визначення (проба повітря КУО/м3) Седиментаці йний (седиментаці я на пластинку КУО/м3)	Кожну операцію	20шт Не повинно бути життєздатн их мікрооргані зм ів, та максимальн о допустиме число часток в 1м3 повітря 200.

## 8.2. Мікробіологічний контроль

Виходячи з даних тематики курсової роботи, культивування *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus lacto5* розді з метою використання у складі заквашувальних композицій, проходить в асептичних умовах, а отже проведення мікробіологічного контролю задля впевненості у неможливості контамінації, необхідне на всіх стадіях.

### Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Підготовка чашок Петрі полягає у стерилізації їх, як і іншого скляного посуду,

у сухожаровій шафі при температурі 160 - 170°C протягом 1,5 - 2 годин. Після, у вже простерилізовані чашки, розливають по 20 - 30 мл попередньо розплавленого на водяній бані агаризованого середовища. Розташовані на рівній поверхні чашки Петрі з агаром залишають протягом 2-3 днів при температурі 30°C перевернутими закритими кришками донизу [34].

*Виконання посівів* здійснюється для перевірки простерилізованого середовища на відсутність сторонньої мікробіоти. Для цього проводиться відбір його проби стерильною піпеткою, та нанесення на поверхню відповідного агаризованого середовища (для бактерій - м'ясо-пептонний агар (МПА), для грибів і дріжджів – сусло-агар (СА)), рівномірно розподіляючи по всій поверхні стерильним шпателем Дригальського. Чашки Петрі з посівами загортають у папір та ставлять у термостат для інкубування (МПА - 24-48 год, при 32-34°C; СА - 72-120 год, при 24-26°C). Починаючи з 6-8 години проводять аналіз результатів. Візуально на поверхні поживного середовища не має бути ознак росту мікроорганізмів [34].

### **Мікробіологічний контроль чистоти культури**

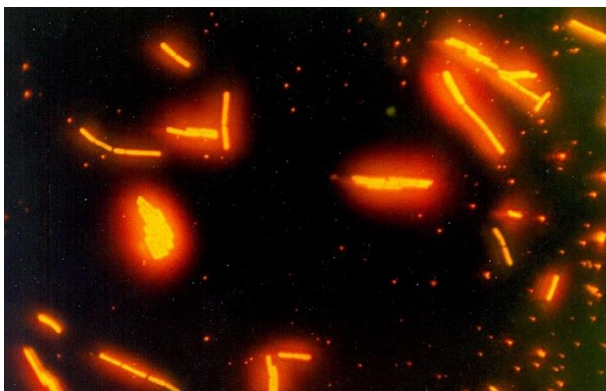
Мікробіологічний контроль посівного матеріалу чи культуральної рідини здійснюється прямим висівом на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

*Прямий посів* на агаризовані поживні середовища проводять, використовуючи чашку Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій та глюкозо-картопляним агаром (ГКА) чи сусло-агаром (СА) для виявлення грибів та дріжджів. Для засівання проби застосовують метод виснажувального штриха, наносячи на поверхню агаризованого середовища у вигляді кількох розтягуючихся штрихів. Після інкубації, цей підхід дозволяє отримати ізольовані колонії мікроорганізмів, які надалі піддаються мікроскопічному дослідженню [34].

*Мікроскопіювання* здійснюється прямим вивченням проби під світловим мікроскопом з імерсійною системою. Для початку, в асептичних умовах готують зразок, наносячи та розподіляючи стерильною петлею культуральну рідину на очищене та знежирене предметне скло. Після висихання при кімнатній температурі, наносять краплю імерсійної олії. Потім встановлюють імерсійний об'єктив ( $\times 90$ ),

опускаючи тубус мікроскопа так, щоб об'єктив занурювався в олію, не доторкаючись до предметного скла. Завершуючи роботу, важливо очистити об'єктив від імерсійного масла, використовуючи спирт.

При мікроскопіюванні *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* можна спостерігати паличкоподібну форму бактерій із закругленими кінцями, розміром 0,5 – 0,8 мкм в ширину і 2 – 9 мкм в довжину. Зазвичай вони розташовані окремими або короткими ланцюжками (Рис. 5.1), але й можна зустріти довгі ланцюжки в культурах пізньої стаціонарної фази (Рис. 5.2) [35]. При мікроскопіюванні повинна спостерігатись лише морфологія клітин, що відповідає вищенаведеному опису, оскільки у протилежному випадку, це слугуватиме підтвердженням наявності сторонньої мікробіоти у зразку [34].



**Рис. 8.1** Фарбування *Lactobacillus bulgaricus* акридиновим оранжевим на ранній стаціонарній фазі росту ( $\times 100$ ) [35]



**Рис. 8.2** Фарбування *Lactobacillus bulgaricus* акридиновим оранжевим на пізній стаціонарній фазі росту ( $\times 100$ ) [35]

## Контроль показників росту

### Визначення концентрації біомаси

Кількість клітин контролюють шляхом вимірювання оптичної щільності на спектрофотометрі Helios UV/VIS (Thermo Electron Corporation, Кембридж, Великобританія) (Рис. 5.3) при довжині хвилі 577 нм. З цих вимірів створюють калібрувальну криву, щоб зв'язати абсорбцію з кількістю клітин за допомогою вдосконаленої лічильної камери Нойбауера (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Лауда-Кенігсхофен, Німеччина) (Рис. 8.4). При необхідності ферментаційне середовище розбавляють 0,95% (мас./об.) хлориду натрію у воді. Біомасу визначають шляхом центрифугування ферментаційного бульйону ( $1900\times g$  протягом 15 хв при  $20^{\circ}\text{C}$ ).

Осад, що утворився, двічі промивають демінералізованою водою, висушують до сталості маси в сушильній шафі ( $103 \pm 1^\circ\text{C}$ ) і зважують [36].



Рис. 8.3. Спектрофотометр Helios UV/VIS (Thermo Electron Corporation, Кембридж, Великобританія)



Рис. 8.4. Лічильні камери Нойбауера (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Лауда-Кенігсхофен, Німеччина)

### Визначення концентрації джерела карбону у поживному середовищі

Виходячи зі складу поживного середовища для культивування *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM 20081, джерелом вуглецю у ньому буде виступати лактоза.

Концентрацію лактози в супернатанті можна визначити за допомогою ферментативних аналізів (R-Biopharm AG, Дармштадт, Німеччина), таких як RIDA<sup>®</sup>CUBE Лактоза / D-глюкоза (RCS4130) – УФ-метод для визначення лактози / D-глюкози (без диференціації) в харчових продуктах та інших матеріалах зразків [37]. Набір для ферментативного тестування призначений для використання лише з приладом RIDA<sup>®</sup>CUBE SCAN (340 нм). Це невеликий інструмент, який дозволяє проводити одноразове тестування на виробничих потужностях або в невеликих лабораторіях (Рис. 5.5.). Тест-набір містить 32 картриджі для одного тесту: 32 пробірки з 800 мкл реагенту 1 (NAD, β-Gal, ATP) та 32 ковпачки з 200 мкл реагенту 2 (HK, G6P-DH), а також одну картку RFID (радіочастотна ідентифікація) з усіма даними, що стосуються тесту. Для проведення аналізу потрібно піпеткою внести зразок у пробірку (реагент 1), закрити пробірку ковпачком (реагент 2), помістити в прилад і закрити дверцята, весь тест буде виконано автоматично (Рис 8.6). Результати

виводяться на планшет, з можливим подальшим експортом на комп'ютер.

Принцип даного ферментативного аналізу з  $\beta$ -галактозидазою ( $\beta$ -Gal) і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою (G6P-DH) пролягає в утворенні та вимірі NADH



Рис. 8.5. Прилад RIDA®CUBE SCAN, 340 нм [37]

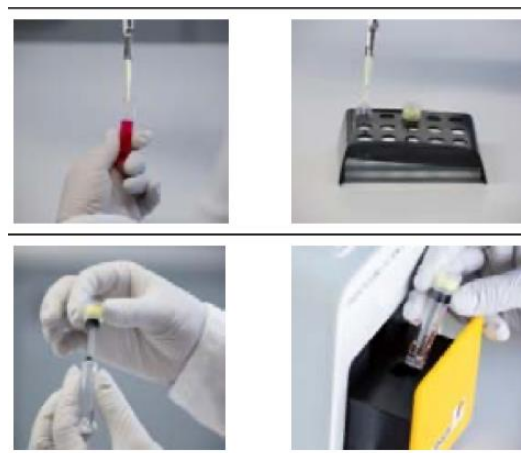
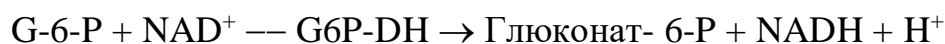
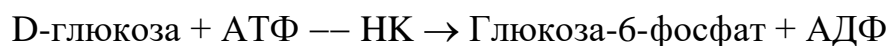
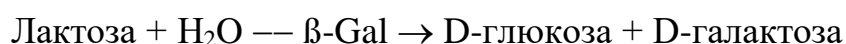


Рис. 8.6. Підготовка картриджа для аналізу

при 340 нм:



Результат включає кількість лактози плюс вільну D-глюкозу, яка присутня у зразку. Розраховується з молекулярною масою лактози (342,3 г/моль). Для диференціації двох цукрів, вільну D-глюкозу необхідно виміряти за допомогою аналізу D-глюкози RIDA®CUBE (RCS4140) в окремому циклі. Лактоза розраховується шляхом віднімання вмісту D-глюкози з урахуванням різниці між молекулярними масами обох цукрів (коефіцієнт 1,9):

$$C_{\text{Лактоза}} [\text{мг/л}] = C_{\text{Лактоза / D-глюкоза}} - 1,90 \times C_{\text{D-глюкоза}}$$

### Визначення концентрації джерела нітрогену в поживному середовищі

У середовищі для культивування *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM 20081 головним джерелом азоту є дріжджовий екстракт, що в основному складається з амінокислот та білків. Концентрацію амінного азоту можна визначити за допомогою йодометричного методу, розробленого Попом і Стівенсом.

Суть цього методу полягає в додаванні суспензії ортофосфату міді

(Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) до слабого лужного розчину амінокислот у боратному буферному розчині. У результаті цієї реакції утворюються розчинні мідні комплекси. Щоб відділити ці комплекси від нерозчинного ортофосфату міді, суміш проціджують. Потім до фільтрату додається оцтова кислота, яка відщеплює мідь від комплексних з'єднань, перетворюючи її в ацетат міді. Для визначення кількості міді, яка брала участь у реакції, до фільтрату додається йодид калію. Це призводить до виділення йоду, кількість якого еквівалентна кількості міді та азоту амінокислот. Після цього йод відтитрують розчином тіосульфату натрію. Таким чином, концентрацію амінного азоту можна визначити на основі кількості витраченого тіосульфату натрію, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот. 1 см<sup>3</sup> 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Техніка аналізу полягає у внесенні 5 мл дослідного розчину у мірну колбу об'ємом 50 мл, додаванні індикатору тімофталейну (3-4 краплини) та розчину гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до появи блідно-блакитного забарвлення. Потім до слабого лужного розчину додають суспензію ортофосфату міді (Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) та доводять об'єм до мітки дистильованою водою, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Далі до фільтрату додають оцтову кислоту (0,5 мл) для підкислення, а також розчин йодату калію. Після перемішування титрують йод розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм<sup>3</sup>. Завершують титрування додаванням 1-2 крапель розчину крохмалю і визначенням кінця титрування за зникненням синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = (a \cdot 0,28 \cdot b \cdot 10 \cdot 100) / 50 \text{ (мг в } 100 \text{ см}^3 \text{ суслу),}$$

де а – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, витраченого на титрування, см<sup>3</sup>;

б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, мл.

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

### **8.3.1. Концентрація біомаси**

Біомасу визначають за допомогою непрямого методу, який базується на вимірюванні оптичної густини клітинної суспензії та подальшому перерахунку на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

Суть цього методу полягає у вимірюванні інтенсивності світла, коли воно проходить через суспензію мікроорганізмів. Клітини поглинають і розсіюють світло, і інтенсивність цих процесів залежить від кількості клітин і їх розмірів.

Методика визначення полягає в таких кроках:

1. Відбирають проби культуральної рідини об'ємом 10 мл.
2. За допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра вимірюють зміну інтенсивності світла, коли воно проходить через суспензію клітин, обираючи певну довжину хвилі (зазвичай в інтервалі 540-650 нм), при якій поглинання світла суспензією клітин є мінімальним.
3. При високих концентраціях клітин може відбуватися вторинне розсіювання світла, що призводить до неточних результатів. Тому в таких випадках суспензію розводять водою перед вимірюванням.
4. Побудову калібрувальної кривої проводять, вимірюючи світлорозсіювання суспензій з різним вмістом клітин і визначаючи кількість клітин або біомасу одним із застосовуваних методів.
5. Отриману залежність виражають графічно у вигляді графіку, де на осі ординат позначають значення ФЕК, а на осі абсцис - кількість клітин або біомасу в г/л.
6. Для кожного мікроорганізму побудовують свою власну калібровану криву.

Таким чином, цей метод дозволяє визначати біомасу мікроорганізмів за допомогою оптичної густини і калібрувального графіка, що дозволяє отримувати точні результати.

### **8.3.2. Концентрація цільового продукту**

Наш продукт, як закваска, вимагає наявності життєздатних клітин продуцента.

Для вивчення цих клітин в живому стані та отримання висококонтрастних кольорових зображень мікроорганізмів, ми використовуємо техніку люмінесцентної мікроскопії [39].

Суть явища люмінесценції полягає в тому, що певні молекули в структурі клітини (наприклад, пігменти, вітаміни, алкалоїди і інші) можуть поглинати частину енергії світла певної довжини хвилі. Після цього вони переходять в електронно-збуджений стан і випромінюють світло іншої довжини хвилі. Збудження може створюватися за допомогою ультрафіолетових променів (300-400 нм) і видимого світла короткохвильової області спектра (400-460 нм) [40].

Усі живі клітини мають властивість флуоресценції, яка називається власною або первинною. Вона є слабкою, тому частіше використовується вторинна флуоресценція. У цьому випадку об'єкти попередньо обробляють спеціальними флуорохромами, такими як акридиновий оранжевий, корифосфін О, тіазиновий червоний, ізотіоціанат флуоресцина та інші [41].

Процедура включає наступні кроки:

1. Відбирають проби культуральної рідини об'ємом 10 мл.
2. За допомогою сильного джерела світла (зазвичай, ртутіва лампа високого тиску), пропускають світло через синьо-фіолетовий світлофільтр.
3. Під впливом короткохвильового випромінювання фарбовані флуорохромами клітини починають випромінювати червоне або зелене світло.
4. Щоб уникнути перешкод від синього світла, яке викликає люмінесценцію, застосовують блокуючий жовтий світлофільтр перед окуляром. Цей фільтр затримує синє світло, але пропускає жовте, червоне і зелене світло.
5. Результатом спостереження у люмінесцентному мікроскопі на темному фоні є видимі клітини, які світяться жовтим, зеленим або червоним кольором [43].

### **8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту**

*Визначення концентрації джерела вуглецю*

Джерелами вуглецю у поживному середовищі є панкреатичний гідролізат казеїну та глюкоза. Для визначення глюкози використовується глюкозооксидазний метод [44].

Суть цього методу полягає в наступному: глюкоза, наявна в розчині, у присутності специфічного ферменту, глюкозооксидази, окислюється киснем, що призводить до утворення перекису водню ( $H_2O_2$ ). Перекис водню, у свою чергу, реагує з пероксидазою і утворює забарвлену сполуку, інтенсивність забарвлення якої пропорційна кількості глюкози в розчині.

Основні кроки методики визначення наступні:

1. Відбирають пробу культуральної рідини на певному етапі процесу біосинтезу.
2. До проби додають розчин хлориду натрію, розчин сульфату цинку і розчин гідроксиду натрію, і перемішують.
3. Потім до цієї суміші додають відібрану культуральну рідину або калібрувальний розчин, знову перемішують і центрифугують.
4. Робочий реактив готується шляхом додавання глюкозооксидази, пероксидази та розчину ортотолідину до ацетатного буфера. Змішують і доводять об'єм до певної кількості буферного розчину.
5. До надосадової рідини додають робочий свідоприготований реактив і обережно перемішують. З'являється забарвлення, і його інтенсивність з часом змінюється.
6. Результати фотометрують в кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см за використання червоного світлофільтра з довжиною хвилі 625 нм. Для калібрування графіка використовують калібрувальний розчин замість проб дослідженого розчину.

Розрахунок можна проводити за правилом пропорцій або за калібрувальним графіком, для побудови якого на одній осі відкладають концентрацію глюкози (ммоль/л), а на іншій – величину екстинкції [46].

#### *Визначення концентрації джерела азоту*

Джерелами азоту в середовищі є панкреатичний гідролізат казеїну, дріжджовий автолізат, цистеїн та амоній лимоннокислий. Для визначення азоту, який міститься у формі амінокислот (присутніх у дріжджовому автолізаті, панкреатичному гідролізаті

казеїну та цистеїні), використовується метод формольного титрування, також відомий як титрування за Серенсенем.

Принцип цього методу полягає в здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи, утворюючи метиленові похідні амінокислот. В результаті реакції формальдегід об'єднується з аміногрупами, і ця реакція може бути виміряна.

Для визначення азоту методом формольного титрування проводять наступні кроки:

1. Взяти випробувану рідину, яка містить амінокислоти, і додати до неї формальдегід.
2. Провести реакцію між амінокислотами і формальдегідом, в результаті чого формальдегід зв'язується з амінокислотами.
3. Визначити кількість незв'язаного формальдегіду, що залишилася в розчині після реакції.
4. Підрахувати кількість азоту в амінокислотах на основі кількості незв'язаного формальдегіду, оскільки кожна аміногрупа має одну азотовмісну групу.

Цей метод дозволяє точно визначити кількість азоту у рідині і, отже, кількість амінокислот, які містяться у досліджуваному середовищі. [47]:



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



Під час реакції з формаліном утворюється метиламінокислота, яка відтитровується 0,1 н розчином гідроксиду натрію. За кількістю витраченого на титрування лугу визначають кількість карбоксильних груп. Зазвичай число

карбоксильних груп в амінокислотах приймають рівним числу аміногруп (що цілком справедливо для моноамінокислот, для діамінокислот вводяться відповідні поправки в методику титрування).

Методика визначення полягає в такому: До 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 9 мл води (рН кінцевого розчину має становити 7,0). При необхідності розчин нейтралізують (використовують 0,1 М розчин гідроксиду натрію або 0,1 М розчин хлоридної кислоти). Після закінчення нейтралізації додають 2 мл розчину формальдегіду, перемішують і титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно титрують розчин, що замість культуральної рідини містить з дистильовану воду – контрольний дослід. Для розрахунку – 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту[47].

## РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

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

Процес культивування *Lactobacillus bulgaricus*, ключового мікроорганізму для виробництва ферментованих молочних продуктів, супроводжується утворенням відходів різного типу. Значущість цих відходів вимагає детальної оцінки, з метою їх мінімізації та раціонального використання.

Тверді відходи, що виникають у процесі, переважно складаються з відмерлих клітин бактерій, невикористаних залишків нутрієнтів, а також упаковкових матеріалів. В рамках дослідження, при виробництві однієї тонни продукту може утворюватись близько 30 кг твердих відходів [24]. Ці відходи можуть бути перероблені або використані як добриво після відповідного компостування [29].

Рідкі відходи включають в себе відпрацьовані культуральні середовища та мийні води. Орієнтовно, вони становлять від 200 до 300 літрів на тонну фінального продукту [9]. Їх очищення вимагає застосування спеціалізованих систем біологічної очистки, що дозволяє знижувати концентрацію органічних забруднювачів до безпечного рівня [38].

					<i>НУХТ БТЕК 05.01.21.КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Мищенко А.Є.</i>			<b>РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Белемець Т.О.</i>					72	94
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Газоподібні викиди, які складаються з вуглекислого газу та інших летких речовин, є побічним продуктом бродіння. Викиди CO<sub>2</sub> можуть досягати приблизно 150 кг на тонну продукції [20]. Хоча вуглекислий газ є менш шкідливим для довкілля порівняно з іншими газами, його управління та зменшення викидів є важливим аспектом екологічної відповідальності виробництва [5].

Враховуючи зазначені масштаби, виробництво *Lactobacillus bulgaricus* має бути ретельно сплановане з огляду на екологічний вплив. Систематичний моніторинг відходів, розробка ефективних методів їх переробки та утилізації може значно покращити екологічний стан навколишнього середовища [14].

Таблиця 9.1.1.

**Місця емісії, обсяги та шкідливість відходів у проєктованому виробництві**

***Lactobacillus bulgaricus***

<b>Тип відходів</b>	<b>Назва відходів</b>	<b>Речовини, що входять до складу</b>	<b>Стадія виробництва</b>	<b>Приблизна к-сть за 1 цикл (тонни)</b>	<b>Клас небезпеки</b>
Тверді	Відходи біомаси	Мертві клітини, білки, вуглеводи	Ферментація	0.5	III
Тверді	Упаковка	Пластик, картон	Упакування	0.2	IV
Рідкі	Стічні води	Залишки молока, кислоти	Очищення обладнання	10	II
Газоподібні	Викиди CO <sub>2</sub>	Вуглекислий газ	Ферментація	1.2	I
Газоподібні	Леткі органічні сполуки	Алкоголі, альдегіди	Ферментація	0.05	II

Ці дані служать як базова інформація для розробки стратегій зменшення негативного впливу на довкілля, що є неодмінною частиною сучасного біотехнологічного виробництва.

Виробництво *Lactobacillus bulgaricus*, як і будь-який інший промисловий процес, має потенціал негативного впливу на довкілля через генерацію відходів. Ці відходи, якщо не контролюватися належним чином, можуть спричинити забруднення

грунту, води, повітря та навіть можуть вплинути на здоров'я людини.

Тверді відходи можуть включати залишки мікроорганізмів та інші нерозчинні матеріали, які, якщо їх не обробити або не знешкодити, можуть призвести до засмічення ґрунту та водних шляхів [19]. Рідкі відходи містять різноманітні органічні та неорганічні речовини, які можуть спричинити евтрофікацію водойм, що веде до зниження рівня кисню в воді та загибелі водних організмів [35]. Газоподібні викиди, зокрема вуглекислий газ і леткі органічні сполуки, можуть спричинити зміни в якості повітря та сприяти парниковому ефекту [11].

Точки викиду відходів залежать від специфіки виробничого процесу. Тверді відходи, зазвичай, збираються на спеціалізованих полігонах або утилізуються на місці. Рідкі відходи можуть викидатися в каналізацію або поверхневі води після попередньої очистки, а гази викидаються через системи вентиляції [25].

Значимість впливу відходів на навколишнє середовище може бути візуалізована через лінійний графік, що показує динаміку концентрації забруднювачів у навколишньому середовищі відповідно до масштабу виробництва. Такий графік може виявити кореляцію між збільшенням виробництва та рівнями забруднення, допомагаючи визначити критичні точки, на яких вплив стає неприпустимим [15].

Для сталого розвитку важливо не лише впроваджувати технології очистки та утилізації, але й проводити постійний моніторинг викидів. Екологічні стандарти, такі як ISO 14001, можуть слугувати основою для систематичного підходу до управління екологічними аспектами виробництва [35].

Рис. 9.1.2. Динаміка забруднювачів від виробництва *Lactobacillus bulgaricus*

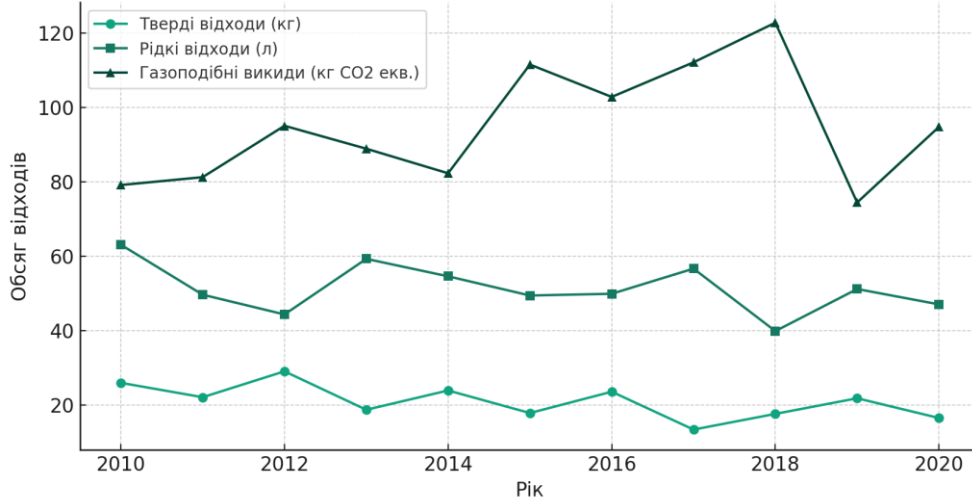


Рис. 9.1.2. Динаміка забруднювачів від виробництва *Lactobacillus bulgaricus*

На графіку відображено тенденції в обсягах відходів, які можуть бути корисними для аналізу ефективності заходів, спрямованих на зменшення впливу виробничих відходів на довкілля. Зокрема, можна спостерігати коливання у кількості твердих відходів, які можуть вказувати на зміни в технологічних процесах або ефективність систем утилізації. Аналогічно, зміни в обсягах рідких відходів та газоподібних викидів можуть відображати впровадження нових методів очищення або зміну у виробничих масштабах.

## 9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

Екологізація виробництва є сучасним напрямком розвитку промисловості, що передбачає впровадження технологій, орієнтованих на зниження негативного впливу на довкілля. У контексті культивування *Lactobacillus bulgaricus*, це стосується оптимізації використання ресурсів, мінімізації відходів та зменшення викидів шкідливих речовин.

Передусім, зосередження уваги на вторинній переробці та використанні відходів є одним з ключових аспектів екологізації. Наприклад, відходи біомаси можуть бути використані як джерело для виробництва біогазу або як органічні добрива в агропромисловості [22]. Це не тільки зменшує обсяги відходів, що потрібно утилізувати, але й створює додаткові джерела доходу для підприємств.

Очищення стічних вод може бути покращене за допомогою передових

біологічних методів, таких як мембранні біореактори, які забезпечують видалення органічних забруднювачів та патогенів до безпечного рівня [13]. Подальше використання очищених вод для технічних потреб або зрошування земель може значно зменшити споживання водних ресурсів.

Зниження газоподібних викидів є ще однією важливою ціллю. Застосування систем каптурації вуглекислого газу та його подальше використання, наприклад, в тепличних господарствах, може стати ефективним рішенням для скорочення парникових газів [6]. Крім того, інвестиції у вдосконалення вентиляційних систем та фільтрації повітря дозволять зменшити присутність шкідливих летких органічних сполук.

Упровадження принципів зеленої хімії на стадії дизайну виробничих процесів може відіграти значущу роль у екологізації. Це включає використання нетоксичних матеріалів, зниження використання хімічних реагентів та перехід на більш екологічні розчинники [27].

Цифровізація та використання систем управління даними дозволяють оптимізувати виробничі потоки, знижуючи витрати енергії та матеріалів. Це включає в себе автоматизацію контролю якості, моніторинг робочих процесів та аналітику великих даних для прогнозування та запобігання неефективних операцій [16].

Розвиток зеленої логістики та збільшення ефективності транспортування та зберігання також є частиною системи екологізації. Це означає оптимізацію ланцюгів поставок, зниження викидів від транспортних засобів та покращення упаковки для зменшення відходів .

Загалом, перспективи впровадження системи екологізації виробництва *Lactobacillus bulgaricus* обіцяють не тільки зниження екологічного відбитку підприємства, але й підвищення його економічної ефективності та соціальної відповідальності.

### **9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

Рідкі відходи, які генеруються в процесі культивування *Lactobacillus bulgaricus*, можуть включати залишки культуральних середовищ, мийні розчини та інші побічні продукти. Ці відходи можуть мати високий вміст органічних речовин, нутрієнтів та мікроорганізмів, що вимагає ефективних методів очищення перед їх викидом у навколишнє середовище.

Перш за все, необхідно здійснювати первинну обробку, яка включає в себе механічне видалення твердих частинок та відстоювання, з метою відділення важких фракцій від рідини. Далі, біологічна очистка з використанням аеробних та анаеробних технологій дозволяє розкласти органічні забруднювачі. Аеробні системи, такі як активний мул, використовують кисень для перетворення органічних речовин у воду, вуглекислий газ та біомасу. Анаеробне знешкодження відбувається в умовах відсутності кисню і є ефективним для переробки висококонцентрованих органічних відходів, що додатково призводить до утворення біогазу.

Також використовуються хімічні методи очищення, включно з коагуляцією та флотацією, для видалення розчинних забруднювачів та підвищення ефективності біологічної обробки. Адсорбційні методи, такі як використання активованого вугілля, дозволяють видалити забарвлення, запахи та токсичні речовини.

Однією з передових технологій є мембранна фільтрація, яка включає в себе мікро-, ультра- та нанофільтрацію, а також обернений осмос. Ці методи забезпечують високий рівень видалення забруднювачів, включаючи бактерії та віруси, і можуть бути інтегровані в системи замкнутого водопостачання, що знижує загальні водні витрати виробництва.

Для знешкодження специфічних токсичних компонентів, таких як важкі метали або пестициди, можуть бути застосовані методи іонного обміну, електродіалізу чи спеціалізовані біологічні системи з використанням специфічних штамів мікроорганізмів, що здатні метаболізувати чи адсорбувати ці речовини.

Втім, не варто ігнорувати інтегрований підхід до управління відходами, який передбачає зменшення утворення відходів на етапі проектування виробництва та використання екологічних технологій в усіх процесах.

Таблиця 9.2.1.

Метод	Опис	Застосування	Ефективність	Особливості
Механічна обробка	Відстоювання, фільтрація	Первинна обробка	Низька до середньої	Простота впровадження
Активний мул	Аеробна біологічна обробка	Біологічні відходи	Висока	Потребує постійного моніторингу
Анаеробна обробка	Без кисню, утворення біогазу	Висококонцентровані органічні відходи	Висока	Генерація альтернативного джерела енергії
Коагуляція та флоатація	Хімічне осідання забруднювачів	Розчинні відходи	Середня до високої	Вимагає застосування хімічних реагентів
Адсорбція	Використання адсорбентів, як активоване вугілля	Запахи, токсини, забарвлення	Висока	Висока вартість адсорбентів
Мембранна фільтрація	Мікро-, ультра-, нанофільтрація, обернений осмос	Всі типи відходів	Дуже висока	Високі капітальні вкладення
Іонний обмін	Видалення важких металів та інших іонів	Токсичні відходи	Висока	Специфічність до певних іонів
Електродіаліз	Використання електричного поля для видалення речовин	Важкі метали, солі	Середня до високої	Висока енерговитратність
Біологічні системи	Використання спеціалізованих мікроорганізмів	Специфічні органічні забруднювачі	Висока	Необхідність у високоспеціалізованих штаммах

## Методи знешкодження рідких відходів

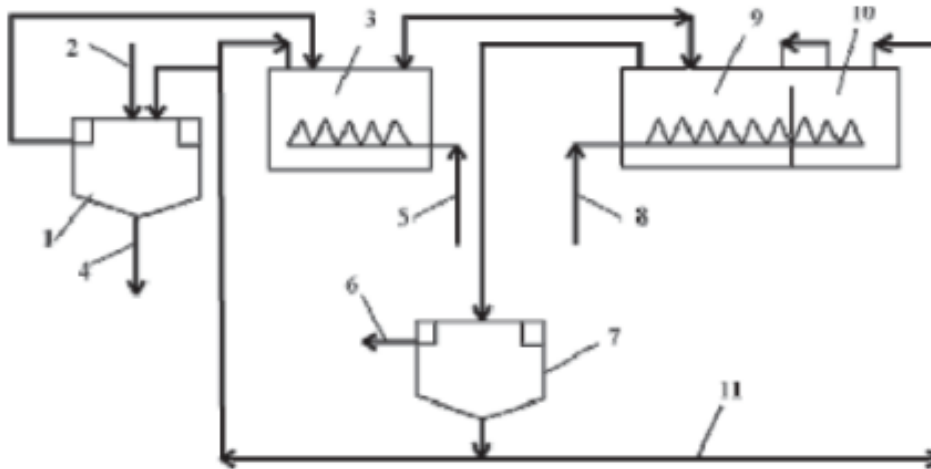


Рис. 9.2 Схема установки для біологічного очищення стічних вод: 1- первинний відстійник; 2 - вхідні стічні води на очищення; 3 - преаератор; 4 - осад; 5, 8 - повітря; 6 - очищені стічні води; 7 - вторинний відстійник; 9 - аеротенк; 10 - регенератор; 11 – активний мул [58].

Технології переробки та повторного використання рідких відходів відіграють важливу роль у стійкому управлінні водними ресурсами в промисловості. Вони не тільки зменшують навантаження на природні водойми, але й забезпечують зниження операційних витрат і покращують екологічний імідж компанії.

Однією з ключових технологій є біологічна переробка рідких відходів, яка використовує здатність мікроорганізмів трансформувати органічні забруднювачі в безпечні або навіть корисні продукти. Наприклад, анаеробне перетворення може здійснюватися в біореакторах для виробництва біогазу, який потім може бути використаний як джерело енергії [21]. Це не тільки знижує викиди парникових газів, але й забезпечує виробництво альтернативної енергії.

Іншим напрямком є мембранні технології, такі як обернений осмос або нанофільтрація, які дозволяють видалити з рідких відходів майже всі забруднювачі, перетворюючи їх на технічно чисту воду, готову до повторного використання [32]. Ця вода може бути повернута в виробничий процес або використана для зрошення або інших потреб.

Крім цього, важливим аспектом є фізико-хімічні методи, такі як

електрокоагуляція та флотація, які ефективно видаляють суспендовані частки, олії та метали [15]. Ці технології можуть бути комбіновані з біологічними методами для підвищення ефективності очищення.

Доцільне використання рідких відходів в агропромисловому комплексі є ще одним напрямком переробки. Очищені відходи можуть слугувати джерелом води та нутрієнтів для зрошення сільськогосподарських культур, зокрема, в регіонах з дефіцитом водних ресурсів [18].

Активна участь у програмах "нульових відходів" та "закритого циклу" дозволяє компаніям реалізовувати концепцію циркулярної економіки, де ресурси повторно використовуються на максимум, а відходи мінімізуються [40].

Для підтримки цих технологій, важливим є впровадження систем екологічного менеджменту, як ISO 14001, що вимагає від підприємств здійснювати моніторинг, контроль та постійне покращення відносно екологічного впливу своєї діяльності [34].

Враховуючи зростаючу увагу до екологічних питань, технології переробки та повторного використання рідких відходів можуть відіграти ключову роль не тільки у зменшенні впливу на довкілля, але й у забезпеченні сталого розвитку виробництва *Lactobacillus bulgaricus*.

### **9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

Мінімізація твердих відходів у процесі культивування *Lactobacillus bulgaricus* є ключовим аспектом для забезпечення екологічної стійкості та ефективності виробництва. Це включає не лише зменшення обсягів відходів, але й їх повторне використання та ресурсоощадливе управління.

Оптимізація процесів виробництва є першим кроком у мінімізації твердих відходів. Це може включати в себе застосування точних дозувань сировини та реагентів, що знижує кількість відходів на етапі підготовки культуральних середовищ [9]. Також, використання сучасних методів контролю якості дозволяє вчасно виявляти несправності та відхилення в процесі, запобігаючи непотрібному виробництву відходів [14].

Переробка та повторне використання відходів є ще однією важливою

стратегією. Наприклад, тверді біологічні відходи, такі як відмерлі клітини бактерій, можуть бути використані в якості органічних добрив або для виробництва біогазу [21]. Такий підхід не тільки зменшує необхідність утилізації, але й перетворює відходи на цінний ресурс.

Вдосконалення упаковки може суттєво знизити кількість твердих відходів. Використання біорозкладаних або перероблених матеріалів для упаковки продуктів сприяє екологічній стійкості та зменшує відходи. Крім того, проекти зменшення розмірів та ваги упаковки можуть ефективно скоротити кількість генерованих відходів [30].

Застосування принципів циркулярної економіки в процесах виробництва допомагає створити систему, де відходи одного процесу служать сировиною для іншого. Наприклад, відходи упаковки можуть бути зібрані та використані як сировина у виробництві інших товарів [24]. Це не лише зменшує потребу в нових ресурсах, але й забезпечує зниження впливу на довкілля.

Співпраця з ланцюгами поставок може включати в себе роботу з постачальниками та партнерами для зниження кількості твердих відходів. Наприклад, заохочення постачальників до використання повторно використовуваних або екологічно чистих матеріалів у своїх продуктах та упаковці може знизити кількість відходів, що генеруються на всіх етапах ланцюга поставок .

Освіта та залучення співробітників до процесів екологічної стійкості є важливою складовою успіху. Проведення навчань та семінарів для підвищення обізнаності персоналу щодо важливості мінімізації відходів може сприяти культурі сталого виробництва на підприємстві [35].

Враховуючи важливість екологічної стійкості у сучасному світі, мінімізація твердих відходів у процесі культивування *Lactobacillus bulgaricus* є не лише екологічно необхідною, але й економічно доцільною стратегією, що може забезпечити тривалу конкурентоспроможність підприємства.

Утилізація та переробка твердих відходів, що утворюються під час культивування *Lactobacillus bulgaricus*, може перетворити потенційні забруднювачі на цінні вторинні ресурси. Це не тільки сприяє сталому розвитку та зниженню

екологічного впливу, але й може принести економічні переваги.

Компостування є одним з основних методів переробки органічних твердих відходів. Відходи біомаси, що утворюються під час виробництва, такі як відмерлі мікроорганізми, можуть бути перетворені на високоякісне органічне добриво через компостування [19]. Це не тільки допомагає зменшити обсяг відходів, але й сприяє поліпшенню ґрунтової родючості.

Виробництво біогазу через анаеробне бродіння є ще одним ефективним способом використання органічних твердих відходів. Ця технологія дозволяє перетворити відходи на біогаз, який може використовуватися як альтернативне джерело енергії для обігріву, електрогенерації або навіть у якості палива [29].

Рециклінг упаковки є критично важливим для зниження кількості пластикових і картонних відходів. Використання повторно перероблених матеріалів для упаковки продуктів та заохочення споживачів до повторного їх використання або повернення допомагає знизити екологічний відбиток [24].

Піроліз та газифікація є передовими методами переробки, які перетворюють тверді відходи на синтетичний газ, олію або вуглець через термічне розкладання. Ці продукти можуть використовуватися як енергетичні носії або хімічні сировини [12].

Утилізація відходів у будівельній індустрії може бути реалізована через використання деяких твердих відходів, як вторинних будівельних матеріалів, наприклад, у виробництві цегли або як заповнювачів у бетоні [28].

Розвиток інноваційних продуктів на основі відходів, таких як виробництво біопластиків чи інших біорозкладаних матеріалів, відкриває нові можливості для створення цінності з відходів. Це може включати розробку нових типів упаковок, текстильних матеріалів або навіть компонентів для електроніки [16].

Економічні стимули та сертифікація є важливими для залучення інвестицій у технології переробки відходів. Урядові програми, податкові пільги та екологічні сертифікати можуть сприяти впровадженню екологічно ефективних практик [25].

Ураховуючи зростаючу важливість екологічних питань, ефективне управління твердими відходами та їх перетворення на вторинні ресурси є важливим елементом сталого розвитку промисловості *Lactobacillus bulgaricus*. Це не тільки знижує

негативний вплив на довкілля, але й сприяє економічній вигоді та соціальній відповідальності підприємства.

### **9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів**

Оцінка та контроль газоповітряних викидів у процесі виробництва *Lactobacillus bulgaricus* є важливою складовою екологізації виробництва. Сучасні вимоги до охорони довкілля вимагають не тільки вимірювання та моніторингу концентрацій шкідливих речовин у викидах, але й їх ефективного видалення та зниження до безпечних рівнів.

Методи оцінки включають в себе як безперервний, так і періодичний моніторинг складу та обсягів викидів. Використання автоматизованих систем збору даних дозволяє своєчасно виявляти перевищення допустимих рівнів шкідливих речовин і оперативно реагувати на такі ситуації [25].

Системи контролю можуть бути інтегровані в процеси управління виробництвом. Застосування принципів "кращих доступних технологій" (BAT) допомагає оптимізувати процеси з метою мінімізації викидів. Наприклад, оптимізація параметрів ферментації може знизити кількість утворення вуглекислого газу [14].

Технології зниження викидів можуть включати фізичні, хімічні та біологічні методи очищення. Фізичні методи, такі як конденсація та адсорбція, ефективні для видалення окремих компонентів викидів. Хімічні методи, включно з нейтралізацією та окисленням, використовуються для перетворення шкідливих речовин у нешкідливі [9]. Біологічні методи, такі як біофільтрація, використовують спеціалізовані мікроорганізми для перетворення або адсорбції забруднювачів [30].

Управління викидами включає розробку та реалізацію планів дій для зменшення викидів. Це може включати заходи щодо заміни сировини на менш забруднюючі, модернізацію обладнання, впровадження нових технологій очищення газів та покращення управлінських практик [24].

Соціальна відповідальність та прозорість у сфері оцінки впливу на довкілля відіграють значущу роль. Публічне інформування про рівень викидів, заходи щодо їх

контролю та зменшення, а також участь у програмах екологічної відповідальності можуть забезпечити позитивний імідж та довіру споживачів [11].

Для систематизації підходів до біологічного очищення газів, наведемо таблицю класифікації установок.

Таблиця 9.1

Класифікація установок біологічного очищення газів

Тип установки	Робочий елемент установки	Система зрошування	Основні стадії видалення домішок з газів, що відходять	Джерело мінеральних солей
Біофільтр	Натуральний органічний матеріал (напр., кора, компост)	Періодичне або постійне	Адсорбція, абсорбція, біодеградація	Розчини мінеральних добрив
Біоскрubber	Розчин з мікроорганізмами	Постійне зрошування	Абсорбція, біодеградація	Розчини мінеральних добрив

На рис. 9.3 наведено схему будови біофільтра та на рис. 9.4 – схему роботи типового біоскрубера.

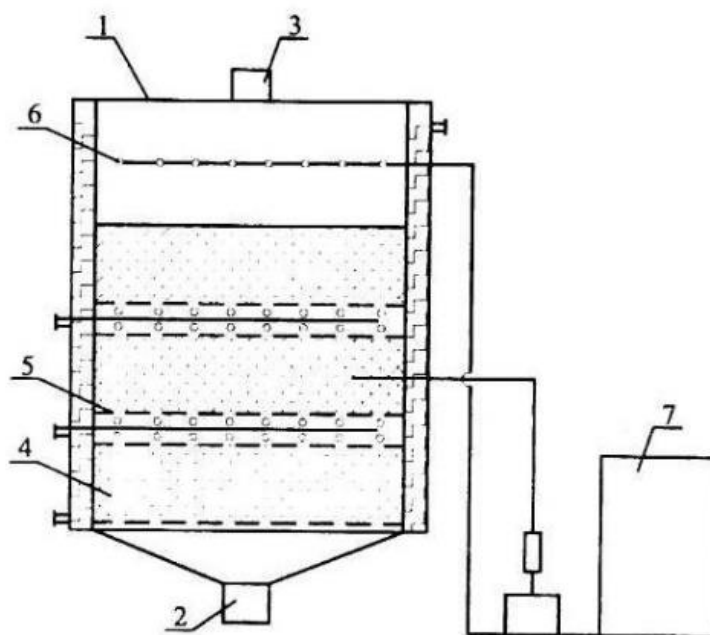
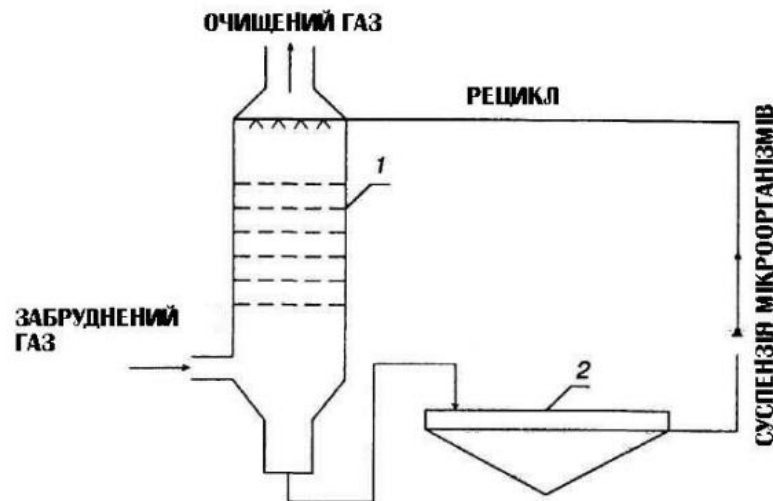


Рис. 9.3 Схема будови біофільтра:

1- корпус, виконаний з листової сталі; 2 - патрубок уведення газу на

очищення; 3 - кришка із зазорами для виходу очищеного повітря; 4 – фільтрувальні шари (перший і третій шар виконані з суміші торфу і тирси, другий і четвертий з керамзиту, причому висота парних шарів складає в середньому 10 % товщини непарних шарів; 5 - сітки з полімерного матеріалу; 6 зрошувачі; 7 - резервуар з розчином мінеральних солей [66].



*Рис. 9.4. Схема роботи типового біологічного скрубера*

Порівняно з біофільтрами, біоскрубери займають менше місця, оскільки їхні вежі мають лише кілька метрів заввишки. Однак експлуатаційні витрати є вищими, оскільки процеси біологічного очищення води потребують значних витрат. Біоскрубери ефективні, коли в повітрі присутні високорозчинні токсичні речовини. Ефективність очищення повітря у біоскруберів вища, ніж у біофільтрів [67].

#### **9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

Закон "Про відходи" передбачає, що на заходи щодо зменшення обсягів утворення відходів можуть використовуватися кошти місцевих бюджетів, фондів охорони навколишнього природного середовища, добровільні внески підприємств, установ, організацій, громадян та їх об'єднань, а також кошти Державного бюджету України, передбачені на реалізацію заходів. Точний розмір не визначено [62].

Таким чином, підприємствам та організаціям необхідно розробляти та впроваджувати заходи щодо поводження з відходами, зокрема

- Заходи з мінімізації утворення відходів;
- Зменшення небезпеки відходів;
- Забезпечення комплексного використання матеріальних ресурсів;
- Забезпечення повного вилучення та своєчасної утилізації відходів;
- Дотримання екологічних норм і правил безпеки при поводженні з відходами;
- максимальне повторне використання відходів шляхом прямого повторного або альтернативного використання відходів; організація контролю за місцями та об'єктами розміщення відходів [62].

Однак, з іншого боку, повернення всіх видів зворотних відходів тягне за собою додаткові витрати, такі як витрати на зв'язок з виробниками та постачальниками субстанцій і матеріалів, витрати на виявлення неякісних субстанцій і матеріалів, витрати на документальне оформлення повернення матеріальних ресурсів, витрати на пакування та транспортування матеріальних ресурсів та втрати від виробництва неякісних лікарських засобів [71].

## ВИСНОВКИ

1. Пробиотики – це нешкідливі для людини мікроорганізми, вони здатні відновлювати нормальну мікрофлору органів, а також згубно діють на патогенні та умовно-патогенні бактерії.

2. Молочнокисле бродіння, яке викликають лактобактерії є основою для виробництва молочнокислої продукції такої як йогурт. Закваска для виробництва йогурту виробляється на основі заквашувальної композиції, яку утворюють бактерії роду *Lactobacillus*.

3. Досліджено, що для отримання заквашувальних композицій для виробництва молочнокислих продуктів, таких як йогурти, можна використовувати лактобактерії *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Встановлено, що для виробничого культивування та отримання продуктивної біомаси біомаси *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* найкраще використовувати MRS середовище, що володіє високими ростовими якостями.

4. Розроблено та запропоновано методи очищення стічних вод та викидів. А також технічні, гігієнічні, медичні заходи та заходи особистого захисту для запобігання негативному впливу бактерій на здоров'я людини.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Машкін М. І., Париш Н. М. Технологія молока і молочних продуктів: Навчальне видання. — К.: Вища освіта, 2006. — 351 с.: іл. ISBN 966-8081-53-6
2. ДСТУ 4343:2004. ЙОГУРТИ Загальні технічні умови. Чинний від 2005-10-01. Вид. офіц. Київ : Науково-редакц. від. ДП «УкрНДНЦ» 01150, Київ, вул. Святош., 2, 2005. 11 с. URL: <https://studfile.net/preview/5594282/> (дата звернення: 10.11.2021).
3. Закваска Іпровіт-Йогурт з ацидіфільною паличкою. Іпровіт закваска. URL: <https://www.iprovit-shop.com.ua/ru-4538770/zakvaska-iprovityogurt-s-atsidofilnoy-palochkoj-d8.htm> (дата звернення: 03.11.2021).
4. Гудима В. В., Науменко О. В. Інноваційні закваски науковцями нашого підприємства. Іпровіт закваски. 2018. Ін-т продовол. ресурсів НААН. URL: <https://www.iprovit-shop.com.ua/blog/innovacijni-zakvaski-naukovcaminasogo-pidприємства> (дата звернення: 04.11.2021).
5. СКЛАД ЙОГУРТУ : пат. 105131 Україна : А23С 9/12 (2006.01). № u 2015 07407 ; заявл. 23.07.2015 ; опубл. 10.03.2016, Бюл. № 5. 5 с.
6. А.У. Tamime, R.K. Robinson, «9 – Nutritional value of yoghurt,» in Tamime and Robinson's Yoghurt (Third Edition), edited by A.У. Tamime and R.K. Robinson, Woodhead Publishing, 2007, pp. 646-684. ISBN 9781845692131.
7. А.У. Tamime, R.K. Robinson, «1 – Historical background,» in Tamime and Robinson's Yoghurt (Third Edition), A.У. Tamime, R.K. Robinson (Eds.), Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing, 2007, pp. 1-12. ISBN 9781845692131.
8. Hui, Y.H. (2006). Handbook of Food Science, Technology, and Engineering (Vol. 2). CRCNET books. ISBN: 9780849398483.
9. Farnworth, E.R. (2008). Handbook of Fermented Functional Foods, Second Edition. Functional Foods and Nutraceuticals. ISBN: 9781420053265.
10. Settachaimongkon S., Nout M. J. R., Antunes Fernandes E. C. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus*

*delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, 177, 29–36. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.008

11. Panahi S., Fernandez M. A., Marette A., Tremblay A. Yogurt, diet quality and lifestyle factors. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2016, 71(5), 573–579. doi:10.1038/ejcn.2016.214

12. Savaiano D. A., Hutkins R. W. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review. *Nutrition Reviews*. 2020, 79(5), 599–614. doi:10.1093/nutrit/nuaa013

13. Виробництво промислової продукції за видами [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2016/pr/vr\\_rea\\_ovpp/vr\\_rea\\_ovpp\\_u/arh\\_vpp\\_v\\_u.html](https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2016/pr/vr_rea_ovpp/vr_rea_ovpp_u/arh_vpp_v_u.html)

14. ЙОГУРТ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.zakvaski.com/production/yoghurt-new-vivo.html>

15. ПРОБІО ЙОГУРТ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.zakvaski.com/production/probio-yogurt-vivo.html>

16. ВЕГАН ЙОГУРТ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.zakvaski.com/production/vegan-yogurt.html>

17. ФІТ-ЙОГУРТ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.zakvaski.com/production/fityougurt.html>

18. Закваска для приготування йогурту [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cheesemaster.com.ua/ua/p1150038532-nabor-shtuk-zakvaska.html>

19. Закваска Іпровіт-Йогурт [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.iprovit-shop.com.ua/ru-4538770/zakvaska-iprovit-yogurt-d9.htm>

20. Закваска Іпровіт-Йогурт з ацидофільною паличкою [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.iprovit-shop.com.ua/ru-4538770/zakvaska-iprovit-yogurt-z-atsidofilnoyu-palichkoju-d8.htm>

21. Закваска Іпровіт-Йогурт з біфідобактеріями [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.iprovit-shop.com.ua/ru-4538770/zakvaska-iprovit-yogurt-z-bifidobakteriyami-d24.htm>

22. BACILLUS BULGARICUS [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bacillusbulgaricus.com/>
23. How Much Starter To Use [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bacillusbulgaricus.com/how-much-starter-to-use/>
24. Сидоров Ю.І. Пілотні ферментери ємнісного типу // Біотехнологія. – 2012. - № 2. – С. 68–75
25. Yogurt Starter [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bacillusbulgaricus.com/yogurt-starter/>
26. Mende S., Krzyzanowski L., Weber J., Jaros D., Rohm H. Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012, 113(2), 185–191. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.10.012
27. Pilot Scale Fermentor: SDS-100/200/300/500/700L [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sidolim.com/Pilot%20Scale%20Fermentor%20200L.html>
28. 200L BIOREACTOR / MILK FERMENTER [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.keyopharmachine.com/200L-BIOREACTOR--MILK-FERMENTER-p.html>
29. Mirpuri J. *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) regulates IL-10 signaling in the developing murine colon through upregulation of the IL-10R2 receptor subunit / J. Mirpuri. // *PLoS One*. – 2012. – №7.
30. De Keersmaecker S. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid / S. De Keersmaecker, J. Desair. // *FEMS Microbiol Let.* – 2006. – №259. – С. 89–96.
31. Hatakka K. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children / K. Hatakka, L. Näse, K. Savilahti. // *Caries Res.* – 2001. – №35.
32. Fang Y. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health / Y. Fang, B. Polk. // *Funct Food Rev.* – 2012. – №4. – С. 77–84.

33. Pace F. Probiotics in digestive diseases: focus on Lactobacillus GG / F. Pace, M. Pace, G. Quartarone. // Minerva Gastroenterol Dietol. – 2015. – №61. – С. 273–292.
34. Koryszewska-Bagińska A. Comparative genomics and functional analysis of a highly adhesive dairy Lactobacillus paracasei subsp. paracasei IBB3423 strain / A. Koryszewska-Bagińska, J. Gawor. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2019. – №103. – С. 7617–7634.
35. IMT SN NITROGEN GENERATOR [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.inmatec.de/en/nitrogen-imt-sn.html>
36. Каустична сода [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p694734755-kausticheskaya-soda-granula.html?&primelead=Mі43NA>
37. DEZALDUM 20 [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://aveal.com.ua/item\\_N3789.htm?gclid=Cj0KCQiA4NWrBhD-ARIsAFCKwWsn4IOhc-n48xWQK\\_Dz1tvXkTizAr5EnEFUmKIIAqsA9vaQ2X1B0qIaAiEeEALw\\_wcB](https://aveal.com.ua/item_N3789.htm?gclid=Cj0KCQiA4NWrBhD-ARIsAFCKwWsn4IOhc-n48xWQK_Dz1tvXkTizAr5EnEFUmKIIAqsA9vaQ2X1B0qIaAiEeEALw_wcB)
38. ЕКСАН ПРО ДЕЗ [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://www.zineko.com.ua/index.php/2010-07-18-10-18-44?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=2251&category\\_id=70](http://www.zineko.com.ua/index.php/2010-07-18-10-18-44?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=2251&category_id=70)
39. MRS Broth [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU454061.pdf>
40. Yeast Media [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/233510.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/233510.pdf)
41. Фільтр грубого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/types/mesh/>
42. Компресор [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50>
43. Теплообмінник-охолоджувач [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuvachi/>
44. Stainless steel 10L stirred tank reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.alibaba.com/product-detail/Stainless-steel-10L-1000L-continuous-stirred\\_1600558955976.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Stainless-steel-10L-1000L-continuous-stirred_1600558955976.html)

45. 5L Double-Layer Stainless Steel Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.nanbeinstrument.com/glass-reactor/stainless-steel-reactor/5l-double-layer-stainless-steel-reactor.html>

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

47. Stainless Steel Bioreactor 20L [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.fermentor-bioreactor.com/sale-11615756-magnetic-stirred-stainless-steel-bioreactor-20l-200l-glass-rotameter-ring-sparger.html>

48. Апарати сталі емальовані з механічним змішуючим пристроєм [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://euromash.kiev.ua/ua/aparati\\_emal\\_mehaniceskim\\_perem\\_ustroystvom\\_ua.php](https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehaniceskim_perem_ustroystvom_ua.php)

49. Перистальтичний насос [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://agro-teh.com.ua/ua/p559837858-peristalticheskij-nasos-dozator.html?source=merchant\\_center&gad\\_source=1&gclid=Cj0KCQiA4NWrBhD-ARIsAFCKwWtKw51TE87wAwvp--SJ0wakc1dWudFEECV2eAxWzTr1NgQZK7VUsSwaAtE4EALw\\_wcB](https://agro-teh.com.ua/ua/p559837858-peristalticheskij-nasos-dozator.html?source=merchant_center&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiA4NWrBhD-ARIsAFCKwWtKw51TE87wAwvp--SJ0wakc1dWudFEECV2eAxWzTr1NgQZK7VUsSwaAtE4EALw_wcB)

50. Насос KOER відцентровий [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://drop.ua/nasos-poverkhnostnyi-koer-tsentrobezhnyi-dlia-chystoi-vody-js-600-600vt-2.7m-ch-hmax-40m-kp2662/?utm\\_source=google&utm\\_medium=merchant&utm\\_campaign=GoogleShopping\\_free\\_listing&gclid=Cj0KCQiA4NWrBhD-ARIsAFCKwWu7HkZB\\_SwgAkk4NvTUvft-qk8pyhGvtpcHQODg343feWDN-UzttjAaAtbfEALw\\_wcB](https://drop.ua/nasos-poverkhnostnyi-koer-tsentrobezhnyi-dlia-chystoi-vody-js-600-600vt-2.7m-ch-hmax-40m-kp2662/?utm_source=google&utm_medium=merchant&utm_campaign=GoogleShopping_free_listing&gclid=Cj0KCQiA4NWrBhD-ARIsAFCKwWu7HkZB_SwgAkk4NvTUvft-qk8pyhGvtpcHQODg343feWDN-UzttjAaAtbfEALw_wcB)

51. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ КОНЦЕНТРАТІВ ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ КОНЦЕНТРАТІВ. ТОВ "ПРОПІОНІКС". URL: <http://propionix.ru/tehnologiya-polucheniya-bakterialnyh-konzentratov> (дата звернення: 06.11.2021).

52. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

53. P. Teixeira, LACTOBACILLUS | *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Academic Press, 2014, Pages 425-431, ISBN 9780123847331, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00177-4>
54. Mende, S., Krzyzanowski, L., Weber, J., Jaros, D., & Rohm, H. (2012). Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM 20081 in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(2), 185-191.
55. RIDA@CUBE Lactose / D-Glucose, R-Biopharm <https://food.r-biopharm.com/products/ridacube-lactose-d-glucose/>
56. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія“ спец. “Технологія продуктів бродіння і виноробства” / Укл.: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К: НУХТ, 2011. – 53 с.
57. Буряк, Н. Б., Лукаш, С. В. (2012). Проблеми збирання, транспортування та утилізації твердих побутових відходів в Україні. Науковий вісник НЛТУ України, 22(5), 82–90.
58. Месарош, Р., Барань, Ш. (2013). Видалення зі стічних вод речовин, що впливають на гормональну систему живих організмів. Вода і водоочисні технології. Науково-технічні вісті, 4 (10), 25–26.
59. Проданчук, М. Г., Пов'якель, Л. І., Бобильова, О. О., Бережнов, С. П. (2012). Класифікація медичних відходів з урахуванням факторів небезпеки у проекті ДСанПіН “Правила поведінки з медичними відходами”. Сучасні проблеми токсикології, (1), 57-68.
60. Пузик, В. К., Рожков, Р. В., Долгова, Т. А. (2014) Знешкодження та утилізація відходів. Навчальний посібник. Харків: ХНАУ. 220 с.
61. Сагайдак-Нікітюк, Р. В. (2013). Класифікація відходів фармацевтичної галузі. Проблеми військової охорони здоров'я, (40), 296–303.
62. Самойленко, Н. М., Єрмакович, І. А. (2014). Вплив фармацевтичних препаратів та їх похідних на навколишнє середовище. Вода і екологія,(2), 78–87.

63. Класифікація медичних відходів // Вісник екологічної безпеки. – 2013. – № 8. – С. 34-37.
64. Проект «Державні санітарні правила і норми поводження з відходами лікувально-профілактичних закладів», запропонований для публічного обговорення.
65. Медичні відходи . – [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://есоunion.ua/publ/2-1-0-4>
66. Кривомаз Т. В. Питання утилізації ліків залишається відкритим. / Т. В. Кривомаз // Фармацевт Практик. – 2015. – № 9. – С. 23-27.
67. Фармацевтичні відходи. – [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://есоunion.ua/publ/2-1-0-5>
68. А.І.Горова, С.М.Лисицька, А.В.Павличенко, Т.В.Скворцова Біотехнології в екології: навчальний посібник. – Д.: Національний гірничий університет, 2012. – 184с.
69. Ігнатюк О. А. Основні екологічні принципи та концепції екологічної біотехнології: Навч. посіб. – К.: ВПІ ВПК «Політехніка», 2006. – 268 с.
70. Попович О. Р. Проблема утилізації небезпечних медичних відходів на прикладі України та Польщі. / О. Р. Попович, Ю. Й. Ягчишин, М. С. Мальований, Н. Ю. Воронська // Львівська політехніка – УДК 628.46
71. Виговська Г. П. Організаційно-економічні засади управління відходами на регіональному рівні / Г. П. Виговська, В. С. Міщенко // Проблеми збору, переробки і утилізації відходів: зб. наук. ст. – Одеса, 2000. – С. 21-30.