

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

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

« » червня 2023 р.

« » червня 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Одержання біомаси *Lactobacillus acidophilus* для виробництва ацидофіліну

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3

СИНЯВСЬКА Дар'я Андріївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ГРЕГІРЧАК Наталія Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Олександр КРАВЧЕНКО
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2023 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 СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СИНЯВСЬКОЇ Дар’ї Андріївни

(прізвище, ім’я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Lactobacillus acidophilus* для виробництва ацидофіліну

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

затвержені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-к

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Lactobacillus acidophilus*, цільовий продукт: біомаса молочнокислих бактерій, кисломолочний продукт ацидофілін

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва. РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	01.03.2023 – 05.03.2023	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	06.03.2023 – 12.03.2023	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	13.03.2023 – 19.03.2023	
4.	Біосинтез цільового продукту	20.03.2023 – 26.03.2023	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.03.2023 – 02.04.2023	
6.	Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	03.04.2023 – 09.04.2023	
7.	Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	10.04.2023 – 20.04.2023	
8.	Контроль виробництва	21.04.2023 – 30.04.2023	
9.	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	01.05.2023 – 05.05.2023	
10.	Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	06.05.2023 – 09.05.2023	
11.	Оформлення пояснювальної записки	10.05.2023 – 21.05.2023	
12.	Виконання графічної частини проекту	22.05.2023 – 31.05.2023	

Здобувач

_____ (підпис)

Дар'я СИНЯВСЬКА

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Наталія ГРЕГІРЧАК

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу біомаси штаму *Lactobacillus acidophilus*, отриманого з коледжу Наук про життя та інженерії Шеньсійського науково-технічного університету в місті Сіань, для виробництва ацидофіліну, який синтезує на середовищі з глюкозою 7 г/л цільового продукту – біомаси та має досить високу кількість життєздатних клітин - $2,72 \cdot 10^9$ КУО/мл. Ацидофілін – це дієтичний кисломолочний продукт, який використовується для профілактики і лікування хвороб органів травлення, зокрема шлунково-кишкового-тракту. Згідно обґрунтування норми споживання ацидофіліну було розраховано потужність виробництва біомаси *L. acidophilus* для одержання сухої бактеріальної закваски, що становить 129,77 кг/рік.

Технологія виробництва цільового продукту передбачає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, мийних та дезінфікуючих засобів, обладнання, виробничих приміщень, персоналу, приготування та стерилізація поживних середовищ, підготовка розчинів титрувальних агентів), технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах в термостаті, в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л) та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7)). Технологія отримання біомаси включає періодичне глибинне культивування в мікроаерофільних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу. Розроблено карту постадійного контролю та описано основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту.

Кваліфікаційна робота викладена на 125 сторінках, містить 16 таблиць, 24 рисунки, складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (109 найменувань), 7 додатків, технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: біомаса, *Lactobacillus acidophilus*, ацидофілін, бактеріальна закваска, функціональні продукти, біосинтез.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ...	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	22
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	24
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	34
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	34
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	36
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	41
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	41
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	41
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	45
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	46
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	51
5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту	55
5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів	59
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	62
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	67
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	81
8.1. Мікробіологічний контроль.....	81
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	84
8.2.1. Концентрація біомаси	84
8.2.2. Концентрація цільового продукту.....	85
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	85
8.3. Показники якості готового продукту.....	88

8.3.1.	Методи ідентифікації цільової речовини.....	88	
8.3.2.	Методи визначення фізико-хімічних властивостей та/або біологічної активності ..	89	
8.3.3.	Мікробіологічні показники якості кінцевого продукту	91	
8.4.	Карта постадійного контролю	95	
9.1.	Системи знешкодження рідких відходів	99	
9.2.	Системи знешкодження газоподібних відходів.....	100	
9.3.	Системи знешкодження твердих відходів.....	101	
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС			
ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА.....			102
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ			104
ДОДАТКИ			115

ВСТУП

На сьогоднішній день все більшої популярності набуває концепція «здорового» харчування. Перевагу надають продуктам функціонального призначення як стратегічному вектору прогресу розвитку харчової промисловості. Дані продукти виготовляють за інноваційними технологіями і розглядають не просто як джерела будівельних речовин та енергії, але й як складний немедикаментозний комплекс, що задовольняє фізіологічні потреби людського організму та має яскраво виражені лікувальні, профілактичні або оздоровчі властивості [1].

Згідно статистики на дисбактеріоз в Україні хворіє 65-75 % населення, серед дітей даний показник становить 95 %, тому вживання кисломолочних продуктів з метою попередження та лікування хвороб органів травлення є важливим аспектом [2]. Особливо тому, що більш ніж 80 % ринку молочної продукції функціонального призначення складають продукти з про- та/або пребіотиками, адже як відомо дані препарати з вмістом живих культур здатні значно покращувати мікрофлору кишківника, яка в свою чергу створює належні умови для функціонування та розвитку організму [3].

Важливу роль у формуванні корисних властивостей як мікрофлори кишечника, так і травного каналу у цілому, відведено пробіотичним мікроорганізмам, що належать до виду *Lactobacillus acidophilus*. Продукти виготовлені на основі біомаси *L. acidophilus* дуже корисні дітям від народження, жінкам «при надії», хворим під час реабілітації та людям похилого віку [4]. Надзвичайно корисними та цінними продуктами є ацидофільні напої, оскільки вони мають багатий біохімічний склад.

Зважаючи на те, що харчування є важливим фактором, який впливає на здоров'я та активне довголіття людини, а ацидофільні містить корисну пробіотичну мікрофлору, а також має безліч позитивних властивостей, які задовольняють потреби людини, то тема кваліфікаційної роботи є доволі **актуальною**.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>			<i>Вступ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>					7	1625
<i>Консульт.</i>						<i>КАФЕДРА БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

Продуцентами біомаси, на основі якої виготовляють закваску для ацидофіліну, можуть бути штами *L. acidophilus* DSMZ 20079, *L. acidophilus* TISTR 1138, *L. acidophilus* DGK, *L. acidophilus* ATCC-4356, *L. acidophilus* NRRL B-4495 та штам *L. acidophilus*, отриманий з коледжу Наук про життя та інженерії Шеньсійського науково-технічного університету в місті Сіань [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Штам *L. acidophilus*, отриманий китайськими вченими (He Chen, H., Niu, та ін.), має суттєву перевагу перед іншими, оскільки характеризується вищою здатністю до синтезу біомаси (7 г/л) та досить високою кількістю життєздатних клітин - $2,72 \cdot 10^9$ КУО/мл, а також найменшим часом культивування (12 год), тим самим забезпечуючи більшу кількість товарів молочної промисловості.

Мета кваліфікаційної роботи – спроектувати ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу біомаси бактеріями *L. acidophilus*, зокрема розробити технологічну та апаратурну схеми.

Новизною даної роботи є використання пробіотичного штаму *L. acidophilus*, що має яскраво виражені антиоксидантні та протизапальні властивості, з метою накопичення максимального виходу цільового продукту за короткий проміжок часу, культивуючи обраний мікроорганізм у мікроаерофільних умовах.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Ацидофілін – це дієтичний кисломолочний продукт, який виготовляють шляхом сквашування пастеризованого молока заквасками, до складу яких входить *Lactobacillus acidophilus* [11].

Ацидофілін виготовляють такими способами: термостатним та резервуарним.

Термостатний спосіб передбачає внесення закваски в підготовлене до заквашування молоко, далі одержаний напівфабрикат розливають у дрібну тару, яку поміщають в термостатну камеру, після цього сквашений ацидофілін передають на охолодження до температури не вище 8°C [12].

Резервуарний спосіб полягає в тому, що сквашування молока, дозрівання ацидофільного напою, а також його охолодження здійснюють у резервуарах великої ємкості. У тару подають готовий охолоджений продукт, на відміну від термостатного способу виготовлення ацидофіліну. Теплову обробку сировини проводять аналогічно термостатному способу, а 5% закваску вносять водночас або перед подачею молока в танк чи ванну. Резервуарний спосіб є економічно вигідним, враховуючи те, що вихід продукції на одиницю використаної виробничої площі більший у 1,5-2 рази, а витрати ручної праці в свою чергу нижчі на 25% [12, 13].

Для отримання ацидофіліну вищенаведеними способами, необхідно застосовувати суху бактеріальну закваску з такими характеристиками [14].

Склад:

- *Діючі речовини:* 1 флакон містить 0,5 г сухої ліофільно висушеної біомаси *L. acidophilus*.
- *Допоміжні речовини:* захисне середовище.

Форма випуску. Суха закваска для прямого внесення для виготовлення ацидофіліну у пластикових флаконах по 0,5 г готового продукту, у картонній пачці міститься 4 флакони. Також випускають суху бактеріальну закваску в поліетиленових пакетиках по 0,5 – 1 г по 5 пакетиків в пачці.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>			<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архив</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>					9	1625
<i>Консульт.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

Лікарська форма. Порошок для орального застосування.

Основні фізико-хімічні властивості. Порошок світло-бежевого кольору з кисломолочним запахом та смаком.

Фармакотерапевтична група. Антидіарейні мікробні препарати. Код АТХ А07F А [15].

Санітарно-мікробіологічні показники сухої бактеріальної закваски для виготовлення ацидофіліну на основі *L. acidophilus* передбачають відсутність БГКП та *Staphylococcus aureus* в 1,0 г закваски, патогенних мікроорганізмів, в тому числі сальмонел не повинно міститися в 10,0 г, дріжджів та плісневих грибів допускається не більше 5 КУО/г [14].

Властивості. Основна властивість ацидофільного напою полягає у пригніченні життєдіяльності патогенних мікроорганізмів, що мешкають у шлунково-кишковому тракті та провокують процеси гниття, за рахунок виділення потужних антимікробних речовин бактерією *L. acidophilus*, що є основою закваски. У результаті роботи цих природних антибіотиків мікрофлора шлунку і кишечника приходить в норму, а самопочуття і стан здоров'я людини в цілому значно покращується.

Для організму людини ацидофілін є цінним також тому, що містить у своєму складі такі вітаміни, як вітамін А (у формі ретинолу), вітаміни групи В, зокрема тіамін, рибофлавін та пантотенову кислоту, а також до складу даного кисломолочного продукту входить вітамін С [12].

Таким чином, біохімічний склад ацидофіліну дуже багатий, адже у ньому містяться вітаміни, мінерали, органічні кислоти, сахароза та молочний цукор (лактоза) [16].

Спосіб застосування. У домашніх умовах для приготування ацидофіліну вміст одного флакону закваски розчиняють у 3 л теплого молока (40 °С) та ретельно загортають каструлю у великий рушник, щоб суміш залишалася теплою. Отриману суміш сквашують протягом 8-10 год у теплому місці, коли продукт загусне, його охолоджують у холодильнику і тоді ацидофілін готовий до споживання.

На підприємствах закваску готують на цільному або знежиреному молоці, яке підлягає стерилізації при температурі 121 °С протягом 15-20 хв для виготовлення лабораторної закваски або пастеризації при 92-95 °С протягом 20-30 хв для приготування виробничої закваски. Після термообробки молоко охолоджують і вносять заквашуваний компонент в кількості 1-5 %, що залежить від умов виробництва.

Сфери застосування. Даний продукт застосовують у якості біологічної активної добавки до їжі – додаткового джерела пробіотичних мікроорганізмів, зокрема:

- для підтримки мікрофлори кишечника під час прийому антибіотиків та інших лікарських препаратів;
- для підвищення імунітету і гематологічних показників периферичної крові;
- для зменшення цукру в крові хворих на цукровий діабет;
- для зменшення алергічних реакцій;
- при стресах;
- для дитячого харчування [17].

Найбільш відомим кисломолочним продуктом, що виготовляється на основі моновидової закваски до якої входить *L. acidophilus* є «Наріне» (рис. 1.1 та рис. 1.2).



Рис. 1.1. Закваска «Наріне» компанії VIVO [18]



Рис. 1.2. Закваска «Наріне» компанії Біофарма [17]

Закваски компаній Іпровіт (рис. 1.3) та VIVO (рис. 1.4) відзначаються гарантованою якістю, високим вмістом корисних мікроорганізмів та відсутністю

шкідливих домішок. Бактерії, які входять до їх складу, виділені з природних джерел на території України і характерні для нормального кишкового біоценозу населення, тому не мають протипоказань та побічних ефектів [19].



Рис. 1.3. Бактеріальна закваска Йогурт з ацидофільною паличкою компанії Іпровіт [20]



Рис. 1.4. Ацидофільна закваска компанії VIVO [21]

Умови зберігання. Суху закваску зберігають не більше 6 місяців при температурі від +2 до +8 °С та не більше 12 місяців від -12 до -18 °С [14].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Lactobacillus acidophilus - це один з найважливіших представників лактобактерій, який використовують при виготовленні заквасок для різних видів кисломолочних продуктів та пробіотиків, які використовують для лікування дисбактеріозу.

Одним із сучасних завдань біотехнології є оптимізація умов культивування, у тому числі поживного середовища, для забезпечення максимального виходу цільового продукту. У нашому випадку це біомаса, тому доцільно було б розглянути теоретично можливі варіанти з метою подальшого їх використання у харчовій промисловості.

Так, у дослідженнях [5] показано, що шляхом оптимізації поживного середовища вдалося збільшити вихід біомаси *L. acidophilus* DSMZ 20079 в 2,5 рази, порівняно з контролем. Відмічено важливість рівня рН під час культивування, який також має свій вплив на ріст культури. Так, за допомогою планування Бокса-Бенкена (BBD) вдалося досягнути високої концентрації біомаси, яка на 16 год культивування становила 5,14 г/л. Доречно також врахувати пробіотичні властивості зазначеного штаму, адже на сьогоднішній день все більше споживачів надають перевагу харчовим продуктам із оздоровчими властивостями.

Подібний метод оптимізації описали Pedram, N. та Ataei, S.A, використовуючи модифіковане середовище GS для вирощування пробіотичного штаму *L. acidophilus* ATCC 4356, потенційна роль якого полягає в зниженні рівню холестерину в крові. Продукти, виготовлені на основі біомаси даного штаму, можуть зацікавити споживачів, які мають проблеми із серцево-судинною системою, хвороби якої є одними з найрозповсюдженіших в світі [6].

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>					
					РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>							133	1625
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>						Кафедра БТМ 13		
<i>Консульт.</i>										
<i>Н. Контр.</i>										
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>								

Доволі частим явищем у промисловому культивуванні є застосування відходів різних виробництв. Такий підхід використовують для здешевлення виробництва, а отже й кінцевого продукту. Так, для одержання біомаси *L. acidophilus* ATCC 43121 в поживне середовище додають відпрацьовані пивні зерна [22]. Для вирощування *L. acidophilus* LA-5 як поживне середовище використовують овочевий сік [23].

У результаті досліджень, проведених біотехнологами з Бангкоку, зазначається можлива модифікація поживного середовища MRS з вмістом гідролізату рисової шкарлупи як відходу харчового виробництва. Як відомо, у промислових умовах MRS є доволі дороговартісним середовищем, але при зменшенні його компонентів шляхом додавання гідролізату шкарлупи можна його значно здешевити. Таким чином, у роботі зазначається ефективне використання середовища MRS:RH у співвідношенні 75:25. Упродовж 16 год при культивуванні на цьому середовищі одержується 2,61 г/л біомаси *L. acidophilus* TISTR 1138. При цьому, на чистому MRS бульйоні в цих же умовах культивування синтезується 3,07 г/л. Незважаючи на те, що контрольне середовище все одно має вищий показник синтезу, порівняно дешева сировина у вигляді рисової шкарлупи є дешевшим джерелом поживних елементів, що здешевлює кінцевий продукт [7].

Взагалі, використання гідролізатів різних продуктів та відходів все більше застосовується у сфері промислового культивування. Наприклад, у роботі [8] зазначається можливість використання гідролізату яєчного білка для одержання біомаси *L. acidophilus* NRRL B-4495. Гідролізат яєчного білка є хорошим джерелом азоту, тому його можна використовувати в ферментаційних середовищах для посилення росту пробіотичних молочнокислих бактерій з метою створення більш функціональних продуктів харчування.

Дослідники з Тайваню порівнювали материнський та виведений з нього штам *L. acidophilus* GK та DGK відповідно. Останній штам, спираючись на генетичні дослідження, може споживати нижчі концентрації поживних речовин за батьківський, але не такий широкий спектр. При культивуванні на MRS бульйоні протягом 12 год показник концентрації біомаси DGK становить 4,54 г/л, в той час як *L. acidophilus* GK синтезував лише 1,06 г/л [9].

У дослідженнях, проведених вченими із Китаю, зазначаються основні фактори впливу та оптимізоване середовище для культивування *L. acidophilus* за допомогою експерименту Плакетта-Бермана та експерименту з найкрутішим підйомом. Таким чином, оптимізоване середовище покращить кількість життєздатних клітин у бульйоні MRS та ефективно подовжить цикл росту, що створює технічну основу для подальшого виробництва порошку пробіотичних бактерій [10].

Згідно вищенаведеної інформації можна зробити висновок, що нині існують дані щодо різних штамів *L. acidophilus*, які здатні накопичувати біомасу, необхідну для виробництва продуктів харчування. Для порівняння було обрано 6 різних штамів, зокрема *L. acidophilus* DSMZ 20079, *L. acidophilus* TISTR 1138, *L. acidophilus* DGK, *L. acidophilus* ATCC-4356, *L. acidophilus* NRRL B-4495 та штам *L. acidophilus*, отриманий з коледжу Наук про життя та інженерії Шеньсійського науково-технічного університету.

Дані щодо синтезу біомаси ацидофільної палички бактеріями, наведені в табл. 2.1., свідчать про те, що найнижчу концентрацію біомаси та клітин отримали при культивуванні штаму *L. acidophilus* TISTR 1138 – 2,61 г/л та $2,07 \cdot 10^8$ КУО/мл відповідно. Найвищу концентрацію біомаси отримали при культивуванні *L. acidophilus* – 7 г/л та найвищу концентрацію клітин - при біосинтезі *L. acidophilus* DGK – $9,5 \cdot 10^9$ КУО/мл.

У той час тривалість культивування порівнюваних штамів бактерій та склад поживних середовищ є різним. Отже, на наступним етапом вибору біологічного агенту є розрахунок вартості поживних середовищ для культивування обраних мікроорганізмів (табл. 2.2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовища для культивування мають більш-менш подібну ціну, але найдешевшим виявилось середовище з гідролізатом яєчного білку. На найдорожчому поживному середовищі культивується *L. acidophilus* ATCC 4356, що пов'язано з високою концентрацією дріжджового екстракту, оскільки цей компонент є доволі дорогим та універсальним джерелом поживних речовин. Але, дана таблиця не висвітлює повну доцільність продуцентів, тому для остаточного

вибору найефективнішого біологічного агенту варто здійснити розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту (табл. 2.3).

Дані, наведені у табл. 2.3, свідчать про те, що умовна вартість цільового продукту, синтезована *L. acidophilus* NRRL В-4495 є найнижчою (2,42 грн/г), а кількість утвореної біомаси за годину становить – 0,375 г/год. При цьому, кількість утвореної біомаси, синтезованої китайським штамом *L. acidophilus*, за годину становить 0,583 г/год, що майже у 1,6 разів більше, ніж у *L. acidophilus* NRRL В-4495, а тривалість культивування *L. acidophilus*, в свою чергу становить 12 год. Але доцільно було б ще раз звернутися до табл. 2.1. за порівнянням показника КУО/мл, оскільки в молочній промисловості він відіграє винятково важливу роль.

Так, найвища концентрація клітин притаманна штаму *L. acidophilus* DGК та становить $9,5 \cdot 10^9$ КУО/мл. Даний показник у *L. acidophilus* є дещо нижчим та становить $2,72 \cdot 10^9$ КУО/мл. Також варто звернути увагу на умовну вартість цільового продукту, зокрема вартість кінцевого продукту *L. acidophilus* DGК майже в 2,5 рази більша за найнижчу запропоновану ціну, тому цей штам недоцільно використовувати з економічної точки зору.

Особливості одержання біомаси *Lactobacillus acidophilus*

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	К-ть життєздатних клітин, КУО/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	Концентрація, г/л					
1	2	3	4	6	7	8	9
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ 20079	Глюкоза Дріжджовий екстракт Цитрат амонію Лимонна кислота КН ₂ РО ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O MnSO ₄ ·7H ₂ O Ацетат натрію Твін-80	50,0 20,91 3,42 0,5 1,5 0,4 0,05 1,0 1,0	16	5,14	10 ⁹	Культивування здійснюють в асептичних умовах при температурі 37 °С, рН 6,0 при 200 об/хв	Kepli A. N., Dailin D. J., Malek R. A., Elsayed E. A., Leng O. M., El-Enshasy H. A. Medium optimization using response surface methodology for high cell mass production of <i>Lactobacillus acidophilus</i> . <i>Journal of Scientific & Industrial Research</i> . 2019, 78: 608-614.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TISTR 1138	Пептон М'ясний екстракт Дріжджовий екстракт Глюкоза КН ₂ РО ₄ Твін-80 Цитрат амонію Ацетат натрію MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5 6,0 3,0 15,0 1,5 0,75 1,5 3,75 0,15	16	2,61	2,07·10 ⁸	Культивування проводять при температурі 37 °С	Todhanakasem T., Puanglamyai N. Use of rice hull hydrolyzate in the cultivation of <i>Lactobacillus acidophilus</i> . <i>Asia-Pacific Journal of Science and Technology</i> . 2012, 17(5): 778-786.

Продовження табл. 2.1.

	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,03					
	Гідролізат рисової шкарлупи	40,0					
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DGK	Дріжджовий екстракт	5,0	12	4,54	9,5·10 ⁹	Культивування здійснюють в асептичних умовах при температурі 37 °С, рН 6,0 при 150 об/хв	Hwang C. F., Lin C. K., Yan S. Y., Chang R. H., Tsen H. Y. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain <i>Lactobacillus acidophilus</i> DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. <i>African Journal of Biotechnology</i> . 2015, 14(3): 248-256. doi: 10.5897/AJB2013.12839
	Пептон	10,0					
	М'ясний екстракт	8,0					
	Цитрат амонію	2,0					
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2					
	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05					
	Ацетат натрію	5,0					
	Глюкоза	20,0					
KH ₂ PO ₄	2,0						
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC-4356	Глюкоза	30	14	6,5	10 ⁹	Культивування проводять при 37°С в стаціонарних умовах, рН 6,5	Pedram N., Ataei S.A. Optimization of a Modified GS Medium for a Probiotic Strain (<i>L. acidophilus</i> ATCC - 4356). <i>Applied Food Biotechnology</i> . 2014, 1(1): 25-29. doi: 10.22037/afb.v1i1.7128.
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,6					
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,03					
	Натрій ацетат	1,0					
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,03					
	Дріжджовий екстракт	30					
	K ₂ HPO ₄	0,5					
	KH ₂ PO ₄	0,5					
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Глюкоза	21,0	12	7	2,72·10 ⁹	Культивування здійснюють при 37 °С, рН 6,5	He Chen, H., Niu, J., Qin, T., Ma, Q., Wang, L., Shu, G. Optimization of the medium for <i>Lactobacillus</i>
	K ₂ HPO ₄	3,5					
	CH ₃ COONa	6,5					

Закінчення табл. 2.1.

	Пептон	10,0					<i>acidophilus</i> by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. <i>Acta Sci, Pol. Technol. Aliment.</i> , 2015, 14(3), 227–232. doi: 10.17306/J.AFS.2015.3.24
	Екстракт яловичини	8,0					
	Дріжджовий екстракт	8,0					
	C ₆ H ₁₄ O ₇ N ₂	2,0					
	MgSO ₄	0,2					
	Твін-80	1,0					
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495	Гідролізат яєчного білка	25,0	16	6	4,8·10 ⁸	Культивування проводять при 37 °С, рН 5,7	Mis Solvala K., Chouljenkob A., Chotikod A., Sathivel S. Growth kinetics and lactic acid production of <i>Lactobacillus plantarum</i> NRRL B-4496, <i>L. acidophilus</i> NRRL B-4495, and <i>L. reuteri</i> B-14171 in media containing egg white hydrolysates. <i>LWT - Food Science and Technology</i> 105, 2019, 393–399. doi: 10.1016/j.lwt.2019.01.058
	Декстроза	20,0					
	Ацетат натрію	5,0					
	Твін-80	1,0					
	K ₂ HPO ₄	2,0					
	Цитрат амонію	2,0					
	Сульфат магнію	0,1					
	Сульфат марганцю	0,05					

Вартість 1 л ПС для культивування продуцентів біомаси

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело Інформації (1-4)*
1	2	3	4	5	6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ 20079	Глюкоза	50,0	22	1,1	1
	Дріжджовий екстракт	20,91	1100	23	1
	Цитрат амонію	3,42	525	1,8	2
	Лимонна кислота	0,5	96	0,05	1
	KH ₂ PO ₄	1,5	81	0,13	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	15	0,006	1
	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	29	0,001	1
	Ацетат натрію	1,0	38	0,04	1
	Твін-80	1,0	190	0,19	1
	Вартість 1 л поживного середовища – 26,32 грн				
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TISTR 1138	Пептон	7,5	1060	7,95	1
	М'ясний екстракт	6,0	1220	7,32	3
	Дріжджовий екстракт	3,0	1100	3,3	1
	Глюкоза	15,0	22	0,33	1
	K ₂ HPO ₄	1,5	156	0,234	1
	Твін-80	0,75	190	0,14	1
	Цитрат амонію	3,42	525	1,8	2
	Ацетат натрію	3,75	38	0,14	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15	15	0,003	1
	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	29	0,0009	1
	Гідролізат рисової шкарлупи	40,0	61	2,44	4
Вартість 1 л поживного середовища – 21,22 грн					
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DGK	Дріжджовий екстракт	5,0	1100	5,5	1
	Пептон	10,0	1060	10,6	1
	М'ясний екстракт	8,0	1220	9,76	3
	Цитрат амонію	2,0	525	1,05	2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	15	0,03	1
	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	29	0,001	1
	Ацетат натрію	5,0	38	0,19	1

	Глюкоза	20,0	22	0,44	1
	K ₂ HPO ₄	2,0	156	0,312	1
	Вартість 1 л поживного середовища – 27,88 грн				
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC-4356	Глюкоза	30,0	22	0,66	1
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,6	15	0,009	1
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,03	29	0,0009	1
	Натрій ацетат	1,0	38	0,038	1
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,03	10	0,0003	1
	Дріжджовий екстракт	30,0	1100	33	1
	K ₂ HPO ₄	0,5	156	0,078	1
	KH ₂ PO ₄	0,5	81	0,0405	1
	Вартість 1 л поживного середовища – 33,83 грн				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Глюкоза	21,0	22	0,462	1
	K ₂ HPO ₄	3,5	156	0,546	1
	Ацетат натрію	6,5	38	0,247	1
	Пептон	10,0	1060	10,6	1
	Екстракт яловичини	8,0	249	1,992	4
	Дріжджовий екстракт	8,0	1100	8,8	1
	Цитрат амонію	2,0	525	1,05	2
	MgSO ₄	0,2	15	0,003	1
	Твін-80	1,0	190	0,19	1
	Вартість 1 л поживного середовища – 23,89 грн				
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495	Гідролізат яєчного білка	25,0	500	12,5	5
	Декстроза	20,0	22	0,44	1
	Ацетат натрію	5,0	38	0,19	1
	Твін-80	1,0	190	0,19	1
	K ₂ HPO ₄	2,0	156	0,312	1
	Цитрат амонію	2,0	525	1,05	2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	15	0,0015	1
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,05	29	0,00145	1
	Вартість 1 л поживного середовища – 14,68 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2022 р. 1 - <https://prom.ua/ua/>, 2 - <https://mendeleevmarket.com/himreaktivy/ammoniy/citrat-ammonija/ammonij-limonnokislj-2-zameshennij-bv-ch.html>, 3 - <https://satu.kz/p57841217-ekstrakt-myasnoj500gr.html>, 4 - <http://surl.li/bwcca>, 5 - <https://cutt.ly/nGZRhNh>

Умовна вартість 1 г біомаси *Lactobacillus acidophilus*

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ 20079	5,14	16	0,321	26,32	5,12
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TISTR 1138	2,61	16	0,163	21,22	8,13
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DGK	4,54	12	0,378	27,88	6,14
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC-4356	6,5	14	0,464	33,83	5,2
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7	12	0,583	23,89	3,39
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-4495	6	16	0,375	14,68	2,42

Таким чином, в результаті опрацювання вищенаведеної інформації можна зробити висновок, що найбільш вигідним продуцентом біомаси є китайський штам *L. acidophilus*. Проте, доречно зазначити, що умовна вартість біомаси цього біологічного агента є вища, але не критично, всього на 0,97 грн. Спираючись на те, що даний продуцент синтезує кінцевий продукт швидше, а отже може забезпечити більшу кількість товарів молочної промисловості, обираємо його.

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

L. acidophilus – це нерухливі палички з заокругленими кінцями (рис. 2.1.), що забарвлюються за Грамом позитивно (рис. 2.2.). Діаметр їхніх клітин становить 0,6-

0,9 × 1,5-6 мкм. Розташовуються поодинокі, попарно або у вигляді коротких ланцюжків. Ці бактерії не утворюють спор та не мають джгутиків [24].

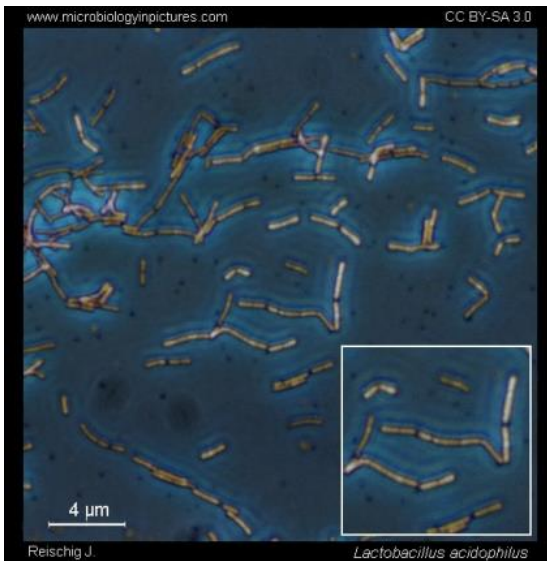


Рис. 2.1. Культура *L. acidophilus* під мікроскопом [25]

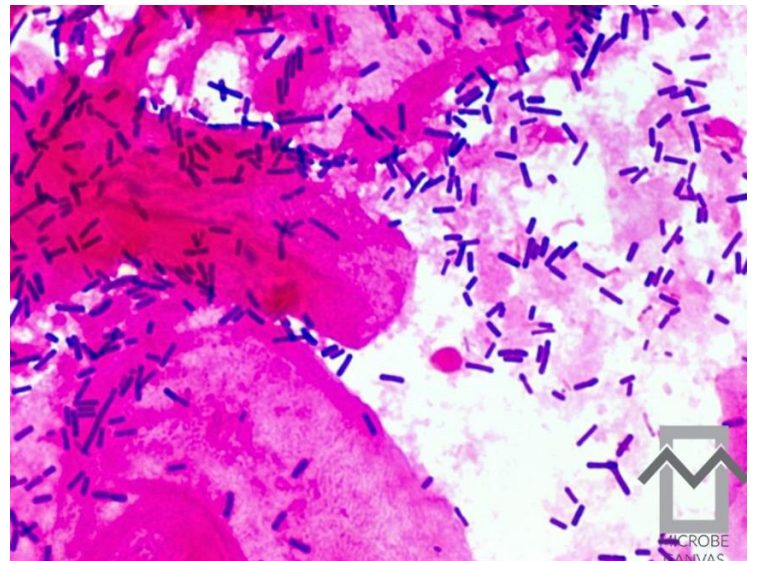


Рис. 2.2. Клітини *L. acidophilus*, забарвлені позитивно за Грамом [26]

Бактерії *L. acidophilus* здатні утворювати колонії у вигляді шматочків вати при культивуванні у агарі з гідролізованим молоком, дріжджовим екстрактом і глюкозою. Оптимальна температура росту становить 37 °C [27].

При культивуванні в мікроаерофільних умовах в термостатах, *L. acidophilus* НК-1 в товщі напіврідкого поживного середовища МРС мають вигляд шароподібних колоній діаметром 1 мм (рис. 2.3. А). При культивуванні в анаеростатах, на поверхні щільного поживного середовища ріст культури представлений округлими колоніями різного розміру з шорхуватими краями (рис. 2.3. Б). При рості даної культури на поверхні мембранних фільтрів, поміщених на щільне поживне середовище, спостерігаються одиничні маленькі округлі колонії з рівними краями (рис. 2.3. В) [28].

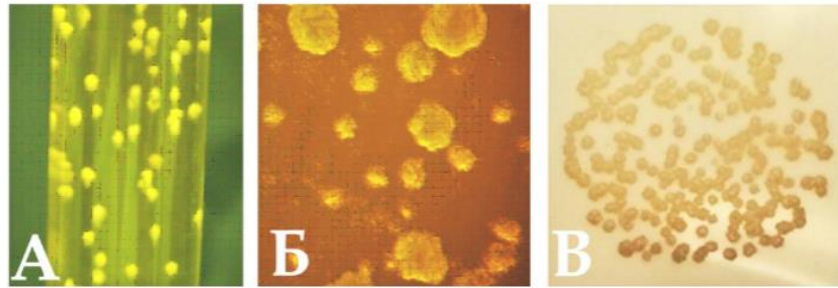


Рис. 2.3. Ріст культури *L. acidophilus* НК-1 в товщі напіврідкого середовища МРС (А), на поверхні щільного поживного середовища МРС (Б) і на поверхні мембранного фільтра (В) [28]

Молочнокислі бактерії є кислотостійким, що зумовлює їх фізіологічну особливість, тому для вирощування лактобацил є сприятливими підкислені середовища, які мають початкове значення рН від 5 до 7, причому оптимальне зростання культури відбувається при досягненні рН 5,5-6,0. Даний мікроорганізм не росте при температурі 15 °С, а також може не рости і при 22 °С. Зазвичай ріст починається при 45 °С і може реалізовуватись при 48 °С. Температурний оптимум для *L. acidophilus* становить 35-38 °С [24].

Мікроорганізм є факультативним анаеробом, мікроаерофілом, хемоорганогетеретрофом, тобто здатен використовувати вуглеводи у якості джерела вуглецю та енергії. Дані біологічні агенти отримують енергію в результаті здійснення гомоферментативного молочнокислого бродіння. Ці мікроорганізми є вибагливими, тому потребують факторів росту та вітамінів для росту [29].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *L. acidophilus* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [30].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Firmicutes*

Клас – *Bacillales*

Порядок – *Lactobacillales*

Родина – *Lactobacillaceae*

Рід – *Lactobacillus*

Вид – *Lactobacillus acidophilus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Останнім часом стан харчування населення України характеризується негативними тенденціями, зокрема суттєву шкоду здоров'ю людини завдає недостатнє надходження з їжею вітамінів, мінеральних речовин і мікроелементів. Все це призводить до зниження імунітету, порушення функцій травлення, збільшення числа людей, що страждають на алергію, цукровий діабет та інші захворювання, які пов'язані з порушенням обмінних процесів в організмі людини [31, 32].

У структурі поширеності захворювань в Україні патології шлунково-кишкового тракту знаходяться на третьому місці, у структурі смертності – на четвертому, тож на даний момент гостро постає питання вирішення цієї проблеми [33].

Для попередження та лікування хвороб органів травлення застосовують пробіотики різних типів, серед яких поширеними є біологічні, харчові або дієтичні добавки, продукти функціонального призначення та лікарські препарати з вмістом живих культур мікроорганізмів, що здатні значно покращувати мікрофлору кишківника, яка в свою чергу створює належні умови для функціонування та розвитку організму.

Важливу роль у формуванні корисних властивостей як мікрофлори кишечника, так і травного каналу у цілому, відведено пробіотичним мікроорганізмам, що належать до виду *Lactobacillus acidophilus*. Вагомий позитивний вплив цього виду мікроорганізмів полягає у продукуванні антибіотичних речовин, які здатні знешкодити збудників хвороб та нейтралізувати активність шкідливих бактерій в організмі людини [4].

Продукти на основі сухої біомаси *L. acidophilus* дуже корисні дітям від самого народження, жінкам «при надії», хворим під час реабілітації, літнім людям і тим, хто обирає шлях здорового життя. Наприклад, препарат «Аципол», що містить суміш 4 штамів *L. acidophilus* та полісахарид кефірних грибків, показав високу ефективність

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>			<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акцшв</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>					25	2025
<i>Консульт.</i>						25		
<i>Н. Контр.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

при лікуванні гострої інфекційної діареї, лактозної мальабсорбції та atopічних захворювань у дітей, а також як профілактичний засіб проти різних захворювань ШКТ та для зниження рівня холестерину в крові. Аналогічними властивостями володіють БАДи «Вітафлор» та «Наріне». Також *L. acidophilus* застосовується в таких препаратах як «Ацидофлора», «Віта Баланс 3000», «Лінекс» та «Пробіо форте».

L. acidophilus, зважаючи на свої пробіотичні властивості, міститься в адаптованих молочних сумішах, таких як «Агуша 1», «Ацидофільне малятко», «Кисломолочне немовля», частково адаптованих, як «Ацидоміл» та «Агуша 2», неадаптованих – «Ацидолакт», «Біолакт» та інших [24].

Особливий інтерес представляє використання *L. acidophilus* у виробництві ацидофіліну, кисломолочного продукту функціонального призначення, оскільки дана пробіотична культура позитивно впливає на структуру слизової оболонки кишечника і її адсорбційну здатність. Вона синтезує вітаміни групи В і природні антибіотики, які здатні пригнічувати ріст патогенних мікроорганізмів. Поряд з антибіотичними властивостями, які обумовлені життєдіяльністю молочнокислих бактерій, кисломолочні продукти, на відміну від молока, добре перетравлюються і утилізуються організмом, що особливо важливо для дітей, людей старшого та похилого віку [31].

Оскільки найбільшу увагу *L. acidophilus* привертає як пробіотичний мікроорганізм у складі кисломолочних продуктів, то для розрахунку приблизної річної потреби варто за основу взяти виробництво отримання біомаси для функціонального продукту ацидофіліну, який використовують у лікуванні ШКТ та для профілактики.

Ацидофілін – це універсальний продукт, який виготовляють, як у промислових масштабах та випускають у вигляді готового кисломолочного напою, так і в домашніх умовах, використовуючи одну дозу ацидофільної закваски для сквашування 3 л молока. Пропоную далі зосередити увагу саме на виробництві сухої бактеріальної закваски як кінцевого продукту, оскільки її основною перевагою є досить тривалий термін зберігання, а також чудовою перспективою є можливість безпосередньо

споживачеві долучитись до біотехнологічного процесу створення готового пробіотичного напою.

У продуктивній структурі ринку молочної продукції в Україні 2020 року найбільшу частку мало питне молоко – 43 %, кисломолочні продукти займали 20,4 % обсягу ринку, морозиво та сири – 9,6 % та 9,3 % відповідно (рис. 3.1) [34].

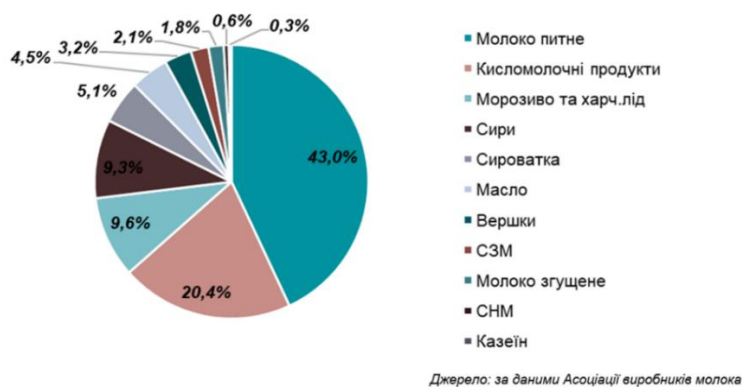


Рис. 3.1. Структура виробництва молочної продукції у січні-серпні 2020 р., % [34]

За даними Держкомстату України обсяги виробництва молока у 2020 році становлять 9,25 млн т, що стосується переробної молочної промисловості, то загалом на переробні підприємства надійшло 3,51 млн т. молока [35].

Таким чином, доля (20,4 %) виробництва кисломолочної продукції із загальної кількості молока – 3,51 млн т, становить 716 040 т.

Досліджуючи ринок кисломолочної продукції встановлено, що найбільші обсяги виробництва припадають на кефір – 40,0 %, 22,0 % - на сметану, 15,0 % - на йогурти, 11,0 % - на ряжанку, а 12,0 % розподіляються між іншими продуктами, що виробляються в меншій кількості, зокрема на частку ацидофільних напоїв припадає 2 % від усього об'єму (рис. 3.2) [36].

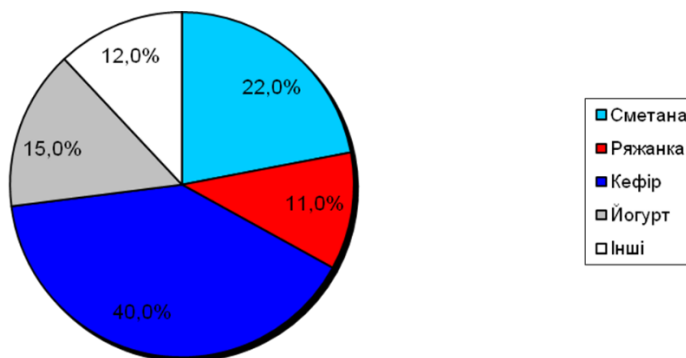


Рис. 3.2. Структура виробництва кисломолочної продукції (%) [36]

Враховуючи те, що на долю виробництва ацидофіліну припадає 2 % від загального обсягу виробництва кисломолочної продукції (716 040 т), то загальна річна потреба у споживанні ацидофіліну становить 14 320,8 т.

Розрахуємо потребу безпосередньо у сухій бактеріальній заквасці. Оскільки одну дозу (0,5 г) закваски застосовують для сквашування 3-х літрів молока, доцільно перевести 14 320,8 т у літри, враховуючи густину суспензії, що становить 1,030 кг/м³. Так, 14 320 800 кг становить 13 903 689 л молока. Тоді загальна річна потреба в ацидофільній заквасці – 2 317,3 кг/рік, що складає 4 634 600 флаконів (1 158 650 упаковок, в упаковці - 4 флакона по 0,5 г).

Далі слід звернути увагу на те, що в 500 мг біомаси міститься 30 % захисного середовища. Зробивши перерахунок отримаємо загальну потребу в біомасі – 1 622,1 кг/рік.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Загалом на ринку України представлено шість основних заводів, що виготовляють закваски, а саме VIVO (Україна), Good food (Італія), Genesis (Болгарія), Lacte (Україна), Симбітер (Україна), Іпровіт (Україна), та інші [37].

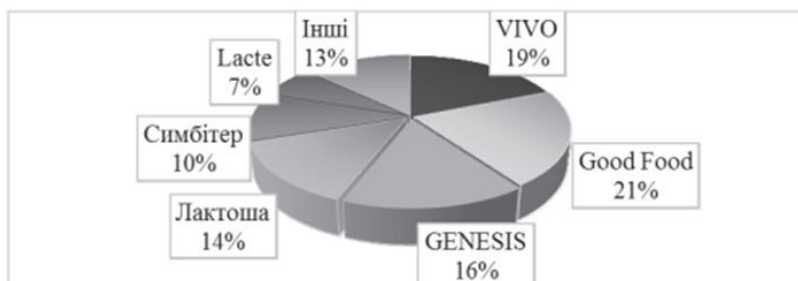


Рис. 3.3. Частки ринку виробників заквасок на ринку кисломолочних заквасок [за даними маркетингової дослідницької компанії «InMind»] [37]

З попередніх розрахунків було обрано біологічний агент *L. acidophilus*, продуктивність якого становить $X_{кр} = 7 \text{ г/л} = 7 \text{ кг/м}^3$ культуральної рідини [10].

Плануємо, що вибрану кількість біомаси вироблятимемо $T_{рд} = 30$ робочих днів. Для проведення подальших розрахунків варто взяти до уваги, що тривалість виробничого циклу становить $T_{ф} = 12$ год. Суха залишкова волога отримуваної

закваски $W = 3 - 5 \%$, тому кількість сухої речовини в кінцевому продукті буде $CP = 0,96$.

Здійснивши аналіз діаграми (рис. 3.3) та різні інформаційні джерела можна стверджувати, що на ринку України є широкий спектр вітчизняних компаній, які випускають бактеріальні закваски, а також присутні імпорتنі підприємства, які мають найбільшу частку на ринку, тому пропоную виробляти дану закваску для задоволення 8 % від загальної потреби, задовольняючи усі верства населення.

Отже, потужність виробництва складе:

$$G_{нт} = 1\,622,1 \times 0,08 = 129,77 \text{ кг}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Відповідно до техніко-економічного обґрунтування потреба у біомасі *L. acidophilus* складає $G_{нт} = 129,77$ кг. Таку кількість біомаси необхідно отримати за $T_{рд} = 30$ днів. За літературними даними максимальний синтез біомаси ($X_{кр} = 7$ г/л за $T_{ф} = 12$ год культивування) досягається за умов росту *L. acidophilus* на глюкозі. Згідно технічних умов (ТУ) вміст сухих речовин в кінцевому продукті $CP_{гп}$ становить 0,96 (частка).

Вихідні дані для подальших розрахунків:

- час циклу роботи ферментера $T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 12 + 6,5 = 18,5$ год

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (12 год) та час підготовки ферментера до роботи (6,5 год).

Підготовка ферментера включає в себе здійснення миття та його огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрівання апарату (0,5 год), його стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год) та завантаження поживного середовища (1,5 год), засів (0,5 год), і відповідно вивантаження культуральної рідини (0,5 год).

- Коефіцієнт запасу ($K_1 = 1,1 - 1,5$), $K_1 = 1,1$.
- Втрати на стадіях виділення готового продукту - $E_{св} = 0,1$ (сепарування – 5 %, ліофільне сушіння – 4 %, фасування, пакування, маркування – 1 %)

1. Кількість продукту на добу:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 129,77 / 30 = 4,326 \text{ кг/добу}$$

2. Кількість накопичення біомаси за цикл ферментації:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нтд}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 4,326 \cdot 18,5 / 24 = 3,335 \text{ кг/цикл}$$

3. Об'єм культуральної рідини за один цикл з врахуванням втрат:

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot C_{\text{рп}} / X_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 3,335 \cdot 0,96 / 7 \cdot (1 - 0,1) = 0,559 \text{ м}^3$$

4. Кількість циклів, які проводять за рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 129,77 / 3,335 = 39 \text{ циклів}$$

Приготування та стерилізація ПС для виробничого біосинтезу

Кількість ПС та ПМ у ферментері до культивування становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,559 / (1 - 0,1) = 0,621 \text{ м}^3$$

Кількість ПС в ферментері складатиме:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 0,621 / (1 + 0,1) = 0,565 \text{ м}^3$$

Необхідна кількість ПМ для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 0,621 - 0,565 = 0,056 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментатора $K_3 = 0,7$ тоді геометричний об'єм ферментера складе:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_3 = 0,621 / 0,7 = 0,887 \text{ м}^3$$

За таблицю [38] обираємо ферментер геометричним об'ємом 1 м^3 .

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл повинні отримати $V_{\text{кр}} = 0,559 \text{ м}^3$ КР.

Під час отримання КР варто врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15 %.

Таким чином, з урахуванням покриття 10 % втрат об'єм ПС та ПМ перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,559 / (1 - 0,1) = 0,621 \text{ м}^3$$

$E_{\text{ф}}$ – витрати культуральної рідини під час біосинтезу

Виробничий біосинтез проводять в ферментері, який має робочий об'єм $V_{\text{роб.1}} = 0,621 \text{ м}^3$. При вибраному коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,7$ необхідно здійснити розрахунок можливого геометричного об'єму ферментера, що становитиме:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_3 = 0,621 / 0,7 = 0,887 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{ф}} = 1 \text{ м}^3$ [38], та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{31} = V_{\text{роб.1}} / V_{\phi} = 0,621 / 1 = 0,62$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у обраних нами межах, тому вибір геометричного об'єму ферментера здійснено правильно.

Доза посівного матеріалу для ферментера становить 10 % від об'єму ПС. Тоді необхідна така кількість ПС в ферментері:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\phi}) = 0,621 / (1 + 0,1) = 0,565 \text{ м}^3$$

$X_{\phi} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментеру

Розраховуємо кількість ПМ:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0,621 - 0,565 = 0,056 \text{ м}^3$$

Для одержання $0,056 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті необхідно врахувати втрати, які виникають в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованої суміші газів які становлять 10 – 15 %. Тоді кількість ПС та ПМ в посівному апараті становить:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 0,056 / (1 - 0,1) = 0,062 \text{ м}^3$$

Доза ПМ становить 10 % від об'єму ПС. Тоді кількість ПС в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 0,062 / (1 + 0,1) = 0,056 \text{ м}^3$$

$X_{\text{па}} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату

Кількість ПМ для посівного апарату становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,062 - 0,056 = 0,006 \text{ м}^3 \text{ або } 6 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,062 \text{ м}^3$ отримуватиметься під час культивування бактерій у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_3 = 0,062 / 0,7 = 0,089 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за об'ємом стандартний посівний апарат $V_{\text{па}} = 0,1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо обраний коефіцієнт заповнення:

$$K_{32} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{па}} = 0,062 / 0,1 = 0,62$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у обраних нами межах, тому вибір геометричного об'єму посівного апарату здійснено правильно.

Для одержання 0,006 м³ інокуляту в ПА необхідно врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованої суміші газів які становлять 10 – 15%. Тоді кількість ПС та ПМ в посівному апараті становить:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{па}) = 0,006 / (1 - 0,1) = 0,0067 \text{ м}^3$$

Доза ПМ становить 10 % від об'єму ПС. Тоді кількість ПС в посівному апараті становитиме:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{па}) = 0,0067 / (1 + 0,1) = 0,006 \text{ м}^3$$

$X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату

Кількість ПМ для посівного апарату становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 0,0067 - 0,006 = 0,0007 \text{ м}^3 \text{ або } 0,7 \text{ л}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 0,0067 \text{ м}^3$ отримуємо під час культивування бактерій у ПА геометричним об'ємом:

$$V_{па3} = V_{роб.3} / K_3 = 0,0067 / 0,7 = 0,0096 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за об'ємом стандартний ПА $V_{па} = 0,01 \text{ м}^3$.

Уточнюємо обраний коефіцієнт заповнення:

$$K_{з3} = V_{роб.3} / V_{па} = 0,0067 / 0,01 = 0,67$$

Коефіцієнт заповнення знаходиться у обраних нами межах, тому вибір геометричного об'єму посівного апарату здійснено правильно.

Кількість ПМ для засіву ПА $V_{пм3} = 0,7 \text{ л}$ отримуємо культивуванням бактерій у колбах в термостаті. Для цього необхідно використати колби $V_{колб} = 750 \text{ мл}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,6$.

Кількість колб для одержання ПМ становитиме:

$$N_{колб} = V_{пм3} / (V_{колб} \times K_{зк}) = 0,7 / (0,75 \times 0,6) = 2 \text{ колби}$$

Для зручності висновки представимо у вигляді таблиці 3.1:

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

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{роб}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Об'єм посівного матеріалу $V_{пм}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}, \text{ м}^3 (\text{л})$	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}, \text{ частка}$	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}, \text{ м}^3 (\text{л})$
IV	0,559*	0,621	0,056	0,565	0,7	1
III	0,056	0,062	0,006	0,056	0,7	0,1
II	0,006	0,0067	0,0007	0,006	0,7	0,01
I	0,7 л	0,7 л	-	0,7 л	0,6	2 колби

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

Отже, процес отримання посівного матеріалу для здійснення виробничого біосинтезу біомаси у ферментері об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,7 буде проходити у 4 етапи (рис. 3.3).

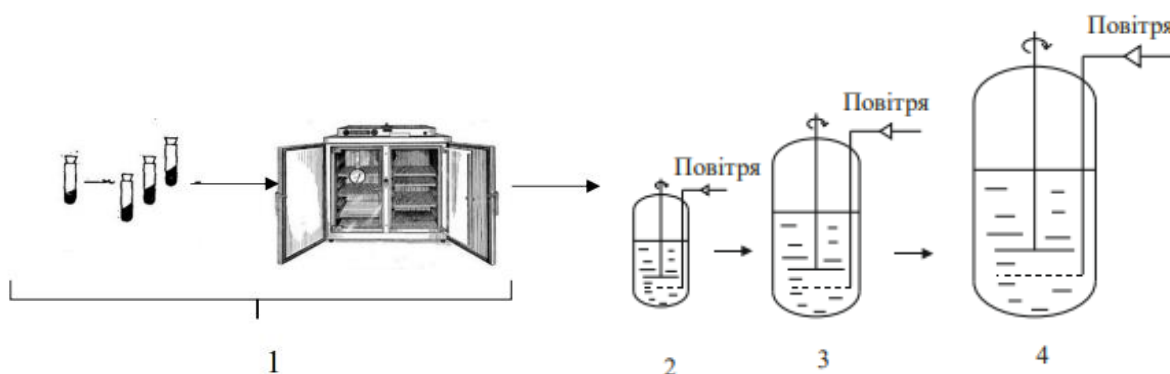


Рис. 3.3. Схема приготування посівного матеріалу *L. acidophilus*:

1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агарі в пробірках і в колбах в термостаті); 2 – вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л; 3 - вирощування в посівному апараті об'ємом 100 л; 4 - вирощування у ферментері об'ємом 1 м^3

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії під час культивування *Lactobacillus acidophilus* є глюкоза. Також частково до шляху катаболізму може залучатися лактоза, але тільки у тому випадку, коли вичерпується глюкоза, тому для побудови схеми біосинтезу лактозу не братимемо до уваги.

Так як у даному випадку обраного штаму продуцента не зазначено, то для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо серед наявних штамів у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – *L. acidophilus* NCFM [39].

Згідно літературних даних за умов росту на глюкозі у *L. acidophilus* NCFM функціонує гліколітичний шлях (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), тому наводимо схему перетворення глюкози для даного мікроорганізму згідно бази даних KEGG (рис 4.1).

Таким чином, глюкоза за участю глюкозоспецифічного ферменту (КФ.2.7.1.199) перетворюється на глюкозо-6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозо-6-фосфат. Фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктозо-6-фосфату в β -D-фруктозо-1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфатальдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозо-1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід-3-фосфат, під дією НАД-залежної гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ.1.2.1.12) він перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>			<i>РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>					34	2025
<i>Консульт.</i>						34		
<i>Н. Контр.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

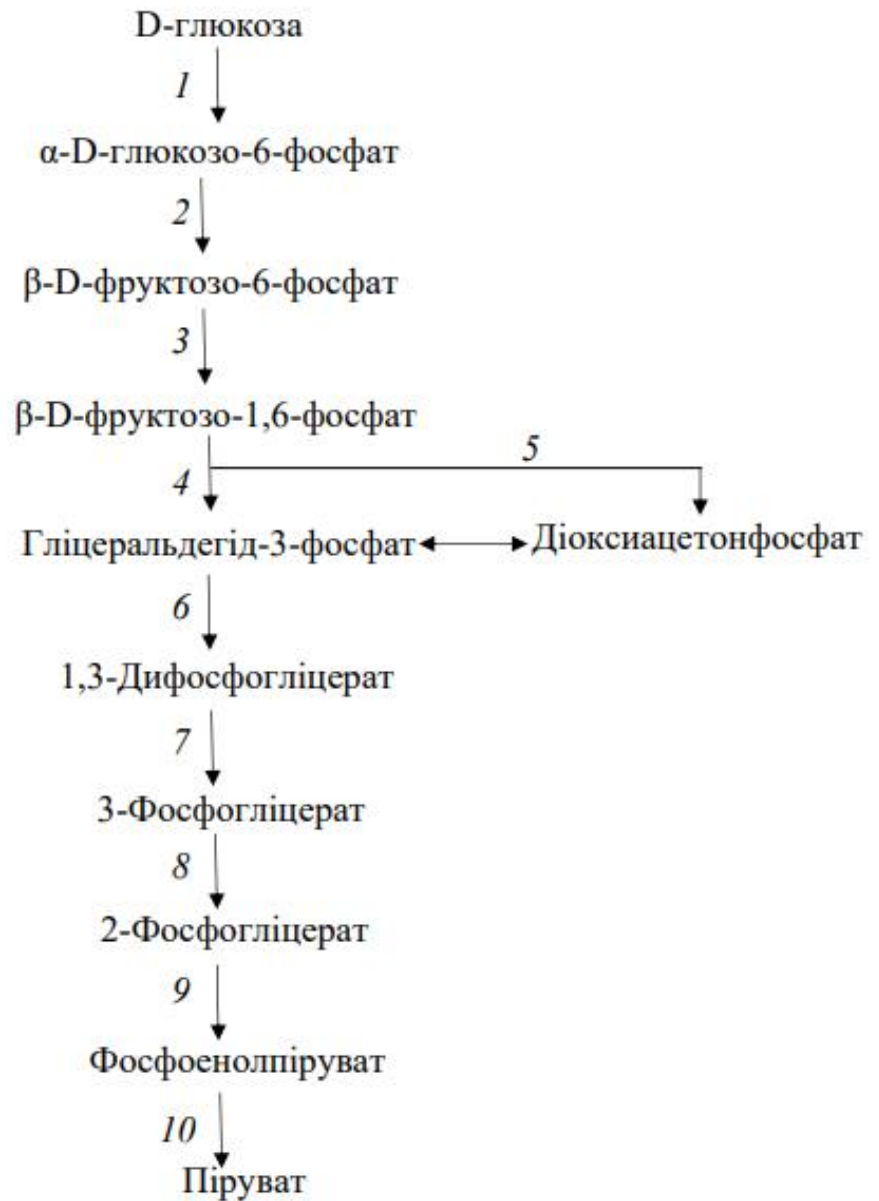


Рис. 4.1. Шлях катаболізму глюкози у *Lactobacillus acidophilus* NCFM

Ферменти: 1 – глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.199); 2 - глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – фосфоглюкокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 - НАД-залежна гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 8 – фосфогліцератмутаза (КФ.5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ. 4.2.1.11); 10 - піруваткіназа (КФ. 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Доцільним є розгляд біогенезу препаратів, які виготовляють на основі біомаси бактерій, що включає синтез основних органічних сполук, які входять до складу мікробної клітини - нуклеїнових кислот, білків, полісахаридів і ліпідів.

При рості *L. acidophilus* NCFM на глюкозі відбувається перетворення речовин у клітині у три етапи. Так, на першому етапі, що має назву катаболізм, глюкоза розщеплюється за допомогою гліколітичного шляху на піруват, який в свою чергу окиснюється до ацетил-коА.

На етапі проміжного обміну за допомогою ферменту цитратсинтази (КФ 2.3.3.1) відбувається введення ацетил-коА до циклу трикарбонових кислот у результаті його конденсації з оксалоацетатом з утворенням цитрату. На третьому етапі відбуваються реакції конструктивного метаболізму, де з проміжних сполук утворюються мономери, необхідні для синтезу полімерів, з яких безпосередньо складається мікробна клітина.

Розглянемо детально біосинтез низькомолекулярних сполук – амінокислот, нуклеотидів, вуглеводів і жирних кислот, які є будівельними матеріалами, зокрема для синтезу білків, полісахаридів, нуклеїнових кислот та ліпідів.

Основні метаболіти-попередники для процесів конструктивного метаболізму утворюються як інтермедіати центральних метаболічних шляхів, до яких належать ЦТК, гліколіз (глюконеогенез) та пентозофосфатний цикл [40].

Так, глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники біосинтезу родини ароматичних амінокислот та гістидину - еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозил-1-пірофосфат відповідно. Окрім еритрозо-4-фосфату попередником фенілаланіну, тирозину та триптофану є ще ФЕП, що утворюється з 2-Фосфогліцерату під дією енолази (КФ 4.2.1.11) в процесі гліколізу [40].

Таким чином, еритрозо-4-фосфат і ФЕП конденсуються під дією 3-дезоксикарабіногептулозо-7-фосфатсинтази (КФ 2.5.1.54) з утворенням 3-Дезокси-Д-арабіногептулозонат-7-фосфату, який в свою чергу піддається циклізації. Проміжним продуктом синтезу є хоризмова кислота, саме у цій точці біосинтетичного шляху

відбувається розгалуження і здійснюється синтез триптофану через антранілову кислоту, а також синтез тирозину і фенілаланіну через префенову кислоту під дією претирозиндегідрогенази та префенатдегідратази (КФ 4.2.1.51) відповідно [40].

Піруват є попередником аланіну, валіну, лейцину, а 3-фосфогліцерат - серину, гліцину та цистеїну, що належать до піруватної родини АК. Піруват утворюється з ФЕП за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40), а 3-фосфогліцерат – з 1,3-Дифосфогліцерату під дією ферменту фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) [40].

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин та лізин) утворюються з оксалоацетату, який є проміжним продуктом циклу Кребса. Біосинтез лізину відбувається через діамінопімеліновий шлях [40].

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату – інтермедіату ЦТК [40].

Оскільки десять із двадцяти амінокислот, з яких складаються білки, утворюються з інтермедіатів ЦТК, а проміжні продукти ЦТК використовуються також для синтезу інших клітинних компонентів, виникає необхідність поповнення втрат проміжних продуктів ЦТК за допомогою анаплеротичних реакцій. Такими реакціями при вирощуванні мікроорганізмів на вуглеводах, зокрема на глюкозі, є:

- карбоксилювання ФЕП з утворенням оксалоацетату під дією фосфоенолпіруваткарбоксилази (КФ 4.1.1.31):
$$\text{ФЕП} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{Оксалоацетат} + \text{Ф}_\text{н};$$
- карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату під дією ферменту піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1):
$$\text{Піруват} + \text{CO}_2 + \text{АТФ} = \text{Оксалоацетат} + \text{АДФ} + \text{Ф}_\text{н}$$
- карбоксилювання пірувату з утворенням малату під дією ферменту малатдегідрогенази декарбоксилювальної (КФ 1.1.1.40)

Як відомо, нуклеїнові кислоти — це своєрідний інформаційний банк, у якому знаходяться усі відомості про склад, розвиток і функціонування живих систем, тому вони є невід’ємною складовою мікробної клітини. Мономерами нуклеїнових кислот є нуклеотиди [40].

Попередниками піримідинових нуклеотидів є карбамоїлфосфат та аспартат. Карбамоїлфосфат утворюється з NH_3 , CO_2 та двох молекул АТФ за участю ферменту карбамоїлфосфатсинтетази (КФ 6.3.5.5), а аспартат – з оксалоацетату шляхом трансамінування з глутаматом. Конденсація цих сполук утворює карбамоїласпартат, який далі піддається циклізації і перетворюється на 4,5-дигідрооротат. Дегідрування цієї сполуки приводить до утворення оротату – першого проміжного продукту, який містить піримідинове кільце. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується шляхом перетворення у 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом дає оротидинмонофосфат, який декарбоксілюється в уридинмонофосфат [40].

Синтез пуринових нуклеотидів відбувається у результаті метаболічного шляху, що розпочинається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, з подальшим утворенням імідазольного нуклеотиду. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, поступають з бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Декілька додаткових реакцій приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і далі відбувається утворення АТФ та ГТФ [40].

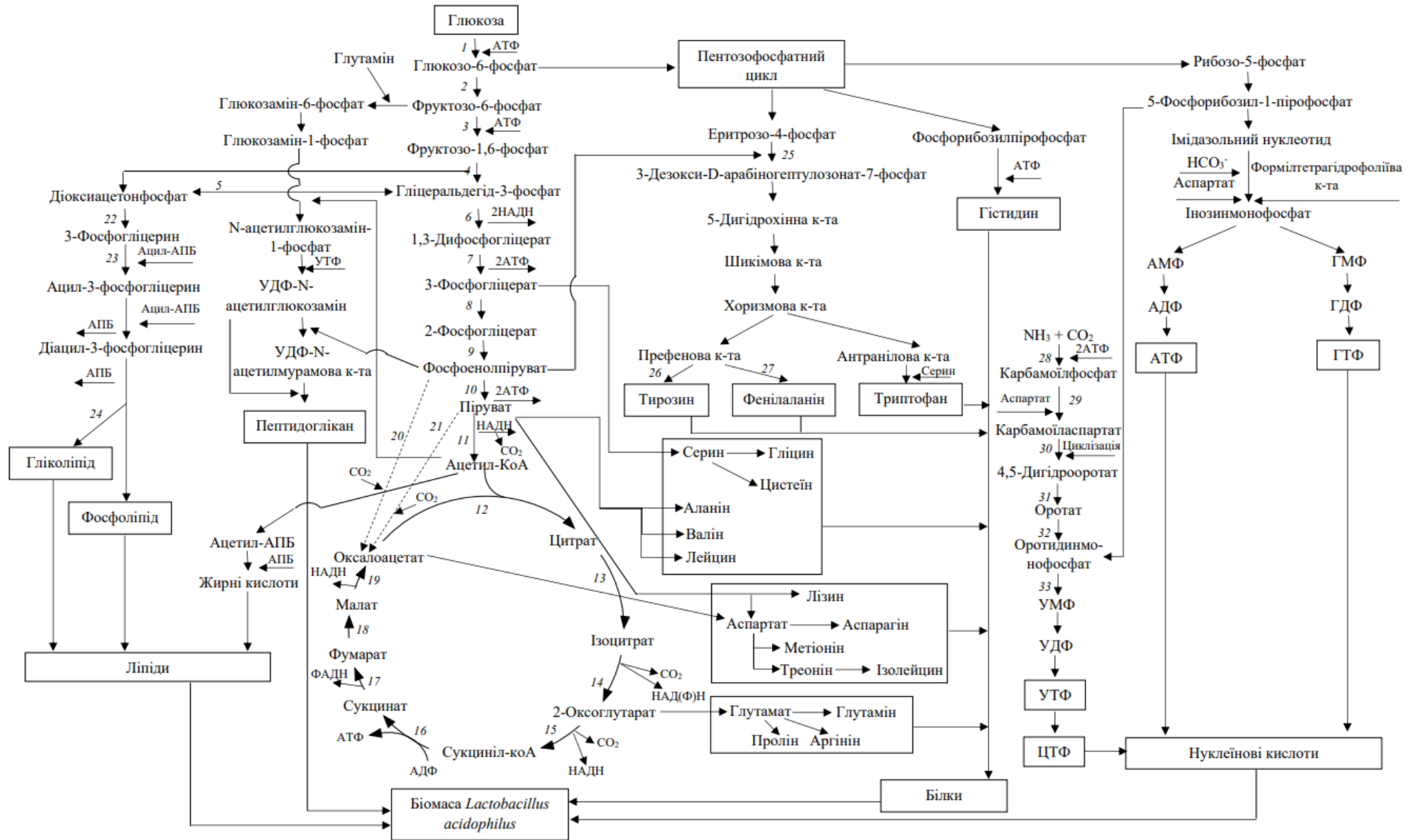
Рибонуклеотиди відновлюються до дезоксирибонуклеотидів на рівні дифосфатів за допомогою ферменту рибонуклеотидредуктази (КФ 1.17.4.1). В свою чергу фосфорилування дезоксинуклеозиддифосфатів за участю АТФ приводить до утворення відповідних трифосфатів [41].

Ліпіди є будівельними блоками для синтезу мембран, що становлять приблизно 10 % сухої маси клітини. В основному мембрани прокаріот містять фосфо- та гліколіпіди, оскільки *L. acidophilus* є грампозитивною бактерією, то у складі її клітинної стінки ліпополісахариди відсутні. Окрім вищезазначених компонентів до складу ліпідів входять жирні кислоти, попередником яких є ацетил-коА. Попередниками синтезу фосфо- та гліколіпідів є фосфатидна кислота (діацил-3-фосфогліцерин), яка утворюється з ацил-АПБ і 3-фосфогліцерину двома етапами. Спочатку утворюється ацил-3-фосфогліцерин у результаті приєднання ацильної

частини від ацил-АПБ до спиртової групи 3-фосфогліцерину під дією ферменту гліцерофосфатацилтрансферази. Потім інший аналогічний фермент ацилює С2-гідроксильну групу ацил-3-фосфогліцерину з утворенням діацил-3-фосфогліцерину. У свою чергу гліколіпіди синтезуються з фосфатидної кислоти також у два етапи. На першому етапі, який каталізується ферментом фосфатидатфосфатазою (КФ 3.1.3.4), від молекули фосфатидної кислоти відщеплюється неорганічний фосфат (P_n). На другому етапі фермент діацилгліцерин-глікозил-трансфераза приєднує УДФ-глікозильний залишок [40].

У грампозитивних бактерій основним компонентом клітинної стінки є пептидоглікан, попередниками якого є УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін, що синтезуються з глюкозамін-6-фосфату. Спочатку фосфатна група переноситься з положення 6 у положення 1 з утворенням глюкозамін-1-фосфату. Наступна реакція з ацетил-коА дає N-ацетилглюкозамін-1-фосфат, який зв'язується з УДФ. На останньому етапі УДФ-N-ацетилглюкозамін реагує з фосфоенолпіруватом, утворюючи УДФ-N-ацетилмурамову кислоту [41].

Схема біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт



РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Досить важливим етапом біотехнології бактеріальних препаратів на основі молочнокислих бактерій є забезпечення оптимальних умов і режимів для проведення процесу культивування, що безпосередньо залежить від фізіолого-біохімічних особливостей біологічного агенту [42].

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування *L. acidophilus* передбачається здійснювати глибинним способом, оскільки він має значні переваги порівняно з поверхневим, адже використання глибинного способу культивування дозволяє скоротити виробничі площі, не залучати важку непродуктивну ручну працю, забезпечити асептичні умови, все це є важливим, враховуючи фізіолого-біохімічні характеристики продуцента.

Ще однією перевагою, яка обумовила вибір глибинного способу культивування, є раціональніше використання поживних речовин середовища, що призводить до значного скорочення відходів виробництва, які можуть бути представлені у вигляді нерозчинних осадів ПС, та отримання на кінцевому етапі виробництва препаратів, які мають менший вміст домішок і більшу питому активність [43].

При одержанні препаратів, які мають пробіотичні властивості, важливим є накопичення біомаси, її максимальна кількість досягається у стаціонарній фазі росту, що можна забезпечити періодичним культивуванням, на відміну від безперервного способу, адже тоді культура знаходиться в експоненціальній фазі, що є не зовсім вигідним варіантом у даному випадку. Як відомо, в умовах періодичного культивування кількість ПМ впливає на швидкість накопичення біомаси та забезпечує високий економічний коефіцієнт. Зважаючи на вищенаведену інформацію, обираємо періодичний спосіб культивування.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архшів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>					41	925
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

Для *L. acidophilus* найвищий рівень біомаси спостерігається при тривалості культивування 12 год [10].

Оскільки оптимальними умовами для культивування *L. acidophilus* є 37 °С та близьке до нейтрального значення рН 6,5, то цілком можна стверджувати, що ризик контамінації є високим, тому культивування необхідно проводити в асептичних умовах. Здійснюватимемо стерилізацію обладнання і комунікацій, поживного середовища для культивування та усіх інших речовин, які будуть вноситись у посівні апарати та ферментер, а також у процесі підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу відбуватиметься постійна перевірка робочої культури на мікробіологічну чистоту.

Враховуючи те, що *L. acidophilus* є мікроаерофілом [44], тобто оптимальними для росту є умови з пониженим вмістом кисню, а у дослідженнях [45] з'ясовано, що за мікроаерофільних умов культивування пробіотичних препаратів кількість життєздатних мікробних клітин була більшою в 1,19-1,33 рази у порівнянні з аеробними умовами, то пропоную для культивування *L. acidophilus* створювати умови мікроаерації зважаючи на вищенаведену інформацію.

Особливістю процесу культивування молочнокислих бактерій є те, що вони виділяють велику кількість молочної кислоти, яка впливає на рівень рН і відповідно за таких умов ріст даного мікроорганізму припиняється, тому під час культивування необхідно забезпечити рівень рН в межах 6,5-7,0, для цього необхідно передбачити наявність розчину лугу, пропоную використовувати 25%-й розчин NH_4OH .

Як відомо, культивування молочнокислих бактерій ускладнено особливостями поживних потреб цих мікроорганізмів. Для їхнього інтенсивного розвитку необхідні речовини для побудови бактеріальної клітини, зокрема нуклеїнові кислоти, полісахариди, аміноцукри тощо. Існує потреба в ростових факторах та азотному живленні для молочнокислих бактерій, тому для забезпечення цих цілей використовують гідролізати білків м'яса, лактоальбуміну, казеїну та різних видів борошна. Також як джерела амінокислот, поліпептидів і вітамінів використовують дріжджовий і кукурудзяний екстракти.

Поживним середовищем, яке використовуватиметься в процесі культивування, є MPC (MRS) - середовище de Man, Rogosa, Sharp, що набуло найбільш широкого поширення, адже містить усі необхідні компоненти для метаболізму лактобактерій.

Таким чином, культивування *L. acidophilus* проводитиметься періодично глибинним способом, здійснюючи помірну аерацію, оскільки обраний біологічний агент є мікроаерофілом, із забезпеченням асептики проведення процесу. Низьке значення рН під час культивування нейтралізуватимемо розчином лугу.

Як відомо, тип ферментерів для кожного біотехнологічного процесу необхідно вибирати з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічного аспекту.

Згідно вищенаведеної інформації для культивування *L. acidophilus* було запропоновано здійснювати мікроаерофільні умови, для цього необхідно, щоб до ферментера була підведена труба для подачі аераційного повітря. Тиск в апараті має бути 0,01 МПа, для того щоб контролювати задані умови апарат обов'язково має бути оснащений манометром.

Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини варто використовувати перемішуючий пристрій, пропоную використовувати лопатеву мішалку, оскільки культивування *L. acidophilus* не вимагає встановлення мішалки певної конструкції і типу. Основними перевагами лопатевої мішалки є її проста конструкція та досить низька вартість, недоліком - слабка інтенсивність перемішування. Враховуючи те, що для здійснення процесу біосинтезу не потрібне інтенсивне перемішування, то запропонований тип мішалки задовольняє наші вимоги. Також конструкція повинна містити відбивні перегородки, з метою відсутності утворення воронки при перемішуванні, та датчик, щоб контролювати швидкість перемішування.

Для контролю постійної температури культивування ферментер повинен бути обладнаний сорочкою і містити датчик температури. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер повинен бути забезпеченим датчиком рН.

Оскільки в поживному середовищі для культивування *L. acidophilus* присутній твін-80, що є поверхнево-активною речовиною, яка має властивості піногасіння, то використання механічного піногасника в даному випадку є недоцільним.

Таким чином, для ферментації *L. acidophilus* обираємо ферментер з лопатевою мішалкою, обладнаний трубою для подачі аераційного повітря, відбивними перегородками та датчиками контролю. За висунутими параметрами гарним варіантом може стати ферментер BLBIO-SJA від компанії «Xiangyi» (рис. 5.1).



Рис. 5.1 Ферментер BLBIO-SJA [46]

Ферментер включає такі характеристики: [46]

- Загальний об'єм - 1 м³;
- Тиск - 0~0,3 МПа;
- Матеріал – нержавіюча сталь;
- Обороти мішалки від 40 до 1000 об/хв;
- Габарити (в×d, мм): 2900×900.
- Датчик рН, температури, рівня тиску, оптичної густини культури.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Враховуючи те, що бактерія *L. acidophilus* є мікроаерофільним мікроорганізмом по відношенню до кисню та здатна накопичувати більшу кількість біомаси саме за обраних умов, то підготовка стерильного аераційного повітря при культивуванні даного виду бактерії є однією з основних задач біотехнологічного виробництва.

Підготовку стерильного стисненого аераційного повітря для біореакторів здійснюють наступним чином:

- забір атмосферного повітря здійснюватимемо на висоті 10 м за допомогою турбокомпресора через забірну шахту, даний критерій обрано відповідно до того, що із збільшенням висоти над поверхнею концентрація мікроорганізмів у повітрі є зменшується;
- для того, щоб звільнити повітря від пилу, захисту компресорів від забруднення і зниження кількості забруднюючих речовин повітря очищатимемо за допомогою фільтрів попереднього очищення;
- далі повітря стискуватимемо у турбокомпресорі до 0,35-0,5 МПа, з метою подолання опору фільтрувальних матеріалів та гідравлічного опору на послідуєчих стадіях фільтрування та під час диспергування повітря у об'ємі культуральної рідини відповідно, адже згідно забезпечених умов відбувається нагрівання повітря до температури 120–200 °С і збільшення вологовмісту на одиницю об'єму;
- далі потрібно охолодити стиснене повітря та видалити вологу у краплевловлювачі за допомогою водяного теплообмінного апарату;
- для остаточного видалення конденсованої води та вирівнювання тиску повітря необхідно подати у ресивер;
- для очищення повітря, яке подаватиметься до усіх ферментерів і видалення до 98% мікроорганізмів очищення потрібно здійснювати на головних фільтрах, які заповнені набивним волокном і встановлені в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря;

1 – реактор-змішувач для приготування композиції Б для виробничого біосинтезу об'ємом 160 л; 2 – ферментер об'ємом 1 м³; 3 – реактор-змішувач для приготування композиції А для виробничого біосинтезу об'ємом 500 л; 4 – реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в посівному апараті об'ємом 60 л; 5 – посівний апарат об'ємом 100 л; 6 – посівний апарат об'ємом 10 л

Габаритні розміри основного обладнання наведено у табл. 2.1.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для синтезу біомаси *L. acidophilus*

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	1000	0,9	2,9
Реактор-змішувач для приготування композиції А для виробничого біосинтезу	500	0,7	2,6
Реактор-змішувач для приготування композиції Б для виробничого біосинтезу	160	0,8	1,2
Посівний апарат	100	0,75	1,4
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в посівному апараті	60	0,892	1,885
Інокулятор	10	0,4	1,18
Всього	1830		

Згідно інформації наведеної в табл. 5.1, загальний об'єм використовуваного обладнання становить 1,830 м³.

Для того, щоб забезпечити чистоту приміщень, де відбуватиметься виробництво, необхідно здійснювати миття підлоги щодня, тобто 30 разів та обов'язково один раз на місяць проводити генеральне прибирання, що включає в себе обробку стін, підлоги та вікон, тобто 1 раз на 30 днів. Щоб розрахувати необхідні кількості мийних засобів потрібно здійснити розрахунок приблизної площі оброблювання мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін висотою 4 м.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 72 м² (12×6 м), площа стін – [(12 × 4) + (6 × 4)] × 2 = 144 м², загальна площа – 72 + 144 = 216 м².

Загальну площу поверхні оброблювання мийними засобами зображено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Загальна площа стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	72	144	216
Мікробіологічна лабораторія	60	128	188
Приміщення з термостатами	12	64	76
Загальна площа	144	336	480

Кількість виробничих циклів для синтезу біомаси становить 39 циклів. Враховуючи те, що миття обладнання проводиться перед кожним циклом, то кількість процесів миття за весь період виробництва закваски складає 40 (додаткове миття після останнього циклу). З огляду на те, що підібрана апаратура містить функції циркуляційної СІР-мийки, а отже, це дозволяє значно зекономити витрати мийного розчину, а також підвищити якість миття обладнання, то розрахунок мийно-дезінфікуючих засобів для одного циклу становитиме 20% - 30% від кожного з об'ємів обладнання – 0,366 м³. Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$0,366 \times 40 = 14,64 \text{ м}^3$$

Сумарні дані, які стосуються розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва зображено в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Загальна площа миття та/або дезінфекції об'єктів за весь період виробництва біомаси *L. acidophilus*

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	1,830	40	73,2

Підлога	144	30	4320
Стіни, двері, вікна	336	1	336

Підсумкова інформація вибору мийних та дезінфікуючих засобів наведена у табл. 5.4.

Таким чином, згідно даних порівняння наведених у табл. 5.4. можна зробити висновок, що найбільш економічно вигідним мийно-дезінфікуючим засобом для миття стін, дверей, вікон та підлоги є «Хлорантоін®», який є хлорактивним, багатокомпонентним, поліфункціональним миючим засобом, який не пошкоджує металеві, скляні, гумові, полімерні, дерев'яні, кахлеві, порцелянові та фаянсові об'єкти, а також устаткування з лакофарбовими, гальванічними і полімерними покриттями. Обраний мийно-дезінфікуючий засіб здатен добре емульгувати жири, видаляти з поверхонь білково-жирову плівку, легко змивається та не залишає нальоту. «Хлорантоін®» виявляє бактерицидні, туберкульозні, віруліцидні, спороцидні та фунгіцидні властивості [48]. Для обладнання доцільно використовувати «PROFI CHLOR», оскільки він має миючо-дезінфікуючі властивості, що дає можливість значно зменшити витрати на закупівлю розчинів для дезінфекції та миття окремо, а також даний засіб є ефективним до знищення бактеріофігів, наявність яких є основною проблемою при виготовленні заквасок.

З огляду на досить вигідну цінову категорію та позитивні властивості даних мийно-дезінфікуючих засобів пропоную використовувати їх.

Інформація щодо витрат мийних та дезінфікуючих засобів, які використовують під час отримання біомаси

Lactobacillus acidophilus

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
«Саніфект» ⁴⁹ (Комплекс ЧАС*)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,8 %	10 032	1003,2	360	2,88	2 889,2
«Хлорантоін®» ⁵⁰ (дихлорантин)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2 %	10 032	1003,2	340	2,72	2 728,7
«Велідез» ⁵¹ (ЧАС*, 2-пропанол, комплекс ензимів)	Стіни, підлога, вікна, двері	3 %	10 032	1003,2	495	14,85	14 897,5
«PROFI CHLOR» ⁵² (натрієва сіль дихлорізаціанурової кислоти)	Обладнання	0,3 %	14,64	2928	300	0,9	2 635,2
«Бланідас Актив» ⁵³ (третинні аміни, ЧАС*)	Обладнання	0,5 %	14,64	2928	428	2,14	6 265,9
«Дезосепт Форте» ⁵⁴ (надоцтова кислота, перекис водню, оцтова к-та)	Обладнання	1 %	14,64	2928	116	1,16	3 396,5

Примітка: *ЧАС – четвертинні амонієві сполуки. ** - ціни наведено станом на 20.04.2023

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Відповідно до здійснених раніше розрахунків (див. п 3.4) виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1 м³, що містить поживне середовище для культивування об'ємом 0,565 м³. Отримання посівного матеріалу здійснюється у три етапи: у колбах в термостаті та в посівних апаратах об'ємом 10 і 100 л. Максимальний синтез біомаси (7 г/л за 12 год) досягається за умов росту *L. acidophilus* на середовищі такого складу (г/л):

- Глюкоза - 21,0;
- K₂HPO₄ - 3,5;
- Ацетат натрію - 6,5;
- Пептон - 10,0;
- Екстракт яловичини - 8,0;
- Дріжджовий екстракт - 8,0;
- Цитрат амонію – 2,0;
- MgSO₄ – 0,2;
- Твін-80 – 1,0;

pH середовища 6,5 [10].

Стерилізації підлягають усі компоненти, крім твіну-80, який вноситиметься в поживне середовище після додавання всіх компонентів, зважаючи на його фізико-хімічні властивості.

Стерилізація ПС для вирощування інокуляту в колбах відбуватиметься в автоклаві, враховуючи, що його об'єм невеликий (0,7 л), для вирощування в посівних апаратах та ферментері для виробничого біосинтезу – безпосередньо у самих апаратах або реакторах-змішувачах при pH 4...4,5, тому варто здійснювати підготовку 6%-го розчину HCl, щоб уникнути утворення нерозчинних солей Магнію.

Особливістю процесу культивування є те, що молочнокислі бактерії виділяють велику кількість молочної кислоти, яка впливатиме на рівень pH, тому середовище для їхнього культивування повинно бути забуференим, тобто необхідно передбачити наявність 25% розчину аміачної води для регуляції pH. Пропонуємо закуповувати готовий розчин і використовувати близько 30 мл на 1 л.

Для того, щоб визначити спосіб приготування 6 %-го розчину хлоридної кислоти та потрібну кількість 25% розчину аміачної води необхідно здійснити розрахунок кількості компонентів, які знадобляться для приготування ПС для кожної стадії виробництва, а також визначимось з потрібним посудом чи обладнанням для вказаних допоміжних робіт (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Розрахунок вміст та своєрідність приготування титрувальних агентів

Об'єм середовища, м ³	HCl (6%)		NH ₄ OH (25%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,7 л	-	-	-	-
0,006	12	у колбі на 20 мл	180	-
0,056	112	у колбі на 200 мл	1680	-
0,565	1130	у колбі на 2000 мл	16 950	-

Дані, наведені у табл. 5.5, свідчать про те, що розчин HCl (6%) для виробничого біосинтезу необхідно готувати у колбах об'ємом 20, 200 мл та 2000 мл.

Підготовка та стерилізація ПС для отримання посівного матеріалу в колбах в термостаті

Щоб отримати необхідну кількість посівного матеріалу потрібно у 2 колбах об'ємом 750 мл приготувати 0,7 л ПС. Провівши аналіз складу середовища для культивування *L. acidophilus*, прийнято рішення умовно поділити його на композиції, поділ яких залежить від режиму стерилізації використовуваних компонентів:

Композиція А: глюкоза, пептон, дріжджовий екстракт, екстракт яловичини (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція Б: ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: K₂HPO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція А є нестійкою проти впливу температури та потребує щадного режиму стерилізації. Композицію Б стерилізують при типовій для солей температурі. Композицію В стерилізують окремо, з метою уникнення утворення нерозчинних

фосфатів магнію та кальцію. На даному етапі стерилізацію всіх композицій здійснюють в автоклаві. Твін-80 не підлягає попередній стерилізації, тому вноситься безпосередньо у колбу.

Підготовка і стерилізація ПС для вирощування ПМ в інокуляторі об'ємом 10 л

Для отримання ПМ необхідно 6 л середовища, стерилізація якого буде проводитись в посівному апараті, тому необхідно переглянути та змінити склад композицій ПС:

Композиція А: глюкоза, пептон, дріжджовий екстракт, екстракт яловичини (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція Б: ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію, K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Щоб зменшити витрати та значно спростити технологічний процес основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію, яку спочатку варто розчинити в колбі об'ємом 10 л, та стерилізують в посівному апараті. З метою уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію рН розчину, що містить солеві компоненти, перед початком стерилізації доводять 6 %-м розчином соляної кислоти до значення рН 4,0 – 4,5.

Стерилізація композиції А відбувається в автоклаві при вказаних параметрах.

По закінченню процесу стерилізації та поступового охолодження середовища, стабілізують його значення рН до 6,8-7,0 25 %-м розчином стерильної аміачної води.

Підготовка і стерилізації ПС для вирощування ПМ в інокуляторі об'ємом 100 л

Для одержання інокуляту необхідно 56 л ПС, тому стерилізація буде здійснюватися безпосередньо в інокуляторі. Поділ середовища на композиції залишається таким самим, як і для його стерилізації у посівному апараті об'ємом 10 л.

Стерилізація композиції Б відбувається безпосередньо в інокуляторі об'ємом 100 л. Щоб попередити утворення нерозчинних фосфатів магнію рН розчину, що містить солеві компоненти, перед початком стерилізації варто довести 6 %-м розчином соляної кислоти до значення рН 4,0 – 4,5.

Відповідно композицію А готують та стерилізують у збірнику об'ємом 60 л.

По закінченню процесу стерилізації та поступового охолодження середовища, стабілізують його значення рН до 6,8-7,0 25 %-м розчином стерильної аміачної води.

Підготовка і стерилізація ПС для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 м³

Щоб здійснити культивування обраного біологічного агенту у ферментері потрібно приготувати 565 л поживного середовища, тому стерилізація буде здійснюватися безпосередньо у реакторах-змішувачах.

Щоб зменшити витрати та значно спростити технологічний процес основні і фосфорні солі варто об'єднати в одну композицію, яку спочатку розчиняють в окремому збірнику об'ємом 160 л і стерилізують. З метою уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію рН розчину, що містить солеві компоненти, перед початком стерилізації доводять 6 %-м розчином соляної кислоти до значення рН 4,0 – 4,5.

По закінченню процесу стерилізації та поступового охолодження середовища, стабілізують його значення рН до 6,8-7,0 25 %-м розчином стерильної аміачної води.

Відповідно композицію А готують та стерилізують у збірнику об'ємом 500 л.

Аргументування вибору розчинів, які регулюють рН, та піногасника

Для коригування рівня рН середовища під час культивування мікроорганізмів, застосовують 6%-й розчин соляної кислоти та 25%-й розчин аміачної води.

Враховуючи те, що поживне середовище містить речовини, які сприяють піноутворенню (дріжджовий екстракт, пептон, екстракт яловичини), можливе інтенсивне утворення піни, але використовувати механічний або хімічний спосіб піногасіння недоцільно, оскільки до складу поживного середовища входить твін-80 – оліїста речовина, що має піногасні властивості. Таким чином, встановлювати механічні піногасники чи додавати піногасні речовини не потрібно.

Таким чином, технологічна схема, окрім стадій підготовки ПС, містить наведені нижче додаткові стадії:

- приготування 6%-го розчину хлоридної к-ти для підкислення середовища під час стерилізації його в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л, а також ферментаторі – 1 м³;
- наявність 25%-го розчину NH₄OH для нормалізації рН середовища перед початком вирощування в інокуляторах об'ємом 10 та 100 л, ферментаторі – 1 м³. Крім того необхідно передбачити наявність таких збірників:
- збірник об'ємом 60 л для приготування для приготування композиції А (об'ємом 50 л) на стадії культивування у посівному апараті об'ємом 100 л;
- збірник об'ємом 500 л для приготування композиції А (об'ємом 450 л) на стадії виробничого біосинтезу;
- збірник об'ємом 160 л для приготування композиції Б (об'ємом 115 л) на стадії виробничого біосинтезу.

5.2. Етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту

Як відомо, після здійснення процесу біосинтезу, одержана у процесі культивування культуральна рідина містить залишки компонентів ПС, метаболіти, а також біомасу біологічного агенту. Тому варто забезпечити відокремлення цільового продукту від культуральної рідини, оскільки супутні речовини можуть значно погіршити якість готового продукту.

На сьогоднішній день найбільш поширеними методами відокремлення біомаси бактерій від культуральної рідини є: фільтрація, флотація, центрифугування та сепарація.

Таблиця 5.6

Характеристика різних методів відокремлення цільового продукту

Назва методу	Принцип відділення	Переваги використання	Недоліки використання	Література
Фільтрація	Суспензія проходить через фільтр або через полімерну сітку, яка має певний діаметр отворів, що	Є менш затратним в енергетичному плані	Під час проходження частини клітин через пори	[55]

	забезпечує механізм відділення твердої фази від рідкої.		фільтру мають місце значні втрати біомаси	
Флотація	Принцип відділення полягає у продуванні газу крізь рідину, що містить тверді частки або частки іншої рідини	Значно економічній процес, продуктивність на високому рівні, можливість використання в безперервних процесах	Значні втрати біомаси	[56]
Центрифугування	Процес розділення відбувається під дією відцентрових сил, суміш рідини з твердими часточками проходить через фільтрувальний матеріал або через металеву сітку, в результаті чого тверда фаза затримується	Автоматизований процес, менші втрати біомаси порівняно з попередніми двома способами відділення біомаси	Менш результативний у порівнянні із сепаруванням	[57]
Сепарування	Процес розділення відбувається під дією відцентрових сил, при цьому суміш рідини з твердими часточками проходить через міжтарілчастий простір сепаратора	Автоматизований процес, менші втрати біомаси у порівнянні із фільтрацією та флотацією та більша результативність щодо центрифугування	Вищий механічний вплив на клітини	[58]

З огляду на вищенаведену інформацію у табл. 5.6. найбільш ефективним методом відокремлення біомаси від культуральної рідини є метод сепарування.

Перевагами даного методу є:

- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;

- можливість автоматизувати процес;
- більша ефективність порівняно з центрифугуванням.

Тому відокремлення біомаси *L. acidophilus* від культуральної рідини здійснюватимемо методом сепарування, що має ряд позитивних характеристик у контексті виробництва готового продукту.

Важливим етапом технологічного процесу виробництва заквасок, що містять пробіотичні культури, є стабілізація біомаси бактерій після здійснення відокремлення від КР, щоб захистити клітини від суттєвих змін в їхній структурі на подальших етапах, що можуть призвести до руйнації клітин і втрати їх життєдіяльності. При цьому забезпечується стабільність клітин не лише задля збереження життєздатності, але й щоб вони володіли метаболічною та функціональною активністю, адже потрібно щоб була змога підтримувати бажані сенсорні властивості та забезпечувати заявлену користь пробіотичних препаратів для здоров'я протягом усього терміну зберігання [59].

У промислових масштабах часто для стабілізації біомаси використовують поєднані захисні середовища, що містять у своєму складі сахарозу, лактозу, цитрат, глютамат натрію, знежирене молоко, сироватку з додаванням різних вуглеводів, багатоатомних спиртів і солей. Вони здатні запобігати пошкодженню клітин на подальших етапах виготовлення закваски, зокрема при здійсненні процесу сушіння.

Враховуючи те, що ми пропонуємо виготовляти закваску у вигляді висушеного порошку, то необхідно захистити клітини від впливу низьких і високих температур під час сушіння. Кріопротектори та ліопротектори (речовини, які входять до захисного середовища) уповільнюють швидкість росту льоду за рахунок збільшення в'язкості розчину та стабілізують ліпідну двошарову структуру клітинної мембрани при відсутності води [60].

Ще одним альтернативним способом стабілізації біомаси є іммобілізація клітин у гелі гідроксиду алюмінію та ацетилфталіцилцелюлози. Цей процес гарантує високий ступінь життєздатності бактерій під час зберігання і дає можливість виключити з техпроцесу сублімацію, що забезпечує збереження енергетичного та

економічного ресурсу. Недоліком цього способу є те що він складно організований та потребує дослідження значно малих кількостей утвореної КР [61].

Аналіз способів стабілізації біомаси бактерій підтвердив, що найбільш вигідним з економічної точки зору і діючим способом є додавання захисного середовища, яке містить кріо- та ліопротектори, тому пропонуємо використовувати саме цей спосіб стабілізації.

Дисахариди, такі як сахароза і трегалоза, є прекрасними захисними компонентами під час сушіння. Їх позитивний аспект полягає в тому, що в гідратованому стані конформація та цілісність білків і мембран стабілізується взаємодією з молекулами води. Після видалення водної фази полярні групи цукрів здатні підмінити молекули води. Полярні головні групи мембрани спроможні здійснювати взаємодію з ОН-залишками сахариду використовуючи водневий зв'язок. Неподільність мембрани здатна бути збережена після процесу регідратації, адже в процесі дегідратації залишається чимало місця між головними групами [62].

Добавки, що утворюють матрицю, і часто називаються допоміжними речовинами, до яких належать знежирене молоко, манітол та сироватка. Найбільш часто застосовуваним є знежирене молоко у порівнянні з іншими компонентами, оскільки завдяки його властивостям відсоток життєздатних клітин є більшим як після процесу сушіння, так і при зберіганні. У якості додаткового компоненту варто застосовувати білкові речовини як рослинного походження (соєвий пептон), так і тваринного (желатин). Для таких процесів найчастіше використовують білковий продукт саме тваринного походження – желатин, оскільки він є сумішшю лінійних поліпептидів, які мають різну молекулярну масу і в такому випадку має значний вплив на виживання пробіотичного мікроорганізму [63]. Він попереджає пошкодження клітинної структури за рахунок утворення на клітинній стінці захисного покриття. Білок діє у якості неактивного заповнювача та утворює навколо клітин захисне покриття і знижує припустимість того, що більший відсоток клітин злипнеться між собою. Тому для захисту клітин пробіотичних препаратів варто використовувати універсальне захисне середовище, що містить в собі потрібні компоненти. Для допоміжного захисту використовують желатин, оскільки з огляду

на їх дію в сукупності вони забезпечують збереження заявленої кількості живих клітин.

Кінцевою формою препарату, який ми пропонуємо виготовляти, є висушений порошок, адже така форма забезпечує стабільність та якість препарату під час тривалого зберігання. Щоб отримати порошкоподібні препарати варто їх висушувати, використовуючи розпилювальну сушарку, сублімаційну сушарку або вакуумну сушку [64].

Найбільш ефективним методом сушіння біомаси бактерій є метод ліофілізації. Перевагами ліофільного сушіння, порівняно з наведеними способами, є:

- не відбувається зниження активності живих клітин у процесі;
- зберігання дисперсної фази кінцевого продукту;
- досить тривалий термін зберігання отриманого препарату;
- немає значних впливів високих температур.

Процес ліофілізації розділяють на етап заморожування, етап первинної сушка та етап вторинного висушування, після чого первинні властивості продуктів висушених у такий спосіб можуть бути відновлені додаванням вологої речовини. Недоліками даного процесу є те, що препарат потрібно старанно підготувати до процесу висушування, створити високий вакуум для повного процесу висушування, а також він є досить часо- та енергозатратним [65].

Таким чином, для одержання сухої біомаси *L. acidophilus* необхідно спочатку відділити її від культуральної рідини, використовуючи метод сепарування, додати захисне середовище та потім здійснити ліофільне сушіння.

5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів

Обладнання, яке прийнято використовувати з метою відокремлення біомаси від КР здебільшого моделюють таким чином, щоб поверхні, які напряду контактують із сировиною, не змінювали характеристики АФІ, вимоги яких зазначають у сертифікатах або відповідних специфікаціях. Також, основним критерієм підбору апаратури є те, що вона повинна мінімально впливати на активність, цілісність клітин і кількісний склад мікроорганізмів [66].

Для процесу відділення біомаси від культуральної рідини пропонуємо використовувати сепаратор-очищувач HAUS MAXCLEAN 40T (рис. 5.3), що виготовлений із нержавіючої сталі EN 1.4418. Розміри - 1940×1210×2280, потужність становить 45 кВт, продуктивність - до 40 000 л/год [67].



Рис. 5.3. Сепаратор-очищувач HAUS MAXCLEAN 40T [67]

Як було зазначено вище для отримання порошкоподібних препаратів застосовуються різні методи сушіння серед яких було обрано сублимаційну сушку (ліофілізацію). Тому апарати, які застосовують у процесі сушіння, необхідні мінімально впливати на якість АФІ, і навпаки гарантувати максимально можливу кількість життєздатних і непошкоджених клітин пробіотичних бактерій [66].

Тож пропонуємо для здійснення процесу висушування цільового продукту використовувати ліофілізатор CryoVit CC-300, що має ряд позитивних характеристик, зокрема він має програму автоматичного процесу з різними механізмами, потужну систему охолодження, досить низьке енергоспоживання та виготовлений із високоякісної нержавіючої сталі [68].



Рис. 5.4. Сублімаційна сушарка промислова CryoVit CC-300 [68]

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

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

Таблиця 6.1

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

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник ainer deltafan maxi. Оснащений металевією сіткою для видалення механічних забруднень. Продуктивність [м ³ /Год]: 1100 — 1800 Перепад тиску [Pa] 25 — 40 [69].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр панельний для грубої очистки повітря. Розміри [мм]: 592×592×292. Клас очищення – F5. Площа фільтроматеріалу [м ²] - 18. Продуктивність [м ³ /Год] – 3400. Початковий опір [Па] – 65. Робоча температура 80 °С. Матеріал (на замовлення): каркасна сітка, вінілові сітки або відкритопористий поліуретан. Каркас з оцинкованої сталі. Виробник: «ВЕНТ-ФІЛЬТР» (Україна) [70].
К-3	Компресор	1	Компресор безмасляний INTERTOOL PT-0001. Продуктивність – 45 л/хв. Потужність двигуна – 0,3 кВт. Максимальний тиск – 3,2 атм. Виробник: «INTERTOOL» (Україна) [71].

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата				
Розроб.		Синявська Д.А.			РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	Літ.	Арк.	Аркциф
Перевір.		Грегірчак Н.М.					62	6725
Консульт.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.						62		
Затверд.		Стадніков В.П.						

T-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач стисненого повітря OMI RA 20. Продуктивність [м ³ /год]: 120. Потужність - 0.16 кВт. Робочий тиск – 7 бар (16 max). Виробник: «ОМІ» (Італія) [72].
P-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря P 300.600. Об'єм: 300 л. Робочий тиск – 10 атм. Внутрішній діаметр 600 мм, товщина стінки 5 мм. Виробник: ТД «ПНЕВМО-КОМПЛЕКТ» (Україна) [73].
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник HYBRID. Матеріал – нержавіюча сталь 316L. Робочий тиск – від -1 до 32 бар. Робоча температура від – 40 °С до + 350 °С. Виробник: ООО «ТАПФЛО» (Україна) [74].
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Повітряний вугільний фільтр, призначений для класу очищення F9, здатен утримувати частки розміром до 0,4 мкм. Розміри, мм: 592×592×96. Виробник: «Alter Air» (Україна) [75].
Ф-8 Ф-15 Ф-26	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр HEPA. Клас фільтрації H14. Фільтруючий матеріал: мікроскловолокно. Максимальна робоча температура: 80 °С. Максимальна продуктивність: 1000 м ³ /год. Ефективність очищення: 99,995%. Розміри, мм: 610×610×78. Виробник: ТОВ «Теко Україна» (Україна) [76].
ПА-9	Посівний апарат на 10 л	1	Посівний апарат на 10 л BIOF-S10L. Розміри, мм: 1180×400. Потужність двигуна - 0,4 кВт. Матеріал, що контактує із середовищем, - нержавіюча сталь 316L; решта - нержавіюча сталь 304. Оснащений подвійною сорочкою. Можливість підключення до СІР мийки. Включено датчики контролю рН, температури, подачі повітря, оптичної густини культури. Можливість підключення різноманітних мішалок.

			Можлива швидкість обертів мішалки 50-600 об/хв. Оснащений барботером. Виробник: «Xiangyi» (Китай) [77].
Н-10	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний Standard Pump. Продуктивність – 6,25 л/год. Максимальна робоча температура 100 °С. Виробник: «Aspen Pumps» (Великобританія) [78].
Д-11	Об'ємно-ваговий дозатор		Дозатор ваговий автоматичний F-5000. Діапазон – від 10 г до 5 кг. Точність дозування – 0,2-0,5 г. Матеріал - нержавіюча сталь AISI 304. Розміри, мм: 620×420×1150. Виробник: «НВО Гідромаш-1» (Україна) [79].
Д-12 Д-19 Д-23	Об'ємний дозатор для подачі води		Дозатор для води та рідин. Мінімальний крок дозування 0,1 л. Похибка дозування 2-5%. Робочий тиск 0-1,5 МПа. Виробник: «mBev» (Україна) [80].
З-13	Збірник на 60 л	1	Хімічний реактор на 60 л. Розміри, мм: 1885×892. Матеріал, що контактує із середовищем, - нержавіюча сталь 316L; решта - нержавіюча сталь 304. Робочий тиск – до 0,4 бар. Оснащений подвійною сорочкою та мішалкою. Виробник: «Промвіт» (Україна) [81].
Н-14 Н-17 Н-25	Насос перистальтичний	3	Насос перистальтичний ВНЗ-V. Продуктивність – 100 л/год. Тиск - до 1,5 бар. Двигун - 0,02 кВт. Виробник: «ETATRON D.S.» (Італія) [82].
І-16	Інокулятор на 100 л	1	Інокулятор на 100 л BIOF-S100L. Розміри, мм: 1400×750. Матеріал, що контактує із середовищем, - нержавіюча сталь 316L; решта - нержавіюча сталь 304. Потужність двигуна – 1,5 кВт. Оснащений подвійною сорочкою. Можливість підключення до СІР мийки. Включено датчики контролю рН, температури, подачі повітря, оптичної густини культури.

			Можливість підключення різноманітних мішалок. Можлива швидкість обертів мішалки 50-600 об/хв. Оснащений барботером. Виробник: «Xiangyi» (Китай) [77].
Д-18 Д-22	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Ваговий дозатор ВД-4. Вага дози: 1 - 50 кг. (Теоретично допустиме фасування 0,15 кг-100 кг); Швидкість фасування: до 5 доз/хв; Похибка дозування 0,35%. Виробник: «ABC Tech» (Україна) [83].
P-20	Реактор на 500 л	1	Реактор на 500 л WHGCM. Розміри, мм: 2600×700. Матеріал, що контактує із середовищем, - нержавіюча сталь 316L; Максимальний робочий тиск - 10 МПа. Робоча температура від – 195 до + 500 °С. Має можливість оснащуватись різними типами мішалок. Оснащений датчиком контролю температури та манометром. Виробник: «WHGCM» (Китай) [84].
H-21 H-28	Насос перистальтичний	2	Насос перистальтичний PTL25. Продуктивність - 0,76 м ³ /год. Температура - до 135 °С. Тиск - до 4 бар. Виробник: «Гарфло» (Україна) [85].
P-24	Реактор на 160 л	1	Реактор 160 л. Розміри, мм: 1200 × 800. Матеріал, що контактує із середовищем, - нержавіюча сталь ALSI 316L. Має можливість підключення до СІР мийки. Виробник: «ТМ Промвіт» (Україна) [86].
Ф-27	Ферментер на 1 м ³	1	Ферментер на 1 м³ VLBIO-SJA. Розміри, мм: 2900×900. Матеріал, що контактує із середовищем, - нержавіюча сталь 316L; решта - нержавіюча сталь 304. Оснащений подвійною рубашкою. Можливість підключення до СІР мийки. Наявні датчики контролю рН,

Закінчення табл. 6.1

			<p>температури, подачі повітря, оптичної густини культури. Можливість встановлення мішалок різного типу. Можлива швидкість обертів мішалки - 50-1000 об/хв. Оснащений барботером.</p> <p>Виробник: «Xiangyi» (Китай) [87].</p>
--	--	--	--

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема біосинтезу біомаси включає допоміжні роботи до яких входить підготовка аераційного повітря, санітарна підготовка виробництва, зокрема приготування мийно-дезінфікуючих засобів, підготовка до належного вигляду виробничих приміщень, оснащення, персоналу, приготування та стерилізація ПС та технологічний процес, що супроводжується підготовкою посівного матеріалу і виробничим біосинтезом.

Технологічну схему біосинтезу біомаси наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Коли працівник, який задіяний безпосередньо у виробництві, влаштовується на нове робоче місце та щорічно має пройти медогляд, систематичне навчання, які стосуються санітарно-гігієнічних вимог, а також інструктажу з правил особистої гігієни.

Кожен працівник зобов'язаний мати чотири комплекти робочої форми та змінювати її у міру забруднення. Персонал повинен дотримуватись санітарно-гігієнічних вимог та нести відповідальність за виконувану на його ділянці роботу. Робочий одяг одержують з пральні випраним, продезінфікованим та запакованим у стерильні пакети.

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Працівники підприємства повинні проходити технологічний інструктаж, які стосуються безпосереднього його роботи на даному підприємстві, факт проходження інструктажу варто записувати у журналі.

Існують такі навчання:

- *основне навчання*, проведення якого здійснюється один раз на рік; колектив ознайомлюється з теоретичною та практичною частиною;

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>					
					<i>РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцішів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>								
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>							67	6725
<i>Консульт.</i>								61 <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>										
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

- *вхідне навчання*, проведення якого відбувається за необхідності, зокрема у тому випадку, коли приходить новий співробітник;
- *подальше навчання*, проведення якого здійснюється регулярно.

Також проводять інструктаж з техніки безпеки, а дані про ознайомлення фіксують у спеціальному документі.

ДР 1.1.2. Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу і візуальний медогляд

Працівники мають проходити попередній і періодичні медичні огляди згідно планування графіку проведення медичних оглядів, затверджених закладами охорони здоров'я (ст. 26 Закону України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення»). Факт проходження медогляду записується у журналі контролю.

ДР 1.2. Приготування мийних та дезінфікуючих розчинів

Рідини, які застосовують у якості мийних та дезінфікуючих розчинів, варто зберігати у приміщенні, без доступу прямого сонячного світла, яке є добре провітрюваним. Пакування, в яких містяться рідини, повинні бути щільно закупорені, а пусті - відповідно передані на знешкодження.

ДР 1.2.1. Приготування робочого розчину «PROFI CHLOR»

Для дезінфекції ферментаційного обладнання та реакторів використовують робочий розчин «PROFI CHLOR» (0,3%). *Спосіб приготування:* на технічних вагах зважують 3 г концентрату «PROFI CHLOR», наважку переносять в ємність із хімічно стійкого матеріалу та додають 997 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

ДР 1.2.2. Приготування робочого розчину «Хлорантоїн»

Для миття використовується робочий розчин «Хлорантоїн» (0,2%). *Спосіб приготування:* на технічних вагах зважують 2 г концентрату «Хлорантоїн», наважку переносять в ємність із хімічно стійкого матеріалу та додають 998 мл води питної, перемішують та закривають кришкою.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання приміщень здійснюють один раз на зміну вологим способом з метою видалення часточок пилу і бруду з усіх поверхонь. Під час здійснення вологого прибирання застосовують 0,2 % робочий розчин «Хлорантоїн» (від ДР 1.2.2). Після закінчення відповідних маніпуляцій для знезараження повітря варто увімкнути бактерицидні лампи.

Контроль мікробіологічної чистоти приміщень рекомендовано проводити не рідше одного разу на тиждень під час виробничого процесу і після дезінфекційної обробки - не рідше одного разу в місяць. Після проведення дезобробки не повинно бути виявлено життєздатних бактерій та грибів.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться у відведений для цього підприємством час не рідше одного разу на місяць, застосовуючи мийно-дезінфікуючий 0,2 % робочий розчин «Хлорантоїн» (від ДР 1.2.2). Під час прибирання необхідно здійснювати обробку всіх поверхонь виробничого приміщення. Після закінчення відповідних маніпуляцій для знезараження повітря варто увімкнути бактерицидні лампи.

Після дезінфекційної обробки не повинно міститися життєздатних мікроорганізмів.

ДР 1.4. Підготовка обладнання

Підготовка технологічного обладнання включає в себе комплекс заходів, наведених нижче.

У змивах з обладнання та інвентарю після дезінфікування не повинно бути виявлено життєздатних мікроорганізмів.

ДР 1.4.1. Миття обладнання

Для миття обладнання використовують станцію СІР – мийки, очищену воду і 0,3 %–й робочий розчин «PROFI CHLOR» (від ДР 1.2.1) з метою очищення його від залишків біомаси або культуральної рідини. Промивання триває близько 30 хвилин, при цьому контролюється рН рідких відходів, яке повинно становити 6,5-8,5; температура води – 80 °С. Відпрацьовані розчини направляються на знешкодження.

ДР 1.4.2. Ополіскування обладнання

Обладнання після миття потрібно ополоснути очищеною водою при температурі 30-40 °С.

ДР 1.4.3. Технічний огляд обладнання

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання, щоб впевнитись у його справності. Якщо у процесі перевірки виявлено нещільні з'єднання, то варто компетентній особі провести розбір та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації.

ДР 1.4.4. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірка на герметичність апаратури здійснюється стисненим повітрям, яке подають з метою утворення надлишкового тиску (до 0,2 МПа). Значення тиску контролюють по манометру, якщо тиск не змінюється, то апарат герметичний, у разі зменшення тиску - обладнання має дефекти.

Нещільність у фланцевих з'єднаннях, клапанах перевіряють за допомогою мильного розчину. У випадку негерметичності на місцях з'єднань будуть утворюватися мильні бульбашки. Якщо у процесі перевірки виявлено дефекти, то їх усувають та проводять повторну перевірку.

ДР 1.4.5. Підігрів

Здійснюють підігрів обладнання до 70 °С, за допомогою насиченої пари.

ДР 1.4.6. Стерилізація обладнання

Для стерилізації ємнісного обладнання відкривають усю запірну арматуру на комунікаціях та обладнанні і подають гостру пару в апарат, відкривши вентиль відпрацьованого повітря з метою видалення його з апарату.

Коли температура в апараті становитиме 130-135°С, закривають запірну арматуру, окрім парової, і витримують впродовж 1,5 години при тиску 0,3 МПа. Конденсат, утворений в процесі стерилізації, подають на знешкодження.

ДР 1.4.7. Охолодження

При охолодженні закривають запірну арматуру подачі пари в апарат та подають у сорочку холодну воду. Процес охолодження триває до досягнення температури 30-40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003 - 0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітрозбірника (ПЗ-1) через забірний повітропровід на висоті 10 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де стабільна концентрація мікроорганізмів.

ДР 2.2. Очищення від грубих домішок

Попереднє очищення повітря від грубих домішок здійснюють у фільтрі (Ф-2), що має ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром $\delta > 50$ мкм.

ДР 2.3. Стиснення повітря

З метою утворення аераційних умов та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері а також інших опорів повітря піддають стисненню у компресорі (К-3). Умовами даного процесу є нагрівання до 120-250 °С, тиск становить 0,35 МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 2.3) надходить в теплообмінник-охолоджувач (Т-4), де відбувається охолодження до температури 25-30 °С з метою видалення надлишкової вологи.

Надмірну вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де відбувається усунення пульсації руху повітря, що може негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення. На даному етапі показник вологості повинен становити 60-70%.

ДР 2.5 Нагрівання повітря

Охоложене повітря (від ДР 2.4) потрапляє до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де відбувається нагрівання до температури 45-50 °С. На даному етапі показник вологості становить $W = 50$ %.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 2.5) потрапляє до головного фільтра очистки (Ф-7), який розміщують біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення повітря становить $E = 95$ %. Заміну фільтрувального матеріалу за вказаних вимог або за потреби.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 2.6) через трубопроводи подають в індивідуальні фільтри (Ф-8, Ф-15, Ф-26) кожного біореактору до ТП 5.5, ТП 5.6 та ТП 6.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає $E = 99,999\%$ та КУО – 0.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

ДР 3.1 Приготування 6%-го р-ну хлоридної кислоти

ДР 3.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 10 л

Для приготування 12 мл 6%-го розчину HCl в колбу об'ємом 20 мл вносять 10 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 2 мл 37%-го розчину HCl, відміряного циліндром. Рідини змішують у вказаному порядку, але ні в якому разі не навпаки, щоб уникнути утворення сильної екзотермічної реакції, потім колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 100 л

Для приготування 112 мл 6%-го розчину HCl в колбу об'ємом 200 мл вносять 93,3 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 18,7 мл 37%-го розчину HCl, відміряного мірним циліндром. Рідини змішують у вказаному порядку, але ні в якому разі не навпаки, щоб уникнути утворення сильної екзотермічної реакції, потім колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у виробничому ферментері об'ємом 1 м³

Для приготування 1130 мл 6%-го розчину HCl в колбу об'ємом 2000 мл вносять 941,7 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 188,3 мл 37%-го розчину HCl, відміряного мірним циліндром. Рідини змішують у вказаному порядку, але ні в якому разі не навпаки, щоб уникнути утворення сильної екзотермічної реакції, потім колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах в термостаті

Щоб виростити посівний матеріал у колбах в термостаті варто приготувати 700 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 700 мл середовища наведено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в колбах в термостаті

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 0,7 л середовища, г	Вода, мл	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	21,0	14,7	617,1	А	650
Пептон	10,0	7			
Дріжджовий екстракт	8,0	5,6			
Екстракт яловичини	8,0	5,6			
Ацетат натрію	6,5	4,55	25,91	Б	32
Цитрат амонію	2,0	1,4			
Сульфат магнію	0,2	0,14			
K_2HPO_4	3,5	2,45	15,55	В	18
Всього	59,2	41,44	658,56	-	700

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 14,7 г глюкози, 7 г пептону, 5,6 г дріжджового екстракту та 5,6 г екстракту яловичини, отриману наважку поміщають у колбу об'ємом 1000 мл, додають 617,1 мл дистильованої води і перемішують, потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С (0,05 МПа) упродовж 30 хв. Обов'язково після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Простерилізовану композицію подають ТП 5.4.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 4,55 г CH_3COONa , 1,4 г цитрату амонію та 0,14 г сульфату магнію. Наважки поміщають у колбу об'ємом 50 мл, додають 25,91 мл

дистильованої води і перемішують, потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Обов'язково після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Простерилізовану композицію подають ТП 5.4.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 2,45 г K_2HPO_4 , отриману наважку переносять у колбу об'ємом 25 мл, додають 15,55 мл дистильованої води і перемішують, потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Після цього здійснюють мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Простерилізовану композицію подають ТП 5.4.

ДР 4.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту L. acidophilus в посівному апараті об'ємом 10 л

Для вирощування ПМ в інокуляторі об'ємом 10 л потрібно приготувати 6 л ПС. Розрахунок необхідних кількостей компонентів наведений у табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Композиції стерилізації компонентів в інокуляторі об'ємом 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 6 л середовища, г	Вода, мл	Конденсат, мл	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	21,0	126	3718	-	А	4
Пептон	10,0	60				
Дріжджовий екстракт	8,0	48				
Екстракт яловичини	8,0	48				
Ацетат натрію	6,5	39	1927	192,7	Б	2
Цитрат амонію	2,0	12				
Сульфат магнію	0,2	1,2				
K_2HPO_4	3,5	21				
Всього	59,2	355,2	5645	192,7	-	6

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 126 г глюкози, 60 г пептону, 48 г дріжджового екстракту та 48 г екстракту яловичини. Наважки переносять у колбу об'ємом 5 л та додають 3718 мл дистильованої води, потім колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію нестійких проти дії тепла компонентів середовища здійснюють в автоклаві при температурі 112 °С (0,05 МПа) упродовж 30 хв. Обов'язково після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Простерилізована композиція надходить до ТП 5.5.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

39 г ацетату натрію, 12 г цитрату амонію, 1,2 г сульфату магнію та 21 г K_2HPO_4 зважують на технічних вагах, вносять наважки у колбу об'ємом 3 л та розчиняють їх у 1927 л води питної, вносять 12 мл 6%-го розчину HCl (від ДР 3.1.1). Стерилізацію здійснюють у посівному апараті (ПА-9) при температурі 131 °С (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Обов'язково після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 100 л

На даному етапі необхідно 56 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування такої кількості ПС наведено в табл. 7.3.

Таблиця 7.3

Композиції стерилізації компонентів в посівному апараті об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 56 л середовища, г	Вода, л	Конденсат, л	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	21,0	1176	47,3	4,73	А	50
Пептон	10,0	560				
Дріжджовий екстракт	8,0	448				
Екстракт яловичини	8,0	448				

Ацетат натрію	6,5	364	5,3	0,53	Б	6
Цитрат амонію	2,0	112				
Сульфат магнію	0,2	11,2				
K ₂ HPO ₄	3,5	196				
Всього	59,2	3315,2	52,6	5,26	-	56

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатора (Д-11) зважують 1176 г глюкози, 560 г пептону, 448 г дріжджового екстракту та 448 г екстракту яловичини. Наважки поміщають у збірник (З-13) об'ємом 60 л. За допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-12) в збірник додають 47,3 л води питної і перемішують. Стерилізація композиції А відбувається в збірнику (З-13) об'ємом 60 л при температурі 112 °С (0,05 МПа) упродовж 30 хв. Після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Простерилізована композиція надходить до ТП 5.6 за допомогою перистальтичного насоса (Н-14).

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

364 г ацетату натрію, 112 г цитрату амонію, 11,2 г сульфату магнію та 196 г K₂HPO₄ зважують на технічних вагах, вносять наважки у колбу об'ємом 10 л та розчиняють їх у 5,3 л води питної, вносять 112 мл 6%-го розчину НСІ (від ДР 3.1.2). Стерилізацію здійснюють у посівному апараті (І-16) при температурі 131 °С (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Обов'язково після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти.

*ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *L. acidophilus* у виробничому ферментері об'ємом 1 м³*

Для вирощування у ферментері об'ємом 1 м³ необхідно приготувати 565 л ПС.

Розраховані кількості компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту у ферментері об'ємом 1 м³ наведені у табл. 7.4.

Композиції стерилізації компонентів у ферментері об'ємом 1 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 565 л середовища, кг	Вода, л	Конденсат, л	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	21,0	11,87	423,4	42,34	А	450
Пептон	10,0	5,65				
Дріжджовий екстракт	8,0	4,52				
Екстракт яловичини	8,0	4,52				
Ацетат натрію	6,5	3,67	108,1	10,81	Б	115
Цитрат амонію	2,0	1,13				
Сульфат магнію	0,2	0,113				
K ₂ HPO ₄	3,5	1,98				
Всього	59,2	33,45	531,5	53,15	-	565

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою вагового дозатора (Д-18) зважують 11,87 кг глюкози, 5,65 кг пептону, 4,52 кг дріжджового екстракту та 4,52 кг екстракту яловичини. Наважки поміщають у реактор (Р-20) об'ємом 500 л. За допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-19) у реактор додають 423,4 л води питної і перемішують. Стерилізація композиції А відбувається в реакторі (Р-20) об'ємом 500 л при температурі 112 °С (0,05 МПа) упродовж 30 хв. Обов'язково після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Простерилізована композиція надходить до ТП 6.1 за допомогою перистальтичного насоса (Н-21).

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатора (Д-22) зважують 3,67 кг ацетату натрію, 1,13 кг цитрату амонію, 0,113 кг сульфату магнію та 1,98 кг K₂HPO₄. Наважки поміщають у реактор (Р-24) об'ємом 160 л. За допомогою об'ємного дозатора для подачі води (Д-19) у реактор додають 108,1 л води питної і перемішують, додають 1130 мл 6%-го

розчину HCl (від ДР 3.1.3). Стерилізація композиції Б відбувається в реакторі (Р-24) об'ємом 160 л при температурі 131 °С (0,15 МПа) упродовж 40 хв. Обов'язково після стерилізації проводять мікробіологічний контроль на відсутність мікробіоти. Простерилізована композиція надходить до ТП 6.1 за допомогою перистальтичного насосу (Н-25).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримування колекційної культури *L. acidophilus*

Культуру мікроорганізму *L. acidophilus* зберігають у пробірках зі скошеним MRS середовищем у холодильнику при температурі 4 °С. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Рекомендовано роботи з використовуваною колекційною культурою здійснювати строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру розсівають методом виснажуючого штриха на MPC агар у чашки Петрі до ізольованих колоній та вирощують у термостаті при температурі 37°С упродовж 24 год. До ТП 5.3.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу у пробірках

Здійснюють пересіви петлею в пробірки зі скошеним MPC агаром одержаних ізольованих колоній з чашки Петрі (від ТП 5.2), враховуючи те, що одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки. У пробірки роблять пересів ізольованих колоній, які розташовані на відстані не менше 1 см. Культивування здійснюють в термостаті при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 год). Мікробіологічний контроль культури здійснюють за допомогою мікроскопіювання через кожні 5-6 год.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу у колбах в термостаті

Щоб забезпечити вирощування рідкого ПМ у колбу об'ємом 1 л до 650 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.1), в асептичних умовах додають 32 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.2), 18 мл розчину композиції В (від ДР 4.1.3) та 0,7 мл твіну-80, перемішують та охолоджують. Потім середовище розливають по 350 мл у 2 стерильні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку, яка містить робочу культуру *L. acidophilus*, вирощену в MPC агарі, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, відбирають за допомогою

піпетки отриману бактеріальну суспензію і вносять у колби з розлитим ПС. Щоб засіяти одну колбу варто використати бактеріальну суспензію, яку отримують з 1 пробірки. Культивують у термостаті при $t = 37 \pm 1$ °С протягом 12 год.

Мікробіологічний контроль культури здійснюють кожні 5-6 год мікроскопіюванням. Після вирощування у термостаті КР з колб подають у засівну колбу об'ємом 1 л, яка є стерильною. До ТП 5.5.

*ТП 5.5. Вирощування *L. acidophilus* в посівному апараті об'ємом 10 л*

У попередньо простерилізований посівний апарат (ПА-9) об'ємом 10 л, в якому вже міститься готова композиція Б (ДР 4.2.2) подають (через засівну колбу від ТП 5.4) 2,5 л розчину композиції А (від ДР 4.2.1) та вносять 6 мл твіну-80. Далі необхідно увімкнути мішалку спочатку 40 об/хв, а потім збільшуючи до 100 об/хв, періодично її виключаючи. Потім в інокулятор (ПА-9) подають ПМ (через засівну колбу від ТП 5.4).

Культивування у посівному апараті здійснюється при 37°С, протягом 12 год. Подають стерильне аераційне повітря. Тиск в апараті підтримують на рівні 0,01 МПа. У процесі культивування для стабілізації рН на рівні значення 6,5 використовують 180 мл 25%-го розчину NH_4OH , який закупається в готовому вигляді. До ТП 5.6.

*ТП 5.6. Вирощування *L. acidophilus* в посівному апараті об'ємом 100 л*

У попередньо простерилізований інокулятор (І-16) об'ємом 100 л, в якому вже міститься готова композиція Б (ДР 4.3.2), перекачують за допомогою перестальтичного насосу (Н-14), простерилізоване поживне середовище (від ДР 4.3.1 від (З-13)), додають 56 мл твіну-80. Далі необхідно увімкнути мішалку спочатку 40 об/хв, а потім збільшуючи до 100 об/хв, періодично її виключаючи. Через перестальтичний насос (Н-10) перекачують з посівного апарату (ПА-9) інокулят від ТП 5.5. Подають стерильне аераційне повітря. Культивування здійснюють при тиску 0,01 МПа. У процесі культивування для стабілізації рН на рівні значення 6,5 використовують 1680 мл 25%-го розчину NH_4OH , який закупається в готовому вигляді. До ТП 6.1.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³

У ферментер (Ф-27) об'ємом 1 м³, який пройшов попередню стерилізацію, перекачують за допомогою відцентрового насосу (Н-21) та (Н-25) композицію А (від ДР 4.4.1) та композицію Б (від ДР 4.4.2) відповідно, додають 565 мл твіну-80. Вмикають перемішуючий пристрій (40 об/хв). Через перестальтичний насос (Н-17) перекачують з посівного апарату (І-16) інокулянт від ТП 5.6. Подають стерильне аераційне повітря. Культивування проводять при тиску 0,01 МПа. Протягом процесу біосинтезу періодично, рекомендовано щогодини на 10 хв вмикати мішалку з критерієм 100 об/хв. У процесі культивування для стабілізації рН на рівні значення 6,5 використовують 25%-го розчину NH₄OH, який закуповується в готовому вигляді.

Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації *L. acidophilus* на рівні $2,72 \times 10^9$ КУО/мл (7 г/л біомаси) та стабілізації рівня рН 6,5, що свідчить про закінчення росту та розмноження клітин. Під час культивування відбирають пробу (періодично через кожні 3-4 год) для мікробіологічного контролю на відсутність сторонньої мікробіоти. Після здійснення процесу біосинтезу КР перекачують відцентровим насосом (Н-28) у цех виділення цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Оскільки культивування бактерій *L. acidophilus* з метою одержання біомаси для виробництва сухої бактеріальної закваски здійснюється в асептичних умовах, необхідним етапом є проведення мікробіологічного контролю на усіх етапах промислового виробництва, для того щоб підтвердити відсутність сторонньої мікробіоти. Так, протягом усього часу культивування періодично через кожні 3-4 год відбирають проби КР для різного виду контролю, зокрема поживних середовищ, посівного матеріалу, для контролю показників росту і біосинтезу, що включає визначення концентрації біомаси, контролю рівня джерела азотного та вуглецевого живлення у поживному середовищі.

8.1. Мікробіологічний контроль

Перевірка стерильності ПС

Перевірку на стерильність ПС провдять шляхом розсівання проби простерилізованого ПС на чашки Петрі з відповідним агаризованим ПС, зокрема для виявлення грибів та дріжджів використовують СА, а для виявлення бактерій – МПА. Пробу ПС, яке попередньо підлягає стерилізації, відбирають як правило в об'ємі 50 мл [88].

Підготовка чашок Петрі. У чашки Петрі, які завчасно стерилізують у сухожаровій шафі, розливають по 20-30 мл відповідні агаризовані середовища, що були попередньо розплавлені на водяній бані. Чашки залишають на рівній поверхні, щоб агар рівномірно застиг і витримують їх протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу [88].

Виконання посівів. Стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл з об'єму проби простерилізованого ПС і наносять відповідний об'єм та рівномірно розподіляють по поверхні використовуваних в ході аналізу ПС, використовуючи стерильний шпатель Дригальського (рис.8.1). Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>			<i>РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Арцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>					81	6725
<i>Консульт.</i>						81 <i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА [88].

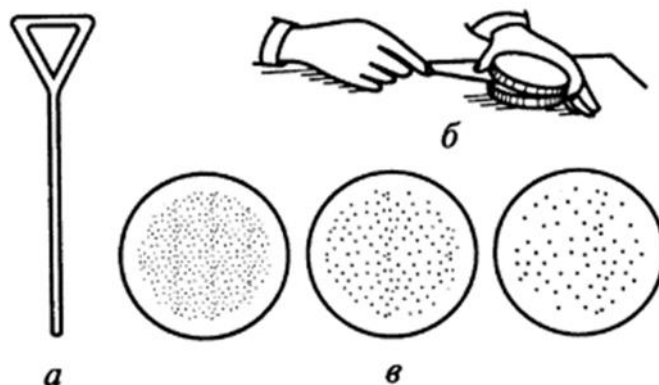


Рис. 8.1. Посів культури мікроорганізмів на поверхню щільного середовища методом виснаженого мазка: а – шпатель Дригальського; б – посів; в – ріст мікроорганізмів після посіву [88]

Перевірка посівного матеріалу і культуральної рідини

Мікробіологічний контроль здійснюють двома шляхами - висівом на агаризовані поживні середовища та мікроскопіюванням.

Для визначення мікробіологічної чистоти КР здійснюють розсів петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі для виявлення бактерій з МПА, для виявлення дріжджів і грибів із СА або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) [88].

Для ідентифікації *L. acidophilus* переважно використовують BD LBS агар, MPC агар, LMA агар, а також селективний агар для молочнокислих бактерій.

Мікроскопування і аналіз колоній. Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі, який володіє імерсійною системою. Щоб здійснити мікроскопіювання необхідним етапом є приготування препарату, що передбачає нанесення за допомогою стерильної петлі невелику краплину КР на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах. Краплю, у якій наявні мікроорганізми, обережно розподіляють по склу, діаметр мазка становить близько 1 см. Мазок висушують до повного випаровування вологи при кімнатній температурі. Далі на висушений препарат наносять 1–2 краплини імерсійного масла, використовуючи скляну паличку [88].

У разі відсутності у досліджуваному зразку сторонніх мікроорганізмів під час мікроскопіювання можна побачити клітини *L. acidophilus* (рис. 8.2), що являють собою нерухливі палички з заокругленими кінцями, які забарвлюються за Грамом позитивно (рис. 8.3.) - (методику наведено нижче). Діаметр їхніх клітин становить $0,6-0,9 \times 1,5-6$ мкм. Розташовуються поодинокі, попарно або у вигляді коротких ланцюжків. Ці бактерії не утворюють спор та не мають джгутиків [24].

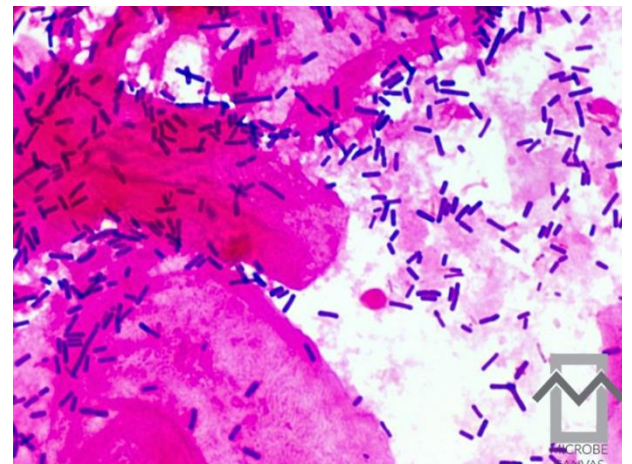
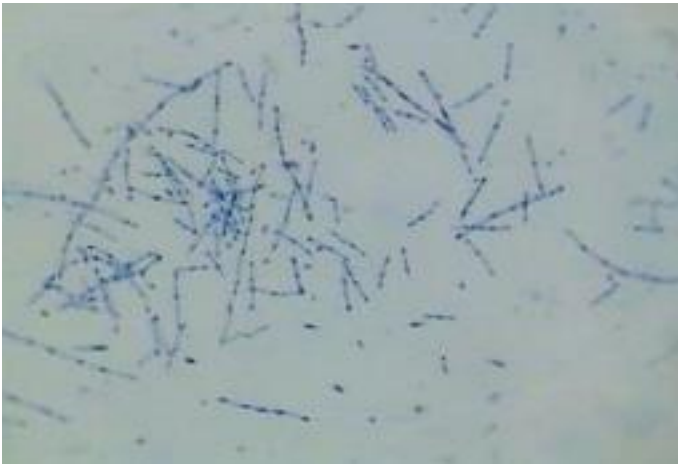


Рис. 8.2. Мікрофотографія *L. acidophilus* (світловий мікроскоп, збільшення 10×100) [89]

Рис. 8.3. Клітини *L. acidophilus*, забарвлені позитивно за Грамом [26]

Фарбування за Грамом здійснюють наступним чином: на предметному склі готують мазок (слід робити тонким, щоб клітини рівномірно розподілилися на поверхні скла і не утворювали скупчень) бактерії *L. acidophilus*. Препарат висушують на повітрі і фіксують у полум'ї спиртівки. Далі здійснюють наступні маніпуляції:

- на мазок кладуть смужку фільтрувального паперу;
- наносять 2–3 краплі розчину генціанвіолету і витримують упродовж 2 хв;
- видаляють фільтрувальний папір;
- не промиваючи препарат водою, наносять 2–3 краплі розчину Люголя і витримують упродовж 1–2 хв до почорніння препарату;
- зливають розчин Люголя;
- знебарвлюють препарат упродовж 30–45 с 96% етанолом, роблячи занурення у стаканчик зі спиртом, або наносячи спирт на мазок;
- ретельно промивають дистильованою водою;
- наносять 2–3 краплі розчину фуксину і витримують упродовж 2 хв;

- зливають барвник, препарат промивають дистильованою водою, висушують на повітрі.

Грамположитивні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір, *грамнегативні* – у червоний або рожевий колір фуксину (колір додаткового барвника) [89].

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Щоб визначити концентрацію біомаси використовують спектрофотометричний метод аналізу, принцип якого полягає у визначенні спектра поглинання або вимірюванні світлопоглинання при заданій довжині хвилі, яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини [90].

Виконання контролю: у пробірку наливають 9 мл стерильної води та вносять 1 мл КР. Суспензію обережно піддають перемішуванню і потім вимірюють оптичну густину (OD) за допомогою спектрофотометра Genesys 10 S (рис. 8.5) при заданій довжині хвилі $\lambda = 600$ нм. Як контроль використовують кювету з стерильною водою. Дослідження проводять в трьох повторях.

Біомасу бактерій розраховують згідно стандартної кривої (калібрувальний графік), в якій одна одиниця OD₆₀₀ дорівнює 0,33 г/л [91].



Рис. 8.5. Спектрофотометр Genesys 10 S [92]

8.2.2. Концентрація цільового продукту

Визначення життєздатності клітин мікроорганізмів

Визначення вмісту життєздатних лактобактерій в одній пробі культуральної рідини, проводять методом послідовних десятикратних розведень, методом Коха.

Приготування розведень (рис. 8.6). Для проведення аналізу в асептичних умовах відбирають 1 мл досліджуваної суспензії стерильною піпеткою та вносять у пробірку, яка містить 9 мл стерильної водопровідної води або фізіологічного розчину, ретельно перемішують. Потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл стерильної водопровідної води. Встановлено, що кількість розведень тим більша, чим більше мікроорганізмів міститься у вихідному зразку [88].

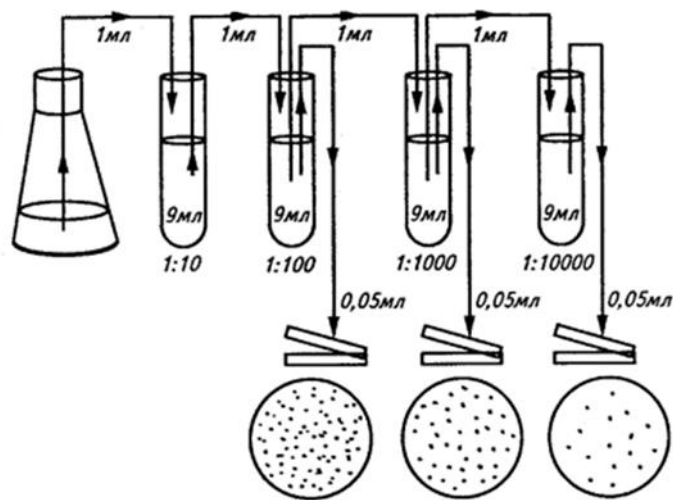


Рис. 8.6. Схема приготування розбавленої суспензії мікроорганізмів і посіву (метод Коха) [88]

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,05–0,1 мл, починаючи з найбільшого розведення, стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню MRS. Суспензію рівномірно розподіляють за допомогою стерильного шпателью Дригальського по поверхні ПС. Культивування здійснюють у термостаті за температури 37 °С протягом 48 год [88].

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела азоту

Джерелом азоту в середовищі для культивування *L. acidophilus* є пептон та дріжджовий екстракт, що мають невизначений хімічний склад, відповідно частина

амінокислот перебуває у вільному стані, частина - у зв'язаному. У цьому випадку дуже важко встановити, які із присутніх у середовищі амінокислот найбільш інтенсивно включаються в метаболізм. Тому у даному випадку доцільним є визначення концентрації амінного азоту, що здійснюють методом формольного титрування з супернатанту. Для того, щоб відібрати супернатантну рідину, культуральну рідину лактобактерій центрифугують зі швидкістю 3000 об/хв протягом 15 хв [93].

Принцип методу базується на здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот, аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином луку [94].

Матеріали та реактиви. 0,04 %-й розчин бромтимолу синього (0,1 г бромтимолу синього розтирають у ступці з 3,2 мл 0,05 н розчину NaOH, переводять у мірну колбу на 250 мл і доводять до позначки дистильованою водою), формольна суміш (50 мл 40 %-го розчину формальдегіду змішують з 2 мл 0,5 %-го розчину фенолфталеїну і титрують 0,2 н розчином NaOH до слабо-рожевого кольору. Формалін з підвищеною кислотністю обробляють крейдою протягом доби. Формольну суміш готують кожні 2-3 дні), 0,05 н розчин NaOH [94].

Умови проведення дослідю. 2 мл досліджуваної витяжки амінокислот змішують з 18 мл води і 5 краплями 0,04%-го розчину бромтимолу синього. Суміш нейтралізують до рН 7,0, додаючи по краплинах 0,05 н розчин HCl, якщо суміш синя, або 0,05 н розчин NaOH, якщо вона жовтого кольору. Після доведення кислотності дослідного розчину до рН 7,0 (забарвлення розчину слабо-зелене) із мірного циліндра додають 2 мл формольної суміші і титрують з мікробюретки 0,05 н розчином NaOH до добре вираженого синьо-фіолетового кольору розчину. Для введення поправки паралельно титрують дистильовану воду (контрольний дослід) [94].

Для того, щоб збільшити надійність визначення колір досліджуваного розчину при рН 7,0 та рН 9,2 порівнюють з еталонними розчинами буферних сумішей вказаних значень рН.

Різниця між кількістю луку, що пішов на титрування досліджуваного та контрольного розчинів, помножена на 0,7, відповідає кількості міліграмів азоту амінокислот у 2 мл дослідної рідини (вважають, що кількість титрованих карбоксильних груп еквівалентна кількості зв'язаних формальдегідом змінних груп) [94].

Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *L. acidophilus* є глюкоза. Її концентрацію визначають в супернатанті, отриманому після відділення біомаси центрифугуванням, методом Бертрана [95].

Принцип методу базується на здатності карбонільних груп цукрів відновлювати в лужному середовищі оксид міді (II) до оксиду міді (I). При розчиненні сульфатом заліза (III) амонію утворюється оксид міді (I), окислюючись до оксиду міді (II), відновлюючи залізо (III) в залізо (II), кількість якого визначають титруванням розчином перманганату калію [95].

Умови проведення досліду. У колбу місткістю 200 – 250 мл вносять піпеткою 20 мл супернатанту КР, додають по 20 мл розчину сульфату міді (Фелінга 1) і сегнетової солі (Фелінга 2). Отриману суміш обережно перемішують, нагрівають і кип'ятять протягом 3 хв з моменту утворення бульбашок, знімають з вогню і чекають доки осад осяде. Рідина над осадом повинна бути яскраво-синього кольору [95].

Гарячу рідину фільтрують через воронку зі скляним фільтром в колбу для відсмоктування, використовуючи насоси різного типу, наприклад як варіант можна застосувати водоструминний або вакуумний насос для відсмоктування рідини, уникаючи перенесення осаду на фільтр. Коли вся рідина буде відфільтрована, колбу з осадом і фільтр необхідно промити декілька разів невеликими порціями гарячої дистильованої води до зникнення лужної реакції промивних вод [95].

Осад оксиду міді (I) повинен бути весь час покритий рідиною, з метою уникнення зіткнення його з повітрям і переходу оксиду міді (I) в оксид міді (II). Після закінчення процесу промивання, фільтр вставляють в чисту колбу для відсмоктування або залишають в тій же колбі, попередньо звільнивши і ретельно сполоснувши її від фільтрату і промивних вод. Відмірюють 20 мл розчину сульфату амонію заліза (III), вносять його в колбу з залишком оксиду міді і в момент його розчинення переносять

на фільтр, від'єднавши водоструминний насос або вакуумний насос. Дають декілька хвилин постояти для розчинення осаду, а потім повільно фільтрують відсмоктуванням [95].

Колбу і фільтр кілька разів промивають водою до зникнення кислої реакції, даючи кожен раз рідині стекти з фільтра. Отриманий зеленуватий розчин в колбі для відсмоктування далі титрують розчином перманганату калію до появи слабо-рожевого забарвлення, що зберігається протягом 1 хв [95].

Витрачений на титрування кількість перманганату калію (мл) множать на його титр (Т / С_т) і за таблицею визначають кількість глюкози [95].

8.3. Показники якості готового продукту

8.3.1. Методи ідентифікації цільової речовини

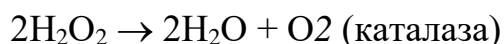
Ідентифікацію *L. acidophilus* здійснюють за фізіолого-біохімічним властивостями даного мікроорганізму, які передбачають проведення таких тестів:

- мікроскопіювання;
- фарбування за Грамом;
- визначення каталазної активності.

Так як основні принципи мікроскопіювання та фарбування за Грамом були детально описані у п. 8.1, то в даному підпункті доцільно розглянути лише принцип визначення каталазної активності.

Визначення каталазної активності

Для визначення каталазної активності на предметне скло наносять краплю 3%-го розчину перекису водню, в ній суспендують досліджувану культуру. Каталаза, що продукується бактеріями, розкладатиме перекис водню на воду і кисень, виділення якого спостерігається у вигляді бульбашок. Якщо бактерії мають каталазну активність, то спостерігається бурхливе газоутворення через 1-5 хв після внесення бактерій, якщо ні - газ не виділяється [96].



L. acidophilus є каталазо-негативною бактерією, отже, утворення газу в пробі з 3%-м розчином перекису водню не повинно спостерігатись. У якості позитивного

контролю використовують каталазо-позитивні бактерії *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* [96].

8.3.2. Методи визначення фізико-хімічних властивостей та/або біологічної активності

Після отримання готової сухої бактеріальної закваски для виробництва ацидофіліну проводять контроль активності закваски, перевіряючи її кислотність і тривалість сквашування, вміст діацетилу та ацетоїну, наявність вуглекислого газу та бактеріофага, а також визначають вміст вологи.

Визначення активності закваски

Активність кислотоутворення сухої бактеріальної закваски визначають згідно з ГОСТ 3624 титрометричним методом при вирощуванні *L. acidophilus*, що містяться у флаконі на середовищі MRS [97].

Рекомендовано аналіз здійснювати на двох зразках препарату. До біомаси, яка міститься у ліофілізованому вигляді у флаконі, додають середовище MRS із розрахунку 1 см³ на одну дозу препарату.

Із двох розчинених зразків досліджуваного препарату переносять по 2,5 мл мікробної зависі в пробірки з 25 мл середовища MRS і витримують протягом (72±1) год при температурі (38±1) °С, після чого проводять визначення кислотності у кожній пробірці.

Одержану суспензію кількістю 10 мл вносять у хімічну склянку об'ємом 50 мл і титрують 0,1 М розчином гідроксиду натрію до рН (8,5±0,5). Показник рН визначають потенціометричним методом.

Визначення кислотності у градусах Тернера базується на формулі:

$$^{\circ}\text{T} = \text{VK} \cdot 10, \text{ де}$$

V- об'єм 0,1 М гідроксиду натрію, використаний на титрування, мл;

K-коефіцієнт поправки до титру 0,1 М розчину гідроксиду натрію.

Середнє значення активності кислотоутворення, отримане для двох зразків, повинно становити не нижче, ніж 90 °Т.

Якщо в одному із досліджуваних зразків показник кислотності становить нижче, ніж 90 °Т, то дослід необхідно повторити ще раз. Якщо у випадку проведення

повторного дослідження результат не задовольняє вказані вимоги, то серію бракують [97].

Тривалість сквашування при внесенні материнської закваски лактобактерій (0,5–1 %) складає 4–6 годин [98].

Якщо відбувається збільшення часу сквашування молока та утворюється слабкий згусток, то це свідчить про зниження якості заквасок. Крім цього під час пробного сквашування обов'язково звертають увагу на якість згустку, що утворився та визначають органолептичні показники, зокрема загальний вид, смак, запах та аромат [98].

Втрата в масі при висушуванні

Втрати в масі під час сушіння становлять не більше ніж 3,5 %. Визначення проводять згідно з ДФУ, вид. 1, р. 2.2.32, с. 49.

0,1 г сухої розтертої біомаси з флакона сушать в вакуум-сушильній шафі при температурі від 58 до 62 °С і при тиску від 1,5 кПа до 2,5 кПа до постійної маси [99].

Вмісту діацетилу та ацетоїну

Визначення проводять по креатиновій пробі, зокрема на білу порцелянову пластинку наносять у рівних об'ємах (по 1–3 краплі) фільтрат закваски, 40%-й розчин КОН і 0,04%-й розчин креатину і ретельно перемішують [100].

Відзначають час появи рожевого забарвлення. Якщо рожевий колір з'явився менше, ніж за 7 хв, то закваска вважається гарним продуцентом діацетилу та ацетоїну. Якщо ж поява кольору відзначається після 7–10 хв, це вказує на слабку ароматоутворюючу здатність мікроорганізмів [100].

Наявність вуглекислого газу

Наявність вуглекислого газу в заквасці встановлюють, наливаючи в пробірку діаметром 15 мм закваску об'ємом 20 см³, відзначають її рівень і ставлять на водяну баню з холодною водою. Температуру води доводять до 90°С і, не виймаючи пробірки, відзначають рівень [100].

Якщо закваска містить вуглекислий газ, то згусток стає губчастим і піднімається над сироваткою від 0,6 до 5 см і більше. При відсутності вуглекислого

газу, згусток не піднімається або піднімається незначно на 0,3 – 0,5 см та немає явно вираженої губчастості [100].

Наявність бактеріофагу

Виявити бактеріофаг можливо посівом закваски на стерильне знежирене молоко з додаванням розчину метиленового синього. Для цього необхідно в 10 мл стерильного знежиреного молока додати 0,5 мл розчину метиленового синього та одну краплю закваски, яку ми досліджуємо. Суміш, яка міститься у пробірці ретельно перемішують і витримують при температурі 37°C та далі проводять спостереження за відновленням метиленового синього [100].

Якщо в процесі культивування після знебарвлення метиленового синього через 4–5 годин знову спостерігається посиніння молока, це свідчить про наявність у заквасці бактеріофагу [100].

8.3.3. Мікробіологічні показники якості кінцевого продукту

Перед тим, як закваска потрапить до кінцевого споживача, вона обов'язково повинна бути перевірена виробником на наявність зазначеної кількості життєздатних бактерій та на відсутність сторонньої мікрофлори згідно вимог ГОСТ 34372-2017 «Закваски бактеріальні для виробництва молочних продуктів. Загальні технічні умови» [14].

Визначення кількості життєздатних молочнокислих бактерій

Визначення молочнокислих мікроорганізмів, а саме бактерії *L. acidophilus*, проводять згідно з ГОСТ 33951-2016, спираючись на її морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості, які було детально описано в п. 8.1 [101].

Кількість молочнокислих бактерій *L. acidophilus* повинна бути не менше, ніж $1 \cdot 10^7$ КУО/г [11].

Визначення вмісту БГКП

Виявлення бактерій групи кишкової палички проводять згідно з ДСТУ 7140:2009 [102].

Для визначення БГКП у заквасці використовують середовище Кесслера. Закваску попередньо нейтралізують до рН 7,4 — 7,6, додаючи до 10 см³ закваски 1

см³ 10%-го розчину питної соди. Нейтралізовану таким чином закваску, в об'ємі 3 см³ висівають у 20 см³ середовища Кесслер. Посіви термостатують і через 24 год відзначають пробірки, у яких є газоутворення. Остаточний облік проводять через 48 годин. Позитивними вважаються пробірки, у яких через 48 год спостерігається інтенсивний ріст мікроорганізмів, що виявляється в сильному помутнінні середовища, утворенні будь-якої кількості газу і підкисленні середовища.

Для того, щоб підтвердити наявність БГКП проводять висів на агаризоване селективно-діагностичне лактозне середовище Ендо. На середовищі Ендо БГКП утворюють блискучі овальної форми колонії червоного або рожевого кольору, часто з металічним блиском. Якщо виникають сумнівні випадки, то роблять фіксовані препарати з вирослих колоній і забарвлюють їх за Грамом, мікроскопіюють. БГКП – грамнегативні. БГКП повинні бути відсутні в 0,1 г [102].

Визначення наявності дріжджів і пліснявих грибів

Визначення дріжджів і пліснявих грибів проводять згідно з ГОСТ 10444.12-88 [103].

Готують з наважки (не менше 10 г (см³)) ацидофіліну ряд послідовних розведень. По 1 см³ відповідного розведення ацидофіліну висівають паралельно в дві чашки Петрі. Потім у кожен чашку Петрі додають не пізніше, ніж через 15 хв 14 – 15 см³ розплавленого й охолодженого до 45 °С агаризованого середовища (сусло-агар з антибіотиком чи середовище Сабуро з антибіотиком). Посіви в чашках Петрі ретельно перемішують обертальним рухом і залишають на столі в горизонтальному положенні для застигання. Термостатування проводять при температурі 24 °С впродовж 5 днів [103].

Після проходження 3 днів здійснюють попередній облік типових колоній, а через 5 днів – остаточний. Через 5 днів переглядають посіви і відбирають чашки, на яких виросло від 5 до 50 ізольованих колоній пліснявих грибів або від 15 до 150 дріжджів [103].

Результати оцінюють для кожної проби окремо. Уточнюють кількість пліснявих грибів, що виросли на чашках в кількості від 5 до 50 колоній, і (або) дріжджів – від 15 до 150 колоній – і перераховують на 1 г (см³) ацидофіліну. Для цього

знаходять середнє арифметичне число колоній цвілевих грибів і (або) дріжджів, округлюють відповідно до методу загального підрахунку мікроорганізмів. Кількість плісневих грибів та дріжджів – не більше не більше 5 КУО/г [14].

Визначення *Staphylococcus aureus*

Виявлення *Staphylococcus aureus* проводять згідно з ГОСТ 30347-97 [104].

Готують з наважки (не менше 10 г (см³)) ряд послідовних розведень. По 1 см³ відповідного розведення ацидофіліну висівають паралельно в три пробірки, що містять по 9 см³ середовища виділення (сольовий чи цукровий бульйон). Посіви інкубують при 37 °С впродовж 48 год [104].

Через 24 год переглядають посіви і відзначають пробірки, у яких є ріст мікроорганізмів (помутніння середовища, зміна кольору середовища, поява осаду, плівки). З кожної пробірки, у якій виявлено ріст мікроорганізмів, роблять пересів на підтвердуюче середовище, наприклад можна використати молочно-сольовий агар чи жовтково-сольовий агар. Одну чашку використовують для висіву одночасно з трьох пробірок, розділивши дно чашки на сектори. Посіви на поверхню середовищ роблять штрихами, щоб одержати ріст ізольованих колоній. Посіви інкубують при 37 °С впродовж 24 – 48 год [104].

Через 24 год попередньо і через 48 год остаточно проводять вивчення характерних колоній *Staphylococcus aureus*:

- на середовищі молочно-сольовому агарі — великі, плоскі, блискучі, оточені райдужною зоною;
- на жовтковому агарі – непрозорі, пофарбовані від білого до жовтогарячого кольору, 2 – 4 мм у діаметрі [104].

Потім роблять фіксований препарат, забарвлюють за Грамом і мікроскопують. Стафілококи забарвлюються за Грамом позитивно, мають кулясту форму і розташовуються скупченнями. Не допускається наявність бактерій *Staphylococcus aureus* в 1,0 см³ ацидофіліну [14].

Визначення бактерій роду *Salmonella*

Виявлення бактерій роду *Salmonella* проводять згідно з ГОСТ 31659-2012 [105].

Наважку ацидофіліну не менше, ніж 2 г, або відповідного розведення не менше 25 см³ висівають в пептонно-буферну воду в співвідношенні 1:5. Посіви інкубують при (37±1) °С впродовж 16-24 год. Потім 10 см³ культури із пептонно-буферної води пересівають в 90 см³ одного з накопичувальних середовищ (Мюллера, Кауфмана, селенітову, селеніт-цистинову, магнеєву). Посіви інкубують при (37±1) °С впродовж 24-48 годин [105].

Через 24 і 48 год з другого накопичувального середовища пересівають штрихом на дві чашки Петрі з вісмут-сульфітним агаром Плоскирева. Посіви інкубують при (37±1) °С впродовж 24-48 год. Бактерії роду *Salmonella* на середовищі Плоскирева мають вигляд безбарвних з відтінком (зеленим, блакитним, рожевим) злегка мутних, чорних, коричневих колоній, після зняття яких на середовищі залишається чорний слід [105].

При відсутності підозрілих колоній на диференційному середовищі роботу з посівами припиняють. Якщо виявляють характерні колонії, то потім пересівають їх на середовище Ресселя з лактозою і глюкозою. Інкубують при (37±1) °С впродовж 24 год. Якщо спостерігається слабе зброджування лактози з одночасним зброджуванням глюкози з утворенням газу, або культури виявляють здатність до ферментації лактози або сечовини, то роблять висновок про відсутність бактерій роду *Salmonella* у досліджуваному зразку ацидофіліну. Якщо у пробірках з посівами середовище з лактозою залишається незмінним, то це свідчить про наявність бактерій роду *Salmonella* у досліджуваному зразку [105].

Для того, щоб ідентифікувати бактерії роду *Salmonella* з колоній роблять препарати, фарбують за Грамом і тоді за відповідними показниками визначають, які саме це бактерії - брюшнотифозні, паратифозні чи дизентерійні. Результати оцінюють для кожної проби окремо. Не допускається наявність патогенних мікроорганізмів, в тому числі бактерій роду *Salmonella* в 10 см³ [14].

8.4. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 2.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрозабірник Висота забору повітря	-	При купівлі та при встановленні	H = 10 м
Кт 2.2 <i>Очищення від грубих домішок</i>	Очищене повітря Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %
Кт 2.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Температура, тиск	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35 МПа, t = 120-250°C
Кт 2.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охоложене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-30 °C, W = 60-70 %
Кт 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50 °C, W = 50%
Кт 2.6 <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95 %
Кт, Км 2.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999 %, КУО - 0
Кх 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 <i>Приготування 6%-го р-ну соляної кислоти</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6 %
Кт, Км 4.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для</i>	Композиція А , температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний	t = 112 °C, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв,

вирощування інокуляту у колбах в термостаті Приготування і стерилізація композиції А			контроль після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 10 л Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 100 л	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Приготування і стерилізація композиції А				
Кт, Км, Кх 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, тиск, рН, стерильність	Манометр, годинник, рН - метр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск і рН визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, рН 4,0-4,5 відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту у ферментері об'ємом 1 м ³ Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Температура, час, тиск, рН, стерильність	Манометр, годинник, рН - метр, мікробіологічний контроль	Тривалість, тиск і рН визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, рН 4,0-4,5 відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримування колекційної культури	Колекційна культура <i>Lactobacillus acidophilus</i> Температура, час, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці	t = 4 °С, τ = 3-4 місяці, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури	Робоча культура <i>Lactobacillus acidophilus</i> Температура, тривалість вирошування, мікробіологічна чистота культури	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирошування, мікробіологічний контроль проводять кожні 5-6 годин	t = 37 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирошування посівного матеріалу у пробірках	Робоча культура <i>Lactobacillus acidophilus</i> Температура, тривалість	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирошування, мікробіологічний	t = 37 °С, τ = 12 год, відсутність

	вирощування, мікробіологічна чистота культури		контроль проводять кожні 5-6 годин	сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4. <i>Вирощування посівного матеріалу у колбах в термостаті</i>	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, технічний мікробіологічний контроль	Температура підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	t = 37 °С, τ = 12 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.5, 5.6 <i>Вирощування L. acidophilus в посівному апараті об'ємом 10 л та 100 л</i>	Посівний матеріал Температура, час, рН, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота, морфологічна відповідність організмів	Термометр технічний, годинник, манометр, технічний тахометр, мікробіологічний контроль, мікроскоп	Температура і швидкість обертання на початку культивування – 40 об/хв і поступово збільшуючи до 100 об/хв, рівень рН контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	t = 37 °С, τ = 12 год, w = 40-100 об/хв, рН = 6,5 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 м³</i>	Культуральна рідина Температура, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень рН, тиск, мікробіологічна чистота культури, рівень біомаси	Термометр технічний, годинник технічний, тахометр, датчик рН, манометр, мікроскоп, спектрофотометр	Температура, швидкість обертання мішалки на початку культивування – 40 об/хв і збільшуючи до 100 об/хв, рівень рН, тиск контролюється весь час, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	t = 37 °С, τ = 12 год, w=40-100 об/хв, рН = 6,5, P=0,01-0,3 МПа, C ₆ = 7 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи у виробництві сухої бактеріальної закваски, складаються із відпрацьованих мийно-дезінфікуючих засобів та КР, з якої попередньо відокремлюють біомасу, і конденсованою водою з ліофільної сушки.

Оскільки мийно-дезінфікуючі засоби, які використовують у процесі виробництва, мають у своєму складі складні та досить токсичні речовини, для знешкодження таких відходів доцільно використовувати окситенки (рис. 10.1).

У окситенках замість повітря застосовується технічний кисень, завдяки чому створюються умови для підвищення дози мулу і його активності, знижуються приріст мулу та енерговитрати на аерацію, збільшується окиснювальна потужність і знижуються експлуатаційні витрати очисних споруд [106].

Стічна вода по трубі потрапляє в зону аерації. Під впливом надмірного напору, який забезпечується турбоаератором, мулова суміш через вікна поступає в муловідокремлювач, де відбувається рух рідини по колу. При цьому інтенсивно відділяється та ущільнюється мул. Очищена вода проходить крізь шаровий прошарок зваженого активного мулу, доочищується від забруднень різного типу, поступає в збірний лоток і відводиться по трубці. Зворотний активний мул через вікна потрапляє в камеру аерації, опускаючись по спіралі вниз.

Окситенк оснащений автоматичною системою, яка забезпечує подачу кисню в зону аерації з розрахунку до швидкості його споживання. Система здатна підтримувати задану концентрацію розчиненого кисню в муловій суміші окситенку при будь-яких змінах складу, концентрації або витрати стічної води [107].

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>			<i>РОЗДІЛ 9 Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Арцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>					99	6725
<i>Консульт.</i>						99		
<i>Н. Контр.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

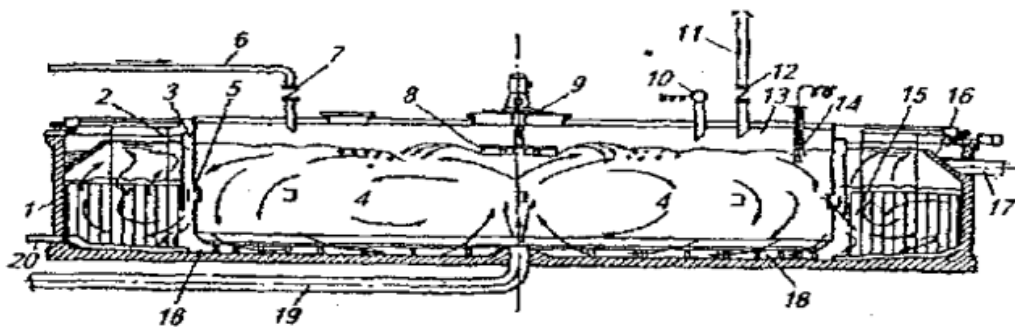


Рис. 10.1. Окситенк: 1- циліндричний корпус; 2- циліндрична перегородка; 3 – щит; 4 – реактор; 5 – тангенціальні насадки; 6 – трубопровід кисню; 7, 12 – клапани; 8 – турбінний аератор; 9 – гідравлічний затвор; 10 – датчик тиску; 11 – вихлопний патрубок; 13 – газова камера; 14 – датчик концентрації розчиненого кисню; 15 – ілоскреби; 16 – водовідвідний лоток; 17 – водовідвідний патрубок; 18 – донні отвори; 19 – труба стічної води; 20 – іловідвідний патрубок

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

На етапі одержання ПМ, виробничого біосинтезу і сушіння біомаси є місце утворенню газоподібних відходів.

Для знешкодження газоподібних викидів пропоную використовувати крапельний біофільтр (рис. 10.2), оскільки він дає змогу очищати забруднене повітря, використовуючи для цього процесу мікроорганізми, які в свою чергу осідають на поверхні підкладки, через яку проходить повітря. Біологічні агенти перетворюють забруднюючі речовини на CO_2 і воду, а очищене повітря потрапляє в атмосферу або завдяки системі циркуляції може повторно доочищуватися в даній установці. Також можливим варіантом є повернення очищеного повітря в біотехнологічний процес [108].

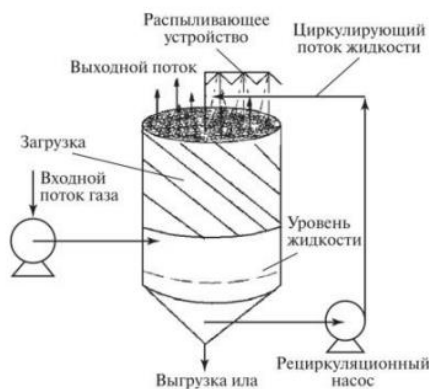


Рис. 10.2. Схема очистки повітря в крапельному біофільтрі

9.3. Системи знешкодження твердих відходів

На етапі санітарної підготовки виробництва і підготовки ПС в якості твердих відходів є пакувальна тара, у якій містилися мийні та дезінфікуючі засоби. Тару для мийних засобів як правило виготовляють із поліетилену високої щільності, яку варто далі піддати вторинній переробці. Компоненти ПС на виробництво постачають в упаковці з поліпропілену, який також підлягає вторинній переробці.

Таким чином, для здійснення правильної з екологічної точки зору утилізації твердих відходів спочатку необхідно тару відсортувати, а потім відправити до пунктів прийому вторинної сировини. Оскільки на сьогоднішній день все більш інтенсивно впроваджуються постулати збереження навколишнього середовища, то доцільно користуватися національною мапою пунктів прийому вторинної сировини, яка допоможе раціонально вирішити дане питання [109].

РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

Перелік нормативно-технічної документації та науково-технічної літератури, яку можна використовувати під час проектування виробництва сухої бактеріальної закваски та у технологічному процесі:

1. ДСТУ ISO 9001:2015 Системи управління якістю. Вимоги. – К. ДП «УкрНДНЦ», 2016.
2. ДСТУ 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосування. – К. ДП «УкрНДНЦ», 2016.
3. ДСТУ 50001:2020 Системи енергетичного менеджменту. Вимоги та настанова щодо використання. - К. ДП «УкрНДНЦ», 2020.
4. ДСТУ 45001:2019 Системи управління охороною здоров'я та безпекою праці. Вимоги та настанови щодо застосування. - К. ДП «УкрНДНЦ», 2019.
5. ДСТУ Б А.2.4-22:2008 Технологія виробництва. Основні вимоги до робочих креслень. – К. Мінрегіонбуд України, 2009.
6. ГОСТ 34372-2017 «Закваски бактеріальні для виробництва молочних продуктів. Загальні технічні умови»
7. ДСТУ 4540:2006 Напої ацидофільні. Технічні умови.
8. ГОСТ 33951-2016. Молоко і молочна продукція. Методи визначення молочнокислих мікроорганізмів.
9. ГОСТ 10444.12-88 Харчові продукти. Методи виявлення дріжджів та плісневих грибів.
10. ГОСТ 30347-97. Молоко і молочні продукти. Методи виявлення *Staphylococcus aureus*.
11. ГОСТ 31659-2012. Харчові продукти. Метод виявлення бактерій роду *Salmonella*.
12. ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості.

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		<i>Синявська Д.А.</i>			Літ.	Арк.	Акрцвів
Перевір.		<i>Грегірчак Н.М.</i>				102	6725
Консульт.					102 <i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.							
Затверд.		<i>Стадніков В.П.</i>					

РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва

Інша нормативно-технічна документація

1. ДБН В.1.1-7:2016 Пожежна безпека об'єктів будівництва. Загальні вимоги. – К. Міністерство регіонального розвитку, будівництва та житлово-комунального господарства України, 2017.
2. Постанова Кабінету Міністрів України від 24.01.2001р. № 50 «Про затвердження загальних вимог до здійснення переробки, утилізації, знищення або подальшого використання вилученої з обігу неякісної та небезпечної продукції»

Методичні рекомендації, конспекти лекцій, лабораторні практикуми

3. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.
4. 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.
5. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання Київ НУХТ, 2013. – 143 с.
6. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дідух Н.А., Могилянська Н.О., Власенко О.В. Симбіотичний комплекс для виробництва ацидофільних кисломолочних продуктів з підвищеними функціональними властивостями. *Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій*. 2009. 36(2): 129-133.
2. Воробйов А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дисбактеріози – актуальна проблема медицини. *Вісник РАМН*. 1997. - № 3. – с. 4-7.
3. Машкін М.І. Молочні продукти: вибір та ризику. *Молочна промисловість*. 2007. 3(38): 29-32.
4. Большакова В.Л. Моніторинг інформації щодо використання пробіотичних систем на основі *Lactobacillus acidophilus* у складі харчових продуктів. *Вісник Національного технічного університету «ХПІ»*. Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. 2015. № 39: 93-97.
5. Kepli A. N., Dailin D. J., Malek R. A., Elsayed E. A., Leng O. M., El-Enshasy H. A. Medium optimization using response surface methodology for high cell mass production of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2019, 78: 608-614.
6. Pedram, N., Ataei, S.A. Optimization of a Modified GS Medium for a Probiotic Strain (*L. acidophilus* ATCC - 4356). *Applied Food Biotechnology*. 2014, 1(1): 25-29. doi: 10.22037/afb.v1i1.7128.
7. Todhanakasem T., Puanglamyai N. Use of rice hull hydrolyzate in the cultivation of *Lactobacillus acidophilus*. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*. 2012, 17(5): 778-786.
8. Mis Solvala K., Chouljenkob A., Chotikod A., Sathivel S. Growth kinetics and lactic acid production of *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *L. acidophilus* NRRL B-4495, and *L. reuteri* B-14171 in media containing egg white hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*. 2019, 105: 393–399. doi: 10.1016/j.lwt.2019.01.058

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.12 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Синявська Д.А.</i>			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Арцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Грегірчак Н.М.</i>				10404	6725
<i>Консульт.</i>					104		
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>					

Список використаної літератури

9. Hwang C. F., Lin C. K., Yan S. Y., Chang R. H., Tsen H. Y. Enhancement of biomass production and nutrition utilization by strain *Lactobacillus acidophilus* DGK derived from serial subculturing in an aerobic environment. *African Journal of Biotechnology*. 2015, 14(3): 248-256. doi: 10.5897/AJB2013.12839
10. He Chen, H., Niu, J., Qin, T., Ma, Q., Wang, L., Shu, G. Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. *Acta Sci. Pol Technol. Aliment.*, 2015, 14(3), 227–232. doi: 10.17306/J.AFS.2015.3.24
11. ДСТУ 4540:2006 Напої ацидофільні. Технічні умови. Київ : Держспоживстандарт України, 2007. 15 с.
12. Семко Т.В., Лісова Н.М., Юзва Н.В., Цвігун О.О. Виробництво кисломолочних продуктів – ацидофілін. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Сучасні агротехнології: тенденції та інновації» (Вінниця, 17 –18 листопада, 2015 р.) С. 210-212.
13. Гошкодер С.А. Конспект лекцій спрямований на надання методичної допомоги студентам під час вивчення дисципліни “Науково-практичні основи технології переробки молока і молочних продуктів” для студентів 4 курсу зі спеціальності 6.051701 «Технологія зберігання, консервування та переробка молока» для студентів денної та заочної форми навчання – Суми; СНАУ, 2012. – с. 13-16.
14. ГОСТ 34372-2017 Закваски бактериальные для производства молочной продукции. Общие технические условия. – М.: Стандартинформ, 2018. – 24 с.
15. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://surl.li/hqdep>
16. Ацидофілін — користь і корисні властивості ацидофіліну. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://vidpoviday.com/acidofilin-korist-i-korisni-vlastivosti-acidofilinu>
17. Пробиотик «Наріне» при дисбактеріозі та неспецифічному виразковому коліті. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://surl.li/gwhds>

18. Бактеріальна закваска Наріне VIVO. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.zakvaski.com/production/narine-vivo.html>
19. Інститут продовольчих ресурсів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://iprkyiv.com/index.php/18-pidrozdily/940-derzhavne-doslidne-pidpryyemstvo-ipr-naan>
20. Йогурт з ацидофільною паличкою, закваска. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://life-lyuks.com.ua/kefir-zakvaska/410/>
21. Закваска ВІВО бактеріальна суха Ацидолакт №4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sanitas.ua/product/29090>
22. Liguori R., Soccol C. R., Vandenberghe L. P. D. S., Woiciechowski A. L., Ionata E., Marcolongo L., Faraco V. Selection of the strain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and its application to brewers' spent grain conversion into lactic acid. *BioMed research international*. 2015, 240231: 1-9. doi: 10.1155/2015/240231
23. Buruleanu L. C., Bratu M. G., Manea L., Avram D., Nicolescu C. L. Fermentation of vegetable juices by *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*; Kongo, M., Ed. 2013. P. 173-194. doi: 10.5772/51309
24. Irkitova A.N., Matsyura A.V. Ecological and biological characteristics of *Lactobacillus acidophilus*. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2017, 7(4): 214-230. doi: 10.15421/2017_109.
25. *Lactobacillus acidophilus* під мікроскопом з темним світлим фоном. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cutt.ly/n6oYkue>
26. *Lactobacillus acidophilus* Gram stain. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1250>
27. L. Akimenko, V. Ushkalov, V. Postoenko, R. Maksimtchuk. Standardization of microorganisms *Lactobacillus acidophilus* procedure authentication. *Ветеринарна біотехнологія*. Бюлетень. Випуск №25. 2014. – 18 с
28. Арсенюк А.Ю. Екологічні аспекти існування популяцій пробіотичних штамів бактерій (електронна і модуляційна інтерференційна мікроскопія): Дис. канд. техн. наук. Москва, 2017. – 44 с

29. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и их роль в народном хозяйстве / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 391 с.
30. Хоулт Дж., Криг Н., Смит П., Стейли Дж., Уилльямс С. Определитель бактерий Берджи в 2 томах – М: Мир, 1997. – 746 с
31. Соломон А. М., Берник І. М., Бондар М.М. Значення функціональних кисломолочних напоїв в дієтичному та профілактичному харчуванні. *Збірник наукових праць «Продовольчі ресурси»*. 2021. 16(9): 180-191. doi: 10.31073/foodresources2021-16-17
32. Бондар М. М., Соломон А. М., Новгородська Н. В. Перспективні напрямки кисломолочних ферментованих продуктів з синбіотичними властивостями. *Збірник наукових праць «Продовольчі ресурси»*. 2021. 17(9): 33-45. doi: 10.31073/foodresources2021-17-04
33. Рингач Н.О., Керецман А.О. Хвороби органів травлення: історичні паралелі змін класифікації та епідеміологічної ситуації. *Гастроентерологія. Сем. мед.* 2015, 4 (60): 137-141.
34. Ринок молочної продукції в Україні: краще менше, та краще. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-consulting.ua/ua/pressroom/rynok-molochnoj-produkcii-v-ukraine-luchshe-menshe-da-luchshe>
35. Киргизова О. Імпорт молочних продуктів: чи буде Україна з українським молоком? *Укрінформ*. 2023. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ukrinform.ua/rubric-economy/3213934-import-molocnih-produktiv-ci-bude-ukraina-z-ukrainskim-molokom.html>
36. Асортимент та якість кисломолочної продукції, дослідження ефективності технологічних процесів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://works.doklad.ru/view/hoFNtVJPU2M.html>
37. Бажеріна К.В., Стадніченко В.В., Андаліцька О.В. Розроблення комунікаційної стратегії вітчизняних підприємств на ринку кисломолочних бактеріальних заквасок. *Економічний вісник НТУУ «КПІ»*. 2015. 12: 326-332.
38. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проєкту для здобувачів вищої освіти освіт.

- ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.
- 39.KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/lac00010>
- 40.Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник / – К. :Ліра-К, 2019. – с. 28-63.
- 41.Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. – К. :НУХТ, 2010. – с. 402-416.
- 42.Хоньків М.О., Тетеріна С.М., Даниленко С.Г., Потемська О.І. Використання багатокритеріальної оптимізації поживного середовища для накопичення біомаси молочнокислих бактерій. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. 2020. 26(4): 47-57. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-4-7.
- 43.Конспект лекцій з дисципліни «Загальна біотехнологія» для студентів денної та заочної форм навчання напряму 6.051401 «Біотехнологія»// Філімоненко О.Ю . Дніпродзержинськ , 2016 .
- 44.Nazia Anjum, Shabana Maqsood, Tariq Masud, Asif Ahmad, Asma Sohail & Abdul Momin. *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017. 54 (9), P: 1241-1251.
- 45.Бабич Е.М., Калиниченко С.В., Коротких О.О., Рижкова Т.А., Скляр Н.И., Маслій І.Г., Балак А.К., Шкодовська Н.Ю., Багача М.Б. Вивчення біологічних властивостей пробіотичних штамів *Lactobacillus* spp. при культивуванні їх в аеробних та мікроаерофільних умовах. *Annals of Mechnikov Institute*, № 1. 2014. - с. 33-37.
- 46.Ферментер BLBIO-SJA. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/tZGaBKprgeUc/China-Bioreactors-in-Bioprinting-Bioreactors-1000L-Stainless-Steel-Bioreactor.html>

47. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О.Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.
48. Продукція НВО "Фармакос". [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.farmakos.ua/prod.html>
49. Саніфект, 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://alvimedika.com.ua/uk/holodnaja-sterilizatsija/775-sanifekt-11-flakondoзатор.html>
50. Хлорантоїн®. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://oazistd.all.biz/uk/hlorantoyin-g24691549> Засіб дезінфікуючий
51. Велідез (з ензимами), 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1798480518-velidez-enzimami.html>
52. Владасепт PROFI CHLOR 1 кг (300 таблеток). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rozetka.com.ua/ua/321272497/p321272497/>
53. Бланідас Актив, 5 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://surl.li/gsjpi>
54. Дезінфікуючий засіб для обробки обладнання та приміщень Дезосепт Форте 22 кг. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1173716072-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dlya.html?&primelead=M14xNQ>
55. Барышников Н. А., Беляков Г. В., Таирова А. А., Филиппов А. Н. Фильтрация суспензии через пористую среду с учетом гравитации. *Мембраны и мембранные технологии*. 2016. Т. 6, № 1. С. 92—98.
56. Флотація. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medic.studio/biotehnologii/flotatsiya-70593.html>
57. Черевко О. І., Поперечний А. М. Процеси і апарати харчових виробництв: підручник / О. І. Черевко, А. М. Поперечний. 2-е видання, доп. та випр. Х.: Світ Книг, 2014. 495 с.
58. Doran P. M. Unit Operations. *Bioprocess Engineering Principles*. 2013. P. 445—595.

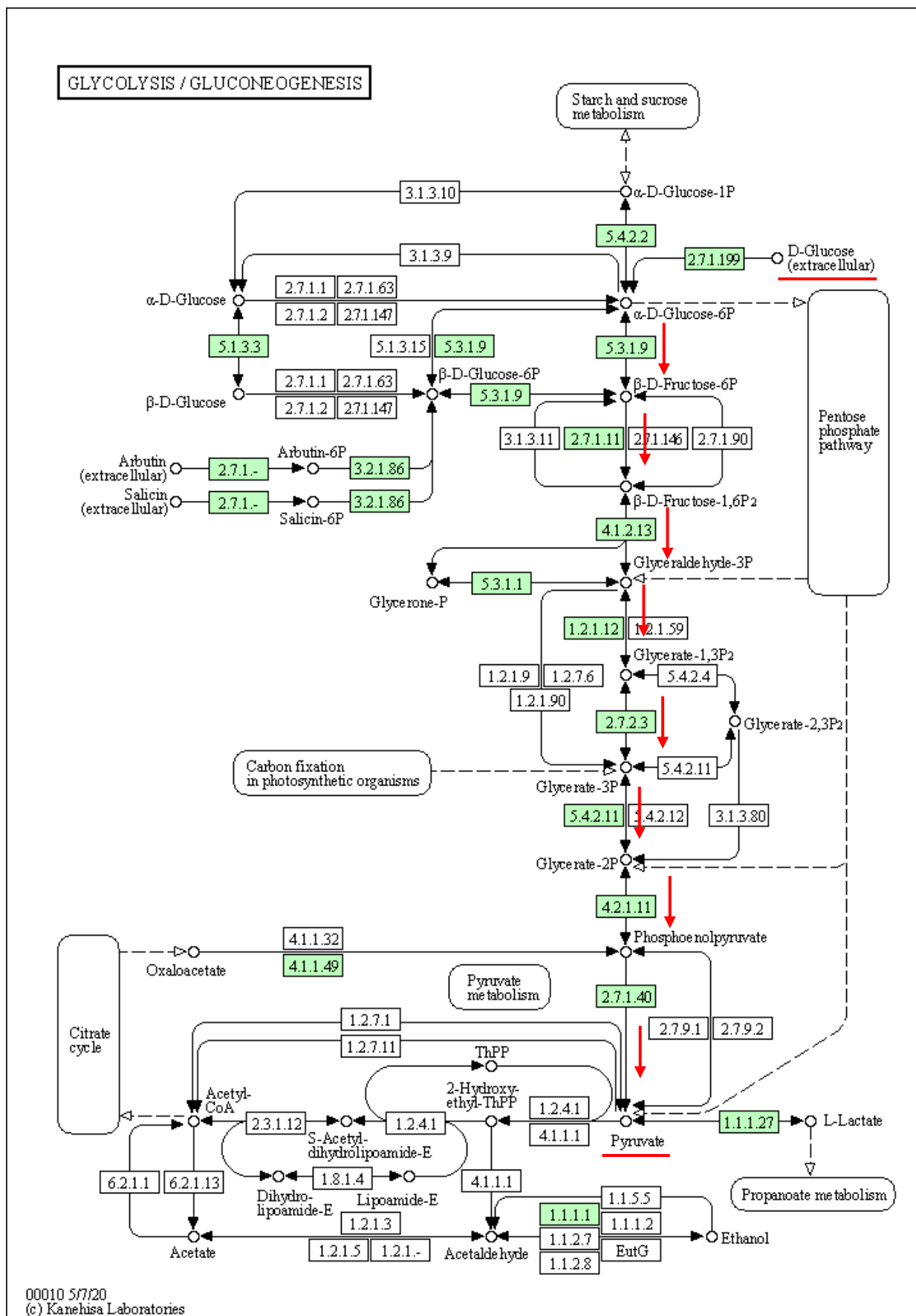
59. Gueimonde M., Sánchez B. Enhancing probiotic stability in industrial processes. *Microb Ecol Health Dis.* 2012. № 23. P. 1—5.
60. Fenster K., Freeburg B., Hollard C., et al. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms.* 2019. Vol. 7, № 3.
61. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. *J of Nutr and Metabol.* 2013. P. 1—15.
62. Golowczyc M. A, Silva J., Abraham A. G., et al. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Lett Appl Microbiol.* 2010. Vol. 50, N. 1. P. 7—12.
63. Savedboworn W., Kerdwan N., Sakorn A., et al. Role of protective agents on the viability of probiotic *Lactobacillus plantarum* during freeze drying and subsequent storage. *Int F research J.* 2017. Vol. 24, N. 2. P. 787—794.
64. Broeckx G., Vandenneuvel D., Claes I. J., et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm.* 2016. Vol. 505, N. 1—2. P. 303—318.
65. Fowler A., Toner M. Cryo-injury and biopreservation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1066. P. 119—135.
66. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
67. Сепаратор-очишувач HAUS MAXCLEAN 40T. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.attis.com.ua/site/equipment/haus_maxclean40t.html
68. Сублимаційна сушарка промислова CryoVit СС-300. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cryovit.com/ru/sublimacionnye-sushilki/model-ss-300/>
69. Повітрязабірник airer deltafan maxi. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://deltafan.com.ua/ru/product/vozduhozabornyk-airer-deltafan-maxi/>
70. Фільтр грубої очистки повітря (панельний). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelniy/>
71. Компресор INTERTOOL PT-0001. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://intertool.ua/catalog/kompressori/kompressori-porshnevie/intertool-pt-0001.html>

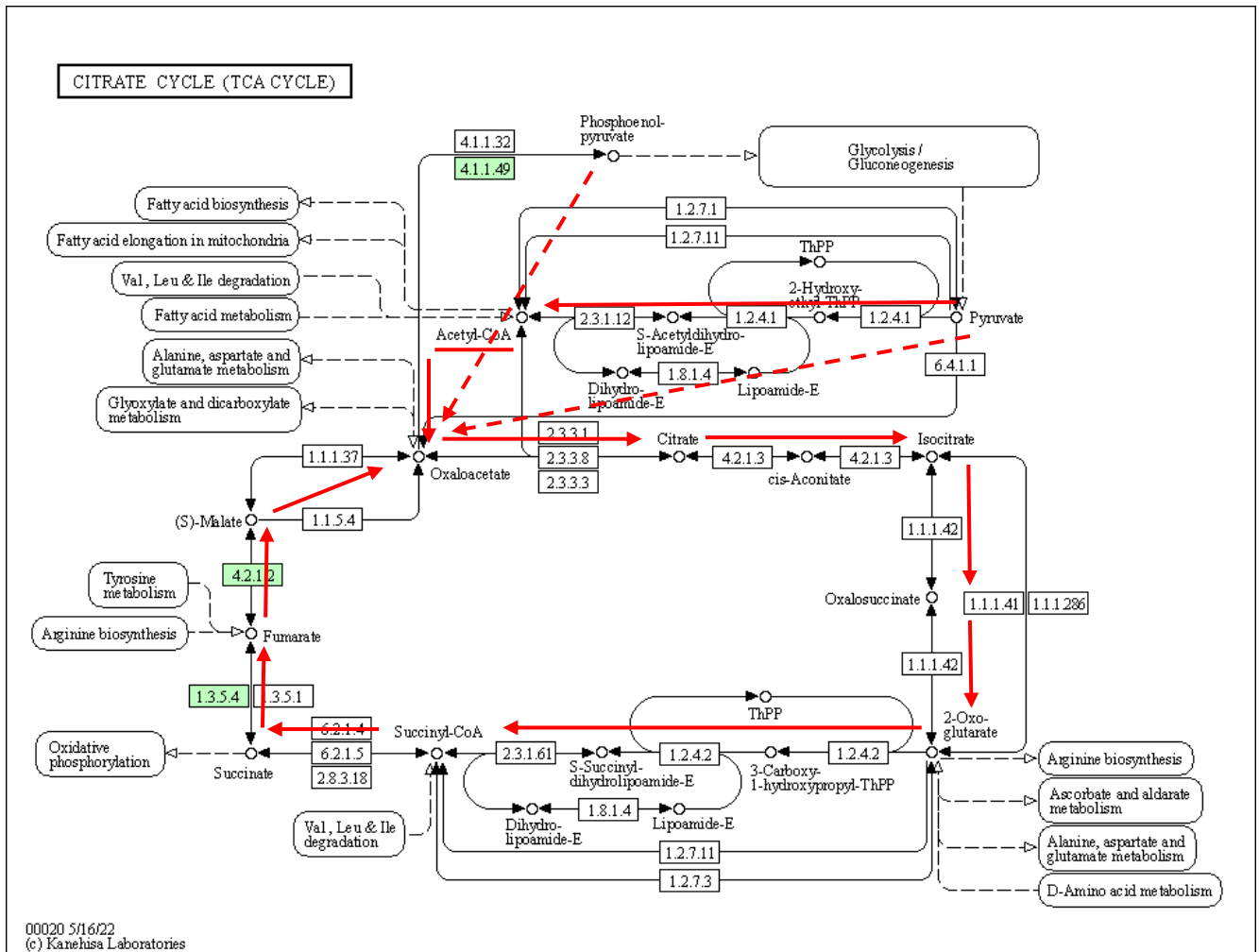
72. Охолоджувач стисненого повітря для компресора OMI. [Електронний ресурс].
Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p90980613-ohladitel-szhatogo-vozduha.html>
73. Ресивер повітряний P300.600. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://xn--80addceesni0axzh6mb.com.ua/ua/products/pnevmo_products/16/531/
74. Зварні теплообмінники HYBRID. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://tapflo.ua/ua/products-2/teploobmenniki#spetsialne-vikonannya>
75. Alter Air Повітряний вугільний фільтр. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://shop.alterair.ua/ru/product/vozdushnyy-ugolnyy-filtr/#scrollDescription>
76. Вентиляційні повітряні фільтри HEPA. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://teko-ua.com/ua/filtryi-nera.html>
77. Біореакторний ферментер з нержавіючої сталі 10л~100 л. [Електронний ресурс].
Режим доступу: <https://labxiangyi.en.made-in-china.com/product/BXnJbOWkCuUI/China-Stainless-Steel-Bioreactor-Fermenter-10L-100L.html>
78. Standard Pump Перистальтичний насос з продуктивністю до 6,25 л/год, Aspen Pumps. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://iq-climat.com.ua/ua/p588128526-standard-pump-peristalticheskij.html>
79. Дозатор ваговий автоматичний F-5000.
[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1409135959-do ziruyuschaya-mashina-dozator.html?&primelead=NC41>
80. Дозатор жидкості, води, молока, пива і других напій по об'єму. Точний порціонний розлив і дозування. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://prom.ua/ua/Rashodomery-zhidkostej>
81. Установка УКП-60. Реактор. Плавитель. Гомогенизатор. Ручное управление клапанами. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://promvit.com.ua/ustanovka-upkp-60-reaktor-plavitel-gomogenizator-ruchnoe-upravlenie-klapanami/>
82. Перистальтичний шланговий насос ВНЗ-V. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v/

- 83.Ваговий дозатор для сипучих 1-50 кг ВД-4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1155858084-vesovoj-dozator-dlya.html>
- 84.Хімічний реактор WHGCM 500 л з нагрівальним кожухом з нержавіючої сталі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/WHGCM-New-100L-500L-600liters-Heating_1600748343077.html?s=p
- 85.Насос перистальтичний PTL25. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tapflo.ua/images/brochures/tapflo_peristaltic_ua_rev1_2018_web.pdf
- 86.Пересувна ємність з підігрівом продукту робочим об'ємом 160 л. СМ-160. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/peredvizhnaya-emkost-s-podogrevom-produkta-rabochim-obemom-160-l-sm-160/>
- 87.Біореактори в Bioprinting Bioreactors 1000L Біореактор з нержавіючої сталі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bailunbio.en.made-in-china.com/product/tZGaBKprgeUc/China-Bioreactors-in-Bioprinting-Bioreactors-1000L-Stainless-Steel-Bioreactor.html>
- 88.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.
- 89.Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.
- 90.Колісник С.В. Спектрофотометрія. *Фармацевтична енциклопедія*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/596/spektrofotometriya>
- 91.Rivaldi J. D., Sousa Silva M. L. C., Duarte L. C., Ferreira A. E., Cordeiro C., de Almeida Felipe M. D. G., et al. Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic

- Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(4): 1735-1743. doi: 10.1007/s00253-012-4621-z
92. Thermo Scientific™ Genesys™ 10S UV-Vis спектрофотометр. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.fishersci.fi/shop/products/genesys-10s-uv-vis-spectrophotometer/p-4532044>
93. Дехтяренко Н.В., Дуган О.М. Особливості приготування і ферментація соєвого молока представниками роду *Lactobacillus*. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2011. № 3. - с. 34-39.
94. Івчук Н.П. Технологія харчових та біологічно активних добавок: метод. вказівки до лаб. занять для студентів за напрямом підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія” спеціальності “Технологія продуктів оздоровчого та профілактичного призначення” ден. форми навчання / Уклад.: Н.П. Івчук, Т.І. Миколів, О.М. Соколова, Т.В. Рудник, В.М. Данилова –К.: НУХТ, 2012. – с. 40.
95. Методические указания по лабораторному контролю качества продукции общественного питания. Р. 1, ч. I. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://docs.cntd.ru/document/1200049293>
96. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: Учебно-методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с.
97. ГОСТ 3624-92. Титриметричні методи визначення кислотності. [Чинний від 1994-01-01]. М: ИПК Видавництво стандартів, 2004. 29с. (Міждержавний стандарт).
98. Грегірчак Н.М, Тетеріна С.М., Нечипор Т.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР. Лабораторний практикум: навч. посіб. – К.: НУХТ, 2018. – 274 с.
99. Державна фармакопея України. Доповнення 1. — Х., 2004.
100. Мікробіологічний контроль якості заквасок. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://1snau.com/mikrobiologichnij-kontrol-yakosti-zakvasok/>

101. ГОСТ 33951-2016. Молоко і молочна продукція. Методи визначення молочнокислих мікроорганізмів. [Чинний від 01.09.2017]. – Москва: Стандартінформ, 12с
102. ДСТУ 7140:2009. Молоко та молочні продукти. Метод підрахування кількості колі форм та кишкової палички (*E. coli*) за допомогою пластин. [Чинний з 2012-01-01]. - Київ : Держспоживстандарт України, 11 с
103. ГОСТ 10444.12-88 Харчові продукти. Методи виявлення дріжджів та плісневих грибів. [Чинний від 01.01.2016]. – Москва: Стандартінформ, 8
104. ГОСТ 30347-97. Молоко і молочні продукти. Методи виявлення *Staphylococcus aureus*. [Чинний від 1998-07-01]. - Київ: Держспоживстандарт України, 1998. 5 с.
105. ГОСТ 31659-2012. Харчові продукти. Метод виявлення бактерій роду *Salmonella*. [Чинний від 2013-07-01]. - Київ: Держспоживстандарт України, 2013. 7 с.
106. Екологічна біотехнологія. Навчальний посібник для студентів спеціальності 7.91607 - Біотехнологія. / Гуляєв В.М., Волошин М.Д. - Дніпропетровськ: 2006. – 126 с
107. Всеукраїнський науково-технологічний журнал «Енергозберігання» №2. 2009.
108. Капельний біофільтр. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mena-water.eu/ru/produkte/bio-tropfkoerper/>
109. Національна мапа пунктів прийому вторсировини. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://recyclingpoints.org/>





OPTIMIZATION OF THE MEDIUM FOR *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* BY PLACKETT-BURMAN AND STEEPEST ASCENT EXPERIMENT*

He Chen¹, Jinfeng Niu¹, Tao Qin², Qi Ma², Lei Wang¹, Guowei Shu^{1,2,✉}

¹College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology
710021 Xi'an, China

²Enzyme Engineering Institute, Shaanxi Academy of Sciences
Xi'an, China

ABSTRACT

Background. *Lactobacillus acidophilus* not only improves the intestinal flora balance but also inhabits the growth of undesirable microorganisms in intestine, which is benefit to the health of humans and animals. Plackett-Burman and steepest ascent experiment are the rapid and concise ways of screening the main effective factors. This study is aimed to select the main influence factors and optimize the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman experiment and steepest ascent experiment.

Material and methods. The ideal carbon source was screened among glucose, maltose, lactose and whey powder, and the ideal nitrogen source was screened among casein hydrolysate, peptone, yeast extract powder, fish meal, carbamide, ammonium sulfate and sodium nitrate by single factor experiment. Plackett-Burman and steepest ascent experiment were applied to screen the main effective factors of *Lactobacillus acidophilus* among peptone, beef extract, yeast extract powder, glucose, K₂HPO₄, C₆H₁₄O₇N₂, CH₃COONa, MgSO₄ and Tween-80.

Result. The results indicated that glucose ($p = 0.01510$) as negative factor and K₂HPO₄ ($p = 0.02017$) as positive effect were the significant growth factors of *Lactobacillus acidophilus*, CH₃COONa ($p = 0.09273$) as positive effect was an important factor, and the optimized medium was as follows: glucose – 21 g/L, K₂HPO₄ – 3.5 g/L, CH₃COONa – 6.5 g/L, peptone – 10 g/L, beef extract – 8 g/L, yeast extract powder – 8 g/L, C₆H₁₄O₇N₂ – 2 g/L, MgSO₄ – 0.2 g/L and Tween-80 – 1 mL/L when the maximum viable count could achieve $2.72 \cdot 10^9$ cfu/mL.

Discussion. The experimental model is reliable and the experimental results are of good stability. Variance analysis is performed to determine the adequacy and significance of the linear model. Thus, Plackett-Burman and steepest ascent experiment improve the veracity of optimization the medium for *Lactobacillus acidophilus* compared with the previous research.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, Plackett-Burman experiment, steepest ascent experiment, optimization

INTRODUCTION

In recent years, with the awareness of the therapeutic effect on human health of consuming probiotic bacteria increasing (Gomes and Malcata, 1999), *Lactobacillus*

acidophilus is a species of probiotic bacteria widely used as health foods and fermented milk (Fung et al., 2008). Dairy starter cultures (Surono and Hosono, 2002) are

*The study was partly supported by the science and technology project of Xi'an city [no. CX12186 (5)] and the key project of Shaanxi Academy of Sciences (no. 2010K-03), China.

✉shuguowei@gmail.com

He Chen, H., Niu, J., Qin, T., Ma, Q., Wang, L., Shu, G. (2015). Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 14(3), 227–232. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.3.24

of industrial importance for fermented foods. As a major component of dairy starters *Lactobacillus acidophilus* has a “Generally Recognized as Safe (GRAS)” status in the USA and a “Qualified Presumption of Safety (QPS)” status in the European Union. Therefore, it is necessary to screen main influence factors of the medium in order to obtain an excellent starter with high viable counts.

The Plackett-Burman statistical method offers a design where variables are studied in $n+1$ experimental runs. This experimental design is an excellent screening method, because the required numbers of experimental runs are very few, leading to saving of time, chemicals, glassware and manpower (Carvalho et al., 1997; Srinivas et al., 1994). Moreover, the design is orthogonal in nature, implying that the effect of each variable worked out is pure in nature and not confounded with interaction among variables.

Response surface methodology (RSM) is a popular statistical method (Neelesh et al., 2014a) which contains a variety of statistical and mathematical techniques. This method is used by modelling and analysing the relationships between several independent variables and response variable(s) (Martins et al., 2013; Neelesh et al., 2014b; Piyushkumar et al., 2007). Thus, it has been widely used.

As far as can be ascertained, the present literature mainly contains the application of Plackett-Burman design and the optimization of fermentation medium (Zhang et al., 2013). The aim of the study was to screen the optimum medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. The optimized medium will improve the number of viable cells in MRS broth and prolong the growth cycle effectively, which provides the technical foundation for further producing probiotic bacteria powder.

MATERIAL AND METHOD

Materials

Glucose as the optimum carbon source was purchased from Tianjin FuChen chemical reagents factory (Tianjin, China). Both peptone and beef extract as the optimum nitrogen source came from BeiJing AoBoxing bio-tech Co. Ltd. K_2HPO_4 selected as the significant growth factor and purchased from Tianjin TianDa chemical reagents factory. CH_3COONa

as an important factor was from Tianjin HongYan chemical reagent factory (Tianjin, China).

Bacterial strains

The probiotic lactic acid bacteria strain, namely *Lactobacillus acidophilus* (Chen et al., 2012) was obtained from College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an.

MRS agar medium was selected as colony counting culture medium, which was purchased from Qingdao Hope Biol-Technology Co. Ltd. (Qingdao, China).

Activation of bacteria and cultural methods. Inoculate *Lactobacillus acidophilus* in MRS broth (Hopebio, Qingdao, China) at 37°C for 24 h. The methods were used the methods of the toluidine blue staining and the microscopic examination to ensure no other harmful bacteria. Activate bacterial strains three successive times in anaerobic condition. MRS broth was sterilized at 115°C for 20 min (pH 6.2–6.4).

Determination of viable bacterial counts and pH evaluation. The activated bacterial strains with 0.9% NaCl were diluted to suitable concentration. 1 mL of the appropriate dilutability into MRS agar medium was taken, and cultured at 37°C for 48 h. The number of colony between 30 and 300 was selected, and then the viable count per milliliter (cfu/mL) was calculated.

The pH of the culture was evaluated by a pH-meter (pHS-3C, Shanghai Precision Scientific Instrument Co., Ltd, Shanghai, China).

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of carbon sources on the growth for *Lactobacillus acidophilus*

The effect of carbon sources on the growth of *Lactobacillus acidophilus* is showed in Figure 1.

From Figure 1, we could find that the effect of different carbon sources on growth of *Lactobacillus acidophilus* had significant difference ($p < 0.05$). Whey powder and glucose were used better for *Lactobacillus acidophilus*, and whey powder had the best effect, less acid production and the number of colonies could rise to $1.8 \cdot 10^9$ cfu/mL.

It could be drawn from the above-mentioned analysis that whey powder was the ideal carbon source for

He Chen, H., Niu, J., Qin, T., Ma, Q., Wang, L., Shu, G. (2015). Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 14(3), 227–232. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.3.24

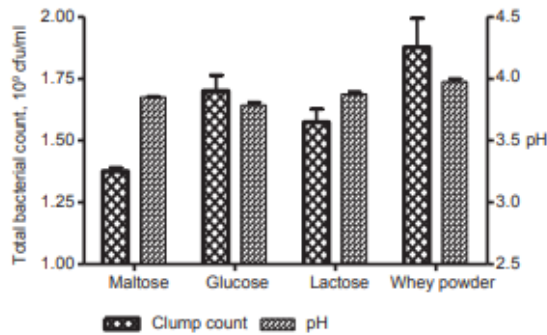


Fig. 1. Effect of carbon source on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

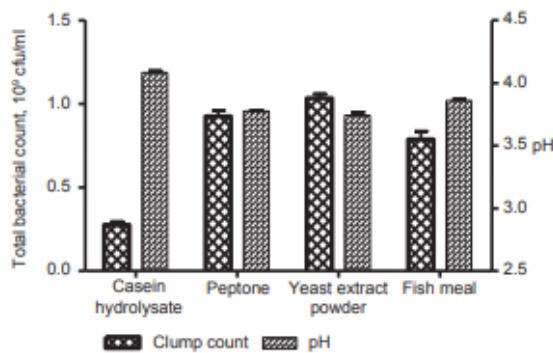


Fig. 2. Effect of organic nitrogen on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

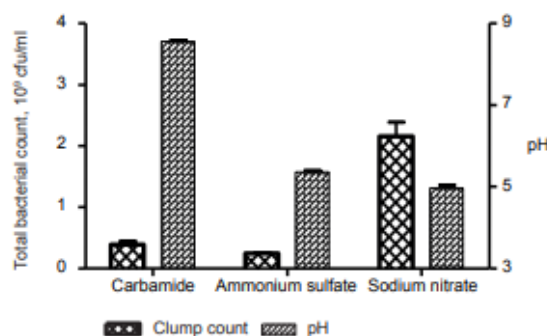


Fig. 3. Effect of inorganic nitrogen on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus, but it easily to produced precipitation and would be inconvenient for subsequent preparation of bacterial powder, so glucose was used as the carbon source instead.

The effect of nitrogen sources on the growth for *Lactobacillus acidophilus*

The effect of nitrogen sources on the growth of *Lactobacillus acidophilus* and the pH value of culture medium were studied. The results are shown in Figure 2 and 3.

Figure 2 and 3 respectively show that the differences of different nitrogen sources were significant ($p < 0.001$) on the growth and acid content metabolized. Organic nitrogen source could promote better growth of *Lactobacillus acidophilus* than inorganic nitrogen source, because it contained protein, free amino acid, peptides, glucide, fat and growth factor. Yeast extract and peptone were ideal nitrogen source of *Lactobacillus acidophilus*, it could be found that complex nitrogen source had better effect than single nitrogen source when compared with the basic medium, and that the colony number of single yeast extract was $1.1 \cdot 10^9$ cfu/mL, while the colony number of the complex nitrogen source in MRS was $1.7 \cdot 10^9$ cfu/mL.

It could be drawn from the above-mentioned analysis that single nitrogen source had not better effect than complex nitrogen source, so the compound of yeast extract and peptone were used as complex nitrogen source.

Screening of significant growth factors of medium for *Lactobacillus acidophilus*

Considering the ideal carbon source, nitrogen source and the culture medium compositions of MRS broth from Figure 3, nine kinds of factors were studied. The factors levels coding is shown in Table 1.

The design and results of tests are shown in Table 2. The response value Y represented viable count in the liquid fermentation, and the unit was 10^9 cfu/mL.

Analysis of variance was shown in Table 3 in which the effect of each factor on the growth of *Lactobacillus acidophilus*: glucose (X_4) > K_2HPO_4 (X_5) > CH_3COONa (X_7) > yeast extract (X_3) = $MgSO_4$ (X_2) > peptone (X_1) > beef extract (X_6) = $C_6H_{14}O_7N_2$ (X_8) = Tween-80 (X_9). The factor whose reliability was more than 95% ($0.01 < p < 0.05$) was defined as a remarkable factor and the factor whose reliability was more

He Chen, H., Niu, J., Qin, T., Ma, Q., Wang, L., Shu, G. (2015). Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 14(3), 227–232. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.3.24

Table 1. Factors levels coding table of Plackett-Burman

Variables	Factors	Lower level g/L	Higher level g/L
X ₁	peptone	10	15
X ₂	beef extract	8	12
X ₃	yeast extract powder	4	6
X ₄	glucose	20	30
X ₅	K ₂ HPO ₄	2	3
X ₆	C ₆ H ₁₄ O ₇ N ₂	2	3
X ₇	CH ₃ COONa	5	7.5
X ₈	MgSO ₄	0.2	0.3
X ₉	Tween-80	1	1.5

Table 2. Experimental design and results of Plackett-Burman

RUN	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	Y, 10 ⁸ cfu/mL
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1.75
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1.66
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1.79
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1.69
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1.74
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1.76
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1.71
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1.74
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1.72
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1.78
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1.74
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.73

Table 3. ANOVA of Plackett-Burman

Source	df	SS	MS	F	p	Significance
X ₁	1	0.000208	0.000208	1.923077	0.29986	
X ₂	1	8.33E-06	8.33E-06	0.076923	0.80755	
X ₃	1	0.000408	0.000408	3.769231	0.19171	
X ₄	1	0.007008	0.007008	64.69231	0.015108	*
X ₅	1	0.005208	0.005208	48.07692	0.020173	*
X ₆	1	8.33E-06	8.33E-06	0.076923	0.80755	
X ₇	1	0.001008	0.001008	9.307692	0.092735	
X ₈	1	0.000408	0.000408	3.769231	0.19171	
X ₉	1	8.33E-06	8.33E-06	0.076923	0.80755	

*** $p < 0.0001$ – highly significant, ** $p < 0.001$ – very significant, * $p < 0.05$ – significant.

than 90% ($0.05 < p < 0.1$) was important factor in general statistics.

It was shown that glucose (X₄) and K₂HPO₄ (X₅) were remarkable factors, and CH₃COONa (X₇) was important factor on growth of *Lactobacillus acidophilus* in Table 3. Similarly, from Figure 4, we could find that the factors of X₄, X₅ and X₇ had greater effect on the growth of *Lactobacillus acidophilus*, it also

indicated positive or negative effects and the influence intensity of each factor on the response values.

We screened two significant factors of glucose (X₄), K₂HPO₄ (X₅) and one important factor of CH₃COONa (X₇) by the Plackett-Burman experiment design and then did further research and analysis. The other factors were determined as: the X₁ to -1 level, X₂ to -1 level, X₃ to 1 level, X₆ to -1 level, X₈ to -1 level and X₉ to

He Chen, H., Niu, J., Qin, T., Ma, Q., Wang, L., Shu, G. (2015). Optimization of the medium for *Lactobacillus acidophilus* by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 14(3), 227–232. DOI: 10.17306/J.AFS.2015.3.24

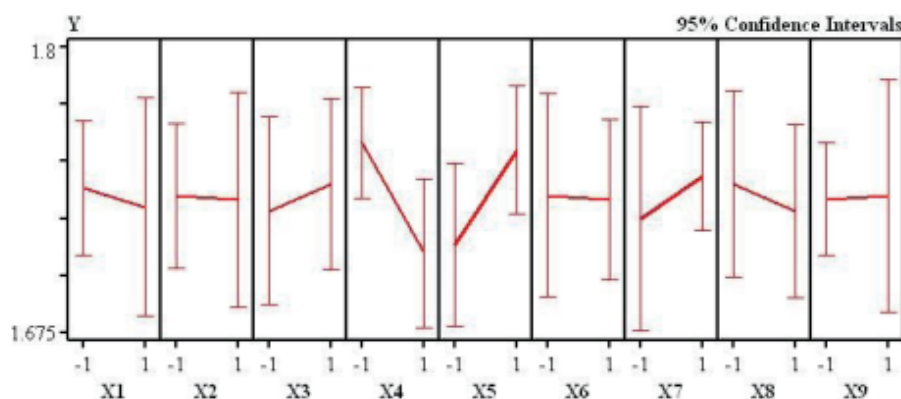


Fig. 4. 95% confidence interval of growth factors

Table 4. Design and results of the path of steepest ascent experiment

Number of steps	X_4	X_5	X_7	Number of colony 10^9 cfu/mL
1	30	2	5	1.67
2	27	2.5	5.5	1.86
3	24	3	6	2.41
4	21	3.5	6.5	2.72
5	18	4	7	1.45

–1 level, namely, peptone 10 g/L, beef extract 8 g/L, yeast extract powder 8 g/L, citric acid hydrogen ammonia 2 g/L, magnesium sulfate 0.2 g/L and Tween-80 1 ml/L according to Figure 4.

The results analysis of steepest ascent experiment

The results were as shown in Table 4 which showed that optimum value area was located in step 4. Glucose (X_4) as the negative effect should be reduced; K_2HPO_4 (X_5) and CH_3COONa (X_7) as positive effect should be increased. According to the effect of three factors, changed direction and a set of experimental runs were designed.

CONCLUSIONS

This study result showed that glucose (X_4) and K_2HPO_4 (X_5) were remarkable factors, and CH_3COONa (X_7)

was important factor on growth of *Lactobacillus acidophilus*. The viable count would increase with the X_5 and X_7 , and decrease with X_4 . Effect of each factor on the growth of *Lactobacillus acidophilus*: glucose (X_4) > K_2HPO_4 (X_5) > CH_3COONa (X_7) > yeast extract (X_3) = $MgSO_4$ (X_8) > peptone (X_1) > beef extract (X_2) = $C_6H_{14}O_7N_2$ (X_6) = Tween-80 (X_9). The optimized medium component was as follows: glucose – 21 g/L, K_2HPO_4 – 3.5 g/L, CH_3COONa – 6.5 g/L, peptone – 10 g/L, beef extract – 8 g/L, yeast extract powder – 8 g/L, $C_6H_{14}O_7N_2$ – 2 g/L, $MgSO_4$ – 0.2 g/L and Tween-80 – 1 mL/L when the maximum viable count could achieve $2.72 \cdot 10^9$ cfu/mL.

REFERENCES

- Ariga, O., Toyofuku, H., Minegishi, I., Hattori, T., Sano, Y., Nagura, M. (1997). Efficient production of recombinant enzymes using PVA encapsulated bacteria. J. Ferm. Bioeng., 84, 553–557.
- Bai, J. L., Mo, S. P., Zheng, W. L. (2007). Lactic acid bacteria enrichment medium nutrition factor optimization industry. J. Food Ferm. Ind., 33(2), 79–81.
- Bukharin, O. V., Sgibnev, A. V. (2013). Effect of metabolites of H_2O_2 -producing lactobacilli on functional activity of lysozyme. Zhur. Mikrob. Epidem. Immunobiol., 4, 60–64.
- Carvalho, C. M. L., Serralheiro, M. L. M., Cabral, J. M. S., Airebarros, M. R. (1997). Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. Enz. Microb. Techn., 27, 117–123.
- Chen, H., Li, C. N., Shu, G. W., Wang, C. F. (2012). Screening of nitrogen sources in the medium for Streptococcus

Lactobacillus acidophilus: Characterization of the Species and Application in Food Production

Nazia Anjum, Shabana Maqsood, Tariq Masud, Asif Ahmad, Asma Sohail & Abdul Momin

Pages 1241-1251 | Accepted author version posted online: 08 Mar 2013, Published online: 05 Feb 2014

Download citation <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.621169>



Full Article

Figures & data

References

Citations

Metrics

Reprints & Permissions

Get access

Abstract

L. acidophilus is a homofermentative, microaerophilic, short chain gram positive microorganism with rod morphology having its bacteriocins belonging to class II a. Several bacteriocins of *L. acidophilus* have been isolated and characterized. These are structurally similar, but their molecular weight varies as well as their spectrum of antimicrobial activity. They exhibit important technical properties, i.e., thermostability and retaining of activity at a wide pH range along with strong inhibitory actions against food spoilage and pathogenic bacteria make them an important class of biopreservatives. *L. acidophilus* can be added as an adjunct in many food fermentation processes contributing to unique taste, flavor, and texture. It also preserves the products by producing lactic acid and bacteriocins. A lot of new information regarding the bacteriocins of *L. acidophilus* has emerged during the last few years. In this review, an attempt has been made to summarize and discuss all the available information regarding the sources of bacteriocins production, their characteristics, and their

Related r

People also read

Lactobacilli Species and

Svetoslav D Food Review Published on

Fermented Functional

V. K. Shiby € Critical Review Published on

УДК 579.864.1:57.042:579.24

**ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *LACTOBACILLUS*
SPP. ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ЇХ В АЕРОБНИХ
ТА МІКРОАЕРОФІЛЬНИХ УМОВАХ**Бабич С. М.¹, Калініченко С.В.¹, Коротких О.О.¹,
Рижкова Т. А.¹, Скляр Н.І.¹, Маслій І.Г.², Балак
А.К.³, Шкодовська Н.Ю.¹, Багача М. Б.¹1 – ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.
І.І. Мечникова Національної академії медичних
наук України»2 – ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини» Національної академії
аграрних наук України3 – Харківський національний медичний
університет

Для корекції дисбіотичних станів найчастіше використовуються пробіотики, до складу яких входять лактобактерії [1-8].

Лактобактерії відносяться до облигатних представників мікрофлори людини, вони більшою чи меншою мірою присутні в усіх відкритих порожнинах організму. Видовий склад лактобактерій дуже різноманітний [9-12]. До теперішнього часу вивчено загальні біологічні властивості тільки окремих видів, що мешкають в організмі людини. Однак, вивчення властивостей вже відомих пробіотичних штамів не можна вважати завершеним [2, 7, 10-13]. Зазначене надає можливість подальшого пошуку й відбору кандидатів, перспективних для розробки пробіотичних препаратів.

Початковим етапом досліджень в зазначеному напрямку є визначення ростових властивостей вихідних штамів. Це обумовлено тим, що більшість комерційних препаратів містять ліофілізовані лактобактерії, які знаходяться в стані анабіозу. Враховуючи те, що кількість життєздатних клітин суттєво впливає на ефективність пробіотику, контроль за їх вмістом має важливе значення.

Наряду із вище приведеним, до початкового обсягу досліджень слід віднести і вивчення колонізаційної характеристики лактобактерій за допомогою здатності їх до адгезії.

Проблема формування популяцій бактерій різних за чутливістю до антибіотиків безпосередньо стосується і лактобактерій. Лактобактерії природно досить стійкі до цілого ряду антибіотичних речовин, що дозволяє використовувати їх в якості профілактичного засобу в процесі антибіотикотерапії. Проте, на цей час безупинно удосконалюються вже існуючі і створюються нові протимікробні препарати. Саме тому, необхідний постійний моніторинг антибіотикорезистентності лактобактерій.

Згідно з даними літератури, різні умови у біологічних нішах людського організму можуть суттєво відрізнитись від створених *in vitro* за багатьма параметрами, у тому числі і за газовим

складом атмосфери інкубації [14]. Хоча більшість штамів лактобактерій являються аеротолерантними, оптимумом для них є мікроаерофільні умови [9]. У доступній нам літературі ми не знайшли даних щодо вивчення біологічних властивостей лактобактерій за різних умов газового складу атмосфери культивування.

Мета роботи: визначення підходів до підвищення пробіотичних властивостей (ростові, колонізаційні) лактобактерій за різних умов культивування та їх вплив на чутливість до антибіотиків.

Матеріали та методи дослідження

Штами *L. acidophilus*, *L. plantarum* було отримано з пробіотичних препаратів «Лактобактерин» виробництва м. Перм (Росія), ЗАТ «Біолік» м. Харків, синбіотичного препарату Flora dophilus FOS.

Визначення життєздатності клітин пробіотичних штамів лактобактерій визначали наступним чином: із кожної серії відповідного пробіотичного засобу досліджували три зразки. Вміст флакону (ампули, капсули) розводили 0,9 % фізіологічним розчином із розрахунку 1 мл розчину на 1 дозу пробіотику (маточна суспензія). З маточної суспензії робили послідовні десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-9} . З кожного розведення робили висіви по 0,1 мл на тверде поживне середовище МРС та засівали по 1,0 мл на рідке середовище МРС (9,0 мл). Усі проби інкубували при 37°C протягом 48 годин.

Кількість мікроорганізмів визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) у кількості посівного матеріалу з урахуванням розведення за формулою:

$$X=10NM$$

де X – число КУО,

10 – постійний коефіцієнт при посіві 0,1 мл суспензії,

N – кількість колоній,

M – розведення (в 10, 100, 1000 рази тощо).

Отримані показники виражали в десяткових логарифмах (\lg КУО/мл).

Вивчення адгезивних властивостей лактобактерій проводили за методикою визначення адгезивного процесу у мікроорганізмів (В. І. Бриліс та ін.) [15].

Чутливість мікроорганізмів до протимікробних препаратів вивчали диско-дифузійним методом Kirby-Bauer з використанням готових комерційних паперових дисків, імпрегнованих антибіотиками (НДЦФ, м. Санкт-Петербург, Росія) на середовищі Мюлер-Хінтона згідно з наказом № 167 МОЗ України Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» від 05.04.07 р. Для постановки дослідів використовували маточні суспензії бактерій, що відповідали 0,5 од. за шкалою McFarland. Інкубацію проводили при температурі 37°C впродовж 24