

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ННІ холоду, кріотехнології та екоенергетики ім. В.С. Мартиновського

Кафедра екології, води та природоохоронних технологій

Ступінь вищої освіти Магістр

Спеціальність 183 «Технології захисту навколишнього середовища»

Освітня програма Технології захисту навколишнього середовища



**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА**

на тему **«Розробка технології переробки жировмісної фази стоків  
рибопереробних підприємств в кормову добавку»**

Здобувач Хомка Ю. І.

2 курсу, ЗТЗ-777 групи

Керівник доцент Мадані М.М.

**Кваліфікаційна робота допускається до захисту**

Рішення кафедри від \_\_\_\_\_ 2024 р., протокол № \_\_\_\_\_

Завідувач кафедри ЕВтаПТ \_\_\_\_\_ Олексій ГАРКОВИЧ

Одеса – 2024 рік

# ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ННІ холоду, кріотехнології, екоенергетики ім. В. С. Мартиновського  
Кафедра екології, води та природоохоронних технологій.  
Ступінь вищої освіти Магістр  
Спеціальність 183 «Технології захисту навколишнього середовища»  
Освітня програма Технології захисту навколишнього середовища

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувач кафедри**

к-т біол. наук, доц.

\_\_\_\_\_ **О.Л. Гаркович**

“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2024 р.

## **ЗАВДАННЯ**

### **НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

\_\_\_\_\_ **Хомки Юрія Ігоровича**

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Розробка технології переробки жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств в кормову добавку».

Затверджена наказом ОНТУ від «28» 03 2024 року, наказ № 139-03

2. Термін здачі здобувачем роботи 01.12.24 р.

3. Вихідні дані роботи розробка технології утилізації жирової фази стоків рибопереробних підприємств в мікробну білкову кормову добавку.

4. Перелік питань, які потрібно розробити: охарактеризувати жировмісні відходи рибопереробки, проаналізувати технології переробки жировмісних відходів рибопереробних підприємств, охарактеризувати мікробні білкові кормові добавки, проаналізувати використання жирових відходів рибопереробки як сировини для отримання біомаси кормового призначення; розглянути матеріали та методи, які будуть використанні в ході дослідження; провести оцінку властивостей бактеріального та грибного ізоляту; розробити біоконверсію жировмісної фази стоків з використанням виділеного штаму гриба *Geotrichum sp.*; розробити технологічну схему біоконверсії жировмісної фази стоків у дріжджову біомасу кормового призначення; охарактеризувати заходи щодо охорони праці в лабораторіях мікробіологічного профілю; розрахувати потрібну кількість первинних засобів пожежегасіння та потрібного запасу води.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Таблиці та схеми, що відображають хід виконання випускної кваліфікаційної роботи.

6. Консультанти по роботі, із зазначенням розділів роботи, що стосуються їх

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Мадані М.М., доцент	28.03	9. 10
2	Мадані М.М., доцент	28.03	18.10
3	Мадані М.М., доцент	28.03	14.11
4	Мадані М.М., доцент	28.03	21.11
5	Мадані М.М., доцент	28.03	29.11

7. Дата видачі завдання 29.03.2024 р.

Керівник \_\_\_\_\_ Марія МАДАНИ  
(підпис)

Завдання прийняла до виконання \_\_\_\_\_ Юрій ХОМКА  
(підпис)

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Огляд технологій переробки жировмісних відходів рибопереробних підприємств	5.10.24	
2.	Матеріали та методи	12.10. 24	
3.	Дослідження властивостей бактеріального ізоляту	14.10.24	
4.	Дослідження властивостей грибного ізоляту	5.11.24	
5.	Біоконверсія жировмісної фази стоків рибопереробки з використанням виділеного штаму гриба <i>Geotrichum sp.</i>	9.11.24	
6.	Технологічна схема біоконверсії жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств у дріжджову біомасу кормового призначення	14.11.24	
7.	Формулювання висновків та рекомендацій	29.11.24	
8.	Оформлення презентаційних матеріалів	6.12.24	

Здобувач-дипломник \_\_\_\_\_ Юрій ХОМКА  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи \_\_\_\_\_ Марія МАДАНИ  
(підпис) (прізвище та ініціали)

*Несу відповідальність за ідентичність електронного та друкованого варіантів кваліфікаційної роботи, даю згоду на обробку персональних даних та не заперечую проти розміщення кваліфікаційної роботи на офіційних web-ресурсах ОНТУ.*

*Підтверджую, що в кваліфікаційній роботі відсутні порушення норм академічної доброчесності.*

Здобувач-дипломник Юрій ХОМКА  
(прізвище та ініціали) (підпис)

## АНОТАЦІЯ

Розрахунково-пояснювальна записка до випускної кваліфікаційної роботи: стор. – 80, рис. – 10, табл. – 12, формули – 13, література – 56.

**Перелік ключових слів:** жирові відходи, рибопереробні підприємства, мікроорганізми, біоконверсія, кормова добавка.

**Тема:** Розробка технології переробки жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств в кормову добавку.

**Об'єкт дослідження:** жирова фаза стоків рибопереробних підприємств.

**Предмет дослідження:** біоконверсії жирової складової відходів рибопереробки у білкову кормову добавку.

**Мета досліджень:** розробити технологічні основи біоконверсії жирової складової стоків рибопереробки у білкову кормову добавку.

Кваліфікаційна робота магістра складається з таких розділів:

**Розділ 1.** Дана характеристика жировмісних відходів рибопереробних підприємств; наведено огляд технологій переробки жировмісних відходів рибопереробних підприємств; охарактеризовано мікробні білкові кормові добавки; розглянуто використання жирових відходів рибопереробки як сировини для отримання біомаси кормового призначення.

**Розділ 2.** Розглянуті методики та умови проведення досліджень. Визначені об'єкти, охарактеризовані методи дослідження.

**Розділ 3.** Досліджено властивості бактеріального та грибного ізоляту. Досліджено умови біоконверсії жировмісної фази стоків рибопереробки з використанням виділеного штаму гриба *Geotrichum sp.* Розроблено технологічну схему біоконверсії жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств у дріжджову біомасу кормового призначення.

**Розділ 4.** Охарактеризовано заходи щодо охорони праці в лабораторіях мікробіологічного профілю.

**Розділ 5.** Розраховано потрібну кількість первинних засобів пожежегасіння та потрібний запас води при виникненні пожежі в лабораторному корпусі.

## ЗМІСТ

<b>Вступ</b>	3
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	5
1.1 Загальна характеристика жировмісних відходів рибопереробних підприємств	5
1.2 Огляд технологій переробки жировмісних відходів рибопереробних підприємств	6
1.2.1 Фізико-хімічна переробка жирних відходів	7
1.2.2 Біологічна переробка жирних відходів	9
1.3 Загальна характеристика мікробних білкових кормових добавок	11
1.4 Використання жирних відходів рибопереробки як сировини для отримання біомаси кормового призначення	14
1.4.1 Загальна характеристика мікробних ліпаз	17
1.4.2 Інтенсифікація споживання субстрату при гетерофазному культивуванні попередньою обробкою поживного середовища	22
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ</b>	27
2.1 Визначення хімічних показників жирової фази стоків рибопереробних підприємств	27
2.2 Визначення мікробіологічних показників жирних відходів та дослідження властивостей автохтонних культур мікроорганізмів	30
2.3 Культури мікроорганізмів та умови їх культивування	30
2.4 Визначення ліполітичної активності мікроорганізмів	33
2.5 Визначення основних показників мікробної біомаси	34
<b>РОЗДІЛ 3 БІОКОНВЕРСІЯ ЖИРОВІСНОЇ ФАЗИ СТОКІВ РИБОПЕРЕРОБНИХ ПІДПРИЄМСТВ В КОРМОВУ ДОБАВКУ</b>	39
3.1 Дослідження властивостей бактеріального ізоляту	41
3.2 Дослідження властивостей грибного ізоляту	43
3.3 Біоконверсія жировмісної фази стоків рибопереробки з використанням виділеного штаму гриба <i>Geotrichum sp.</i>	51
3.4 Технологічна схема біоконверсії жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств у дріжджову біомасу кормового призначення	54
<b>РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ</b>	57
4.1 Правила безпеки роботи в лабораторіях мікробіологічного профілю	57
4.2 Вимоги безпеки при виконанні робіт в мікробіологічних лабораторіях	66
<b>РОЗДІЛ 5 ЦИВІЛЬНИЙ ЗАХИСТ</b>	71
<b>ВИСНОВКИ</b>	74
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	75

## ВСТУП

**Актуальність дослідження.** Основною проблемою сучасних виробництв є їхнє виведення на екологічний рівень шляхом впровадження маловідходних технологій. Істотне збільшення масштабів виробництв рибопереробного комплексу гостро ставить питання переробки відходів, що утворюються при обробці рибної сировини, освітленні стічних вод у жироловці та флотаторі, очищенні колодязів.

Для рибокомбінатів це проблема знищення низки органічних відходів, таких як луска, плавники, кишки тощо. Серед них можна виділити жирову складову, тому що на неї припадає значна частка загальної кількості відходів. Так тверда рибна маса, що збирається у відстійниках, містить не менше 40–45 % жиру-сирцю. Таким чином, в ході роботи рибокомбінату неминуче утворюються великі кількості жирових відходів, а їхня зараженість мікрофлорою призводить до швидкого загнивання з утворенням неприємних запахів. Крім того, високий вміст жирів у стічних водах створює труднощі для ефективного функціонування очисних споруд рибокомбінатів, оскільки сприяє утворенню щільних відкладень на стінках труб та резервуарів.

Необхідно відзначити, що жировмісні відходи рибопереробних підприємств відрізняються багатоконпонентністю складу, який варіює залежно від режиму роботи підприємства, у зв'язку з чим більшість існуючих технологій можна застосовувати лише з рядом обмежень [1].

В даний час накопичено величезний досвід у галузі мікробіологічної переробки відходів різного походження [2, 3]. До відмінних особливостей таких технологій можна віднести здатність мікроорганізмів, що застосовуються, асимілювати широкий спектр органічних сполук, а також їх високу пристосованість до зміни складу використовуваної сировини. Мікробіологічні процеси в порівнянні з традиційними хімічними технологіями протікають у більш м'яких умовах, а мікробна біомаса, що утворюється, може бути використана як цінна кормова добавка для сільськогосподарської птиці і

худоби. Останнє особливо актуально для сучасного українського кормовиробництва, тому що дозволяє більш ефективно використовувати сировинні ресурси та з найменшими витратами досягати максимальної продуктивності тваринництва та птахівництва.

Таким чином, сучасні потреби включають необхідність виробництва білкових кормових добавок та вирішення екологічних питань при переробці відходів рибокомбінатів. У зв'язку з цим переробка жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств в кормову добавку є дуже актуальною.

**Мета** дослідження – розробити технологічні основи біоконверсії жирової складової стоків рибопереробки у білкову кормову добавку.

Для досягнення мети поставлено такі **завдання**:

1. Визначити хімічні та мікробіологічні показники жировмісних відходів рибопереробки.

2. Виділити та охарактеризувати автохтонні мікроорганізми; вибрати мікроорганізми з високою ліполітичною активністю, які здатні асимілювати жири.

3. Вивчити процеси культивування мікроорганізмів-деструкторів на жирових субстратах. Дослідити вплив різних режимів культивування мікроорганізмів та якість мікробної біомаси.

5. Розробити технологічну схему переробки відходів рибокомбінатів.

*Об'єкт дослідження:* жирова фаза стоків рибопереробних підприємств.

*Предмет дослідження:* біоконверсії жирової складової відходів рибопереробки у білкову кормову добавку.

*Методи дослідження:* лабораторні, вимірювально-вагові, розрахунково-порівняльні.

**Практична значимість.** Розроблено технологію біоконверсії жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств у кормову добавку. Реалізація технології дозволить підвищити рентабельність рибопереробних підприємств за рахунок зниження витрат на транспортування та поховання жировмісних відходів рибопереробки.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Загальна характеристика жировмісних відходів рибопереробних підприємств**

Останніми роками стан української рибопереробної промисловості характеризується зростанням обсягів виробництва, розширенням асортименту своєї продукції [4]. Українські виробники продовжують нарощувати обсяги виробництва рибних товарів, що є результатом збільшення попиту на рибну продукцію.

На рибопереробних підприємствах виникає проблема зі знищенням цілого ряду різних органічних відходів, таких як луска, плавники та голови, кишки тощо. Серед них особливо можна виділити жировмісні відходи, які утворюються при переробці рибної сировини, освітленні стічних вод у жироловці та флотаторі, очищенні колодязів [1, 4]. У середньому рибна маса, що збирається у відстійниках, містить 40–45% жиру-сирцю [4], який складається з природних органічних сполук, нерозчинних у воді, що є переважно триацилгліцеридами [1]. Слід зазначити, що жирові відходи рибопереробної промисловості становлять загрозу як з екологічного погляду, а також можуть бути можливим джерелом виникнення інфекційних захворювань різної природи [3]. Це насамперед може бути пов'язане з наявністю великої кількості різних мікроорганізмів, що утворюють аборигенну мікрофлору.

Найбільша кількість жирових відкладень утворюється при очищенні стічних вод, які є розбавленими емульсіями. Щоб досягти необхідного результату, необхідна ефективність очищення стічних вод близько 95 %. До того ж стоки рибопереробних підприємств характеризуються нерівномірністю надходження, зміною концентрації забруднень протягом доби, коливаннями значень рН (6,5– 8,5) [5, 6].

Існуючі технологічні схеми очищення стічних вод передбачають періодичне (1–2 рази на добу) видалення до шламозбірника жирового шламу,

що спливає після проходження жировловлювача. Об'єм шламозбірника розрахований на накопичення відходів протягом 3–5 діб, далі вони захоронюються на полігоні для зберігання твердих побутових відходів [7].

Оскільки природні жири – це змішані тригліцериди, у складі яких містяться різні залишки карбонових кислот, у формуванні жирів, що входять до складу відходів, може брати участь до 400 залишків кислот різної будови [8].

Такий жирнокислотний склад розглядається сучасною наукою про раціональне харчування, як неоптимальний для організму тварин, у зв'язку з чим жири, що містяться у відходах, навіть після ретельного очищення не можуть бути використані безпосередньо в харчових або кормових цілях без попередньої переробки [8, 9].

Найчастіше у жирах рибного походження зустрічаються такі монокарбонові кислоти як масляна, капронова, пальмітинова, стеаринова, олеїнова, ізовалеріанова. Із зазначених кислот у найбільшій кількості зустрічаються олеїнова кислота (понад 30 %), пальмітинова (від 15 до 50 %), а також стеаринова (25 % і більше). Тому дані кислоти відносять до категорії основних жирних кислот, які містяться у жирах.

Таким чином, склад жирових відходів рибопереробних підприємств може бути неоднорідний і дуже складний [8], що є однією з основних проблем, що постають при використанні подібних відходів як сировини.

## **1.2. Огляд технологій переробки жировмісних відходів рибопереробних підприємств**

На сьогодні пропонується низка технологій, що дозволяють утилізувати чи переробити жирові відходи [10-13]. Можна виділити два основних напрямки пропонуваних технологій: фізико-хімічні та біологічні.

### **1.2.1. Фізико-хімічна переробка жирових відходів**

Аналіз літератури показує, що на сьогоднішній день існує широкий спектр технологій, що базуються на фізико-хімічному впливі на жирові відходи. При цьому в деяких із них вдається отримати продукт, який може бути використаний у подальшій господарській діяльності [14]. Способи переробки відходів без створення цінних продуктів представлені різними методами очищення.

З метою підвищення біологічної цінності та розширення областей застосування жирів для виробництва продуктів харчування застосовують фракціонування жирів. В результаті чого відбувається поділ на високоплавку і низькоплавку фракції триацилгліцеридів, що відрізняються за молекулярною масою, ступенем насиченості та температурою плавлення.

Фракціонування розплавленого жиру при повільному охолодженні засноване на кристалізації жиру в умовах контрольованої температури, що забезпечує виділення високоплавкої фракції у вигляді кристалічного осаду, що відокремлюється від рідкої фракції пресуванням, центрифугуванням, вакуум-фільтрацією або декантацією. Однак застосування даного способу дуже обмежене, він потребує великих виробничих площ та тривалого часу [15, 16].

Швидшим є спосіб кристалізації високоплавких компонентів суміші жирів або жирних кислот з летких розчинників з подальшою фільтрацією маси та дистиляцією розчинників. Гліцериди та жирні кислоти поділяються на фракції різного ступеня насиченості та з різною довжиною ланцюга вуглецевих атомів. Таким чином, можливе отримання фракцій, які мають високу біологічну цінність внаслідок підвищеного вмісту ненасичених компонентів та вільних жирних кислот. Однак, необхідність значних капітальних витрат задля впровадження і використання великих обсягів органічних розчинників обмежує можливість практичної реалізації розглянутого способу [17].

Зазначених недоліків позбавлений спосіб фракціонування жирів шляхом диспергування їх у воді або водному розчині емульгуючого агента. При диспергуванні жирів у воді рідка фаза видаляється з поверхні кристалів або

затверділих компонентів та замінюється водою. Дисперсна фаза, що при цьому утворюється, складається з твердих компонентів, а продукти, що залишилися рідкими, складають дисперсійну фазу. Цю суміш можна розділити рядом способів, наприклад, осадженням, фільтруванням або центрифугуванням. Більш легку фракцію, що містить компоненти з низькою температурою плавлення, звільняють від води та піддають звичайній обробці. Водну емульсію руйнують, нагріваючи до температури плавлення твердих компонентів, таким чином одержують фракцію з найвищою температурою плавлення [13, 18].

Фракціонування жирів можливе також методом молекулярної дистиляції при температурі від 150 до 250 °С та зниженому тиску. Однак молекулярна дистиляція не дає великого ефекту при розподілі гліцеридів. Значний ефект можна отримати, вилучивши з жиру вільні жирні кислоти та відокремивши неомильні речовини (стерини та вітаміни).

Найбільш перспективним є комбінування методів переестерифікації та фракціонування. В результаті переестерифікації тригліцеридів із середньою та великою довжиною вуглецевого ланцюга утворюються структуровані жири, що містять залишки ненасичених кислот, які покращують імунні функції організму, знижують небезпеку виникнення пухлин та тромбів, знижують вміст холестерину в крові, покращують баланс азоту [19–21].

Незважаючи на різні дослідження наукових колективів, як в Україні, так і за кордоном, за наявності зазначених технологій фізико-хімічних шляхів переробки жировмісних відходів, поки що не існує прийнятної технології переробки малоцінних жирів, і жодне виробництво досі не налагоджено у промислових масштабах. Тому малоцінні жири знищуються як відходи рибопереробки [8]. Це дозволяє зробити висновок про низьку рентабельність даних технологій, а також незатребуваність пропонованих продуктів.

### 1.2.2. Біологічна переробка жирових відходів

Одним із сучасних напрямків переробки жирових відходів є комбінування фізико-хімічного впливу та біологічного окислення [22]. В рамках однієї з таких технологій пропонується використовувати як проміжний етап біологічне окислення за допомогою біопрепаратів, які включають до свого складу комплекс ферментів, а також живі культури мікроорганізмів. Подібний вплив дозволяє скоротити терміни очищення та також суттєво знизити економічні витрати. Ця технологія передбачає наступне окислення біомаси, що утворюється, перманганатом калію і перекисом водню [23].

Необхідно відзначити, що ряд технологічних схем передбачає очищення стоків від жирових домішок препаратами, що складаються з монокультур, так і суміші мікроорганізмів родів *Mucor*, *Bacillus*, *Pseudomonas* тощо [24, 25].

Істотним недоліком запропонованої технології є відсутність продукту, що становить інтерес для подальшої діяльності людини. Таким чином, даний спосіб дозволяє тільки знизити токсичність техногенних відходів, але не переробити їх.

В основі біодеградації жирових відходів лежить специфічна каталітична активність ферменту гідролітичного циклу – ліпази. Ліпаза є естеразою, що гідролізує ефірні зв'язки між кислотою та спиртом, зокрема для тригліцеридів [9, 26].

В даний час вже визначено підходи до біосинтетичної та ензиматичної переробки тваринних жирів у продукти з підвищеною біологічною активністю. Так, існують технології гідролізу жирів стічних вод харчових виробництв як мікробними ліпазами [8, 26], так і в присутності ліпази підшлункової залози великої рогатої худоби. В результаті ферментативного розщеплення яловичого жиру тваринними ліпазами відбувається вивільнення зі структури жирів всього спектру жирних кислот [26]. Таким чином, можуть бути отримані жировмісні добавки з підвищеною біологічною цінністю для харчових композицій та мікробіологічних середовищ [27, 28].

Необхідно зазначити, що пропонуються технології, що дозволяють здійснювати біологічну деструкцію як в аеробних умовах, так і шляхом анаеробного зброджування.

Одним із біотехнологічних шляхів переробки жировмісних відходів рибопереробних підприємств є зброджування молочнокислими бактеріями. Даний спосіб включає термічну обробку сировини, ферментативний гідроліз, при необхідності пропонується додатково здійснювати фільтрацію [29]. Недоліком цього способу є необхідність здійснення декількох стадій, а також використання ферментного препарату, що значно підвищує собівартість кінцевого продукту.

Також пропонується анаеробне зброджування відходів з метою отримання біогазу та інших газоподібних продуктів [9, 30, 31]. Залишок, що утворюється при такій переробці відходів, може бути використаний як добриво. Його склад залежить від складу вихідної сировини, що завантажується в реактор. У сприятливих для анаеробного зброджування умовах зазвичай розкладається близько 70 % органічних речовин [30, 31, 33].

Головним стримуючим чинником застосування цієї технології на виробничих підприємствах, попри всі плюси, є суттєві капітальні витрати [32].

В даний час пропонується ряд технологічних схем аеробної переробки жирових відходів з використанням дріжджових культур, причому низка дослідників рекомендує помірно-галофільні дріжджі *Yarrowia lipolytica* [34–36].

Аналіз літератури показує, що дріжджі *Y. lipolytica* успішно застосовуються при очищенні жировмісних стоків підприємств, що займаються переробкою різних видів рослинної сировини. Штам *Y. lipolytica* 3589 знижує хімічне споживання кисню (ХСК) стічних вод підприємств з виробництва пальмової олії на 95 % за два дні [35], а штам *Y. lipolytica* ATCC 20255 знижує ХСК стічних вод виробництва оливкової олії на 80 % за 24 години. При цьому накопичення біомаси дріжджів склало 22,45 г/л [36].

Можливості сучасної біотехнології дозволяють знайти альтернативний спосіб використання жировмісної фази стоків рибопереробки, який зачіпає не

лише екологічні аспекти виробництва, а й проблему дефіциту кормового білка. Так в даний час встановлена здатність термофільного штаму *Candida tropicallis* і вищевказаних дріжджів *Y. lipolytica* використовувати жир як вуглецевий субстрат [35]. *Y. lipolytica* рекомендований для очищення стічних вод від жировмісних забруднень у разі використання цільового продукту як кормової добавки.

Вище сказане дозволяє зробити висновок про те, що жировмісні стоки харчових підприємств можуть бути використані як субстрат для культивування мікроорганізмів – продуцентів кормового білка [37]. Аналіз літератури доводить, що дріжджі виду *Y. lipolytica* є однією з культур, використання якої може бути ефективною при проведенні даного процесу.

Однак при реалізації процесу аеробної біодеструкції жирів виникає низка складнощів, наслідком яких є низька ефективність процесу. Відмінною рисою жирів є майже повна нерозчинність у воді, що зумовлює існування у поживному середовищі двох фаз. Проведення таких ферментацій вимагає вирішення низки додаткових проблем, пов'язаних з відмінністю властивостей істинного розчину і дисперсної системи.

### **1.3. Загальна характеристика мікробних білкових кормових добавок**

Одним з найважливіших завдань промислової біотехнології є розробка ефективних технологій отримання мікробного білка. Інтенсифікація сільського господарства та освоєння ресурсів Світового океану залишаються основними напрямками у розвитку харчових та кормових запасів, але шлях цей тривалий і потребує значних капіталовкладень. Корми рослинного походження становлять основу раціонів всіх видів сільськогосподарських тварин та птиці, а незбалансованість раціонів за білком призводить до перевитрати кормів, посилюючи тим самим їх дефіцит.

Одним з перспективних напрямків вирішення проблеми дефіциту білка є мікробний синтез. Мікробіологічна промисловість випускає кормовий білок з

урахуванням різних мікроорганізмів – бактерій, грибів, дріжджів, водоростей [9, 38]. Багата білками біомаса мікроорганізмів із високою ефективністю засвоюється сільськогосподарськими тваринами. Крім того, мікробний білок багатий на лізин – незамінну амінокислоту, що визначає його кормову цінність. Додавання біомаси мікроорганізмів до рослинних кормів, які не збалансовані за вмістом лізину, дозволяє наблизити їх амінокислотний склад до оптимального.

Промислове виробництво збагачених білками мікробних мас має ряд переваг: мікробіологічне виробництво значно менш трудомістке порівняно з отриманням сільськогосподарської продукції; високий ККД перетворення субстрату на продукт; можливе отримання продукту з необхідними властивостями шляхом генетичних маніпуляцій та зміною технологічного режиму; високий вміст білка в отриманій біомасі; можливість всебічного автоматизованого контролю.

В даний час в дослідженнях з пошуку сировини для мікробіологічних виробництв простежуються такі тенденції:

- орієнтація на «чисті» види сировини, бажано індивідуальні сполуки;
- орієнтація використання різних видів відходів [39, 40].

Використання «чистих» видів сировини дозволяє створити великі виробництва білкової біомаси, що стабільно працюють, з отриманням продукту постійної якості. Застосування різного роду відходів: стічних вод різних виробництв, жировмісних відходів харчової промисловості, гною тощо, передбачає, що сировина має практично негативну собівартість. Необхідно відзначити, що використання різних видів відходів у вигляді сировини для отримання мікробного протеїну дозволяє не тільки суттєво знизити собівартість кормової добавки, а й скоротити витрати на утилізацію техногенних відходів промисловості. Також переробка відходів сприяє боротьбі із забрудненням довкілля. Таким чином, обидва напрями мають перспективи розвитку.

При виробництві мікробного білка слід дотримуватися низки вимог:

- мікроорганізми, що використовуються, не повинні викликати алергічних реакцій;

– продуценти не повинні бути патогенними, при оцінюванні штамів дріжджів за цими показниками як стандарт непатогенності використовуються пекарські дріжджі.

Оцінка показників нешкідливості конкретної мікробної біомаси дається на підставі хімічних, санітарно-гігієнічних, ветеринарно-зоотехнологічних та медико-біологічних досліджень. Аналізу піддаються як кормова білкова добавка, так і харчові продукти тваринництва, отримані при її використанні.

У мікробіологічній промисловості використовують різні штами мікроорганізмів, здатні стабільно утворювати цільовий продукт у великій кількості. Такі штами виділяють із природних джерел або отримують відбором та спрямованою селекцією. На підприємстві може використовуватися як монокультура, так і кілька штамів, тобто змішана культура продуцентів.

Одними з найперспективніших мікроорганізмів для отримання білково-вітамінних добавок є дріжджі. Мікробний протеїн, що синтезується дріжджами, за засвоюваністю та вмістом амінокислот перевищує протеїн тваринного походження, він засвоюється в організмі тварин на 95 %. Дріжджі містять різноманітні ферменти та гормони, що покращують обмін речовин в організмі тварин і підвищують засвоєння білків та вуглеводів, що містяться у звичайних кормах. Ферментні системи дріжджів каталізують процеси засвоєння амінокислот та синтезу білка. Вітаміни групи В є регуляторами метаболізму жирів [9]. Фосфор і кальцій, що перебувають у складі біомаси, сприяють нормальному розвитку кісткового скелета. Таким чином, білкова дріжджова біомаса чудово доповнює білки рослинного походження, при цьому витрата останніх знижується на 10–15%, а приріст тварин зростає на 10–20% [9].

Використання збалансованого кормовими дріжджами поживного раціону сільськогосподарських тварин дозволяє суттєво скоротити витрати рослинних кормів та значно підвищити ростові та виробничі характеристики худоби (табл. 1.1.) [41].

Таблиця 1.1– Основні показники ефективності кормових дріжджів

Тварини	Додаткова продукція на кг сухих дріжджів	Економія кормів	Середня річна потреба	Інші переваги
Телята (1,5-6 місяців)	0,9–1,1 кг/міс	10–14 % на 1кг приросту ваги	30 кг	
Дійні корови і велика рогата худоба	6–7 л молока	10–14 % на 1 літр	20 кг	Збільшується жирність молока

За даними [9] 1 т кормових дріжджів дозволяє отримати 0,4–0,6 т свинини, до 1,5 т м'яса птиці, 25–30 тис. яєць і заощадити 5–7 т зерна.

Кормові дріжджі використовують як добавку до основного раціону не тільки сільськогосподарських тварин, а й птахів та риби. Їх вносять у корми на комбікормових заводах чи кормоцехах господарств, використовуючи існуючі технології.

Таким чином, можна зробити висновок, що найбільш перспективним шляхом переробки жирових стоків рибпереробки є біоконверсія в біомасу кормового призначення. Причому найбільш доцільно використовувати як продуценти дріжджові культури, оскільки дана група мікроорганізмів має високу питому швидкість росту, здатна асимілювати як джерело вуглецю широкий спектр субстратів. Крім того, протипоказань до застосування кормових дріжджів немає. Передозування не викликає побічних явищ, застосування препарату не впливає на термін забою худоби та якість молока [42].

#### **1.4. Використання жирових відходів рибпереробки як сировини для отримання біомаси кормового призначення**

Технологічна схема виробництва кормових дріжджів на будь-якому виді сировини включає: приготування посівного матеріалу, приготування та стерилізацію поживних середовищ, стадію ферментації, а також

концентрування, сушіння та фасування готового продукту. Крім того, технологія передбачає низку допоміжних операцій: стерилізацію обладнання та комунікацій, приготування та стерилізацію піногасників, розчинів тощо.

У промислових умовах поживні середовища зазвичай готують у окремому цеху. Середовище готують у ємностях, з механічними мішалками, склад поживних середовищ визначається потребами мікроорганізму при вирощуванні на конкретному субстраті і, як правило, визначається експериментально. При необхідності окремі компоненти піддають додатковій обробці: просіюванню, відварюванню, екстрагуванню, подрібненню тощо. [27, 43, 44]. Останнє особливо актуально при реалізації глибинних гетерофазних процесів, до яких відноситься біодеструкція жирів, так як ефективність культивування безпосередньо залежить від біодоступності субстрату. Крім того, наявність великих частинок різко підвищує ймовірність збереження в них сторонньої мікрофлори.

Поживне середовище засівають чистою культурою і вирощують у кілька етапів: спочатку в колбах, потім у посівних апаратах. Як правило, посівні дріжджі вирощують у періодичних умовах, проте при великотоннажному виробництві на останньому ступені може бути реалізований безперервний процес. На всіх стадіях вирощування мікроорганізму підтримують оптимальні умови (рН, температура, ступінь аерації тощо) та необхідне перемішування ферментаційної рідини.

Стадія ферментації є основною серед етапів промислового виробництва. Під ферментацією розуміють всю сукупність послідовних операцій від внесення в заздалегідь приготовлене та термостатоване середовище інокуляту і до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації внаслідок закінчення поживних елементів середовища, припинення біосинтезу, втрати активності культурою або з інших причин.

В даний час розроблено широкий спектр технологій культивування мікроорганізмів з метою одержання кормових добавок. Причому основні дослідження спрямовано на організацію безперервного процесу виробництва. У

зв'язку з чим найперспективнішим є хемостатне культивування, проте в результаті цього типу культивування кінцевий продукт міститиме досить високі концентрації недоутилізованого компоненту субстрату. Проблема зниження залишкової концентрації субстрату в ферментаційному середовищі стає особливо важливою при вирощуванні дріжджів на поживних середовищах, що містять різні типи відходів. Таким чином, кількість та якість одержуваної біомаси залежить не тільки від сировини та продуцента, а й складу поживного середовища та режиму культивування [9]. Оптимальні характеристики реалізації стадії ферментації визначаються в результаті експериментальних досліджень та залежать від масообмінних характеристик апарату.

На процес біодеградації техногенних відходів впливають умови зовнішнього середовища, рівень поживних речовин, їх збалансованість, відведення метаболітів, зміна активної кислотності середовища, температури, насиченість середовища розчиненим киснем, стан та вік культури продуцента та багато інших факторів. Залежно від способу культивування та фізіологічних особливостей продуцента значимість цих факторів та ступінь їх впливу на склад біомаси різні [9]. Вивчення впливу цих факторів дуже важливе з метою підвищення ефективності ферментації.

Стадія виділення та сушіння біомаси є одним із найбільш енергоємних етапів біотехнологічного виробництва, що багато в чому визначає собівартість кінцевого продукту та рентабельність виробництва в цілому. Ця стадія зазвичай включає такі етапи як відстоювання, сепарацію і наступну сушку. Сучасні розробки дозволяють інтенсифікувати цей процес за рахунок використання таких технологічних прийомів як флотація, флокуляція тощо. Однак найперспективнішим є підхід, що передбачає відокремлення біомаси шляхом фільтрації, що суттєво знижує енерговитрати [9]. Варіанти сушіння біомаси залежать від вихідних параметрів концентрату та вимог до кінцевого продукту та відрізняються апаратурним оформленням. Вибір того чи іншого варіанту, зазвичай, проводиться за результатами економічних розрахунків.

Вищеописане дозволяє зробити висновок про те, що при розробці технології аеробної біоконверсії жирової фази стоків рибопереробки в біомасу кормового призначення особлива увага має бути приділена вибору штаму продуцента та оптимізації складу поживного середовища з позиції підвищення ліполітичної активності мікроорганізму. Також слід детально розглянути можливість підвищення ефективності процесу здійсненням передобробкою субстрату/поживного середовища.

#### **1.4.1. Загальна характеристика мікробних ліпаз**

Ліпази, крім біологічного значення, яке пов'язаного з роллю цих ферментів у процесах метаболізму ліпідів, становлять великий інтерес як біокаталізатори для вирішення широкого спектра практичних завдань у промисловості та охороні здоров'я [26, 45]. Ці ферменти утворюються мікроорганізмами різних таксономічних груп: бактеріями, актиноміцетами, дріжджами та мікроскопічними грибами, мікроорганізми синтезують ліпазу у вигляді ендо- та екзоферментів [45]. Гриби та дріжджі продукують в основному позаклітинний фермент, бактеріальні ліпази є переважно ендоферментами, хоча у деяких бактерій виявлені екзоліпази. Виділення ліпаз в культуральну рідину, очевидно, пов'язане з необхідністю гідролізу гідрофобного субстрату – жиру до метаболітів, які легко проникають через клітинну оболонку.

Однак функція ендоліпаз у мікробній клітині залишається неясною і, мабуть, в основному пов'язана із залученням в обмін речовин продуктів розщеплення ліпідів та дезагрегацією структурних елементів для подальшого утворення нових структур [45].

Кращими продуцентами ліпаз вважаються представники роду *Pseudomonas*, що утворюють екзоліпази. Серед бактерій ліпазна активність виявлена у родів *Achromobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes* [26, 45]. Продуценти ліпаз знайдені і серед актиноміцетів, серед яких можна назвати *Streptomyces*

*flavogriseus* та *St.theremoactinomyces*, а також ряд інших [45, 46]. Однак більшість бактерій синтезують ліпазу, як правило, у невеликій кількості та внутрішньоклітинно, що ускладнює їх практичне використання.

Найбільшу кількість ліпаз продукують дріжджі та гриби [26]. Основними продуцентами ліпаз є гриби родів *Asparagillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Oospora*, *Penecillium*, *Geotrichum* і *Humicola*, серед дріжджів кращими продуцентами є представники роду *Candida* (*C. paralipolytica*, *C. cylindracea*), а також *Yarrowia lipolytica* [45-47].

За номенклатурою ферментів ліпаза має назву триацилгліцеролацилгідролаза (КФ 3.1.1.3), її рекомендована робоча назва триацилгліцеролліпаза. Цей фермент має ще кілька назв: стеапсин, трибутираза, ліпаза тригліцеридів, ліпаза [45]. Даний фермент розщеплює складноєфірні зв'язки гліцерину та жирних кислот у молекулі триацилгліцеролів [45]. Даний фермент розщеплює складно-єфірні зв'язки гліцерину і жирних кислот в молекулі тригліцеринів з подальшим відщепленням залишків жирних кислот до утворення гліцерину. Встановлено, що ліпази швидше відщеплюють залишки високомолекулярних жирних кислот, ніж нижчі карбонові кислоти, тобто нерозчинні у воді субстрати.

Ліпаза, на думку багатьох вчених, є гетерогенним білком, що має небілковий компонент, який має ліпідну природу, при видаленні його ліпаза може втратити активність. Ймовірно, цей фрагмент відповідальний за формування ділянки впізнавання субстрату [48, 49].

Механізм дії ліпаз має суттєву відмінність від ряду інших ферментативних реакцій [48]. Даний процес є гетерогенним, оскільки переважна більшість ліпаз розчиняється у воді, а субстратні молекули – нерозчинні і об'єднані в малорухливі великі асоціати (міцели, емульговані жирові краплі). Отже, ферментно-субстратна взаємодія має протікати на поверхні розділу фаз. В даний час встановлено, що конформація ферменту змінюється при зв'язуванні з субстратом, і поліпептидна ділянка, зміщається убік, відкриває доступ молекулам субстрату до активного центру. З

літературних джерел відомо, що, чим вищий ступінь диспергування субстрату, то швидше йде ліполіз [45, 49]. Ймовірно, це пов'язано з явищем сорбції ферменту на поверхні субстрату. Саме цей процес є першим актом ферментативного ліполізу. Але для того, щоб адсорбція ферменту була продуктивною, необхідно проникнення ферменту в поверхневий шар субстратної молекули, і тільки після цього у ферменту з'являється можливість контакту активного центру з молекулою субстрату. Активний центр ліпаз можна розчленувати на три ділянки, що різняться між собою функціонально:

- 1) контактна – відповідає за розпізнавання поверхні субстратної фази (міцели, емульсії, моношару тощо);
- 2) гідрофобна зв'язувальна ділянка – здійснює вилучення однієї молекули субстрату з субстратної фази в глобулу ферменту;
- 3) ділянка, утворена групами – здійснює каталітичний акт гідролізу складноефірного зв'язку.

Таке розчленування активного центру дозволяє пояснити процес каталізу, який здійснюють ліпази. Ймовірно, ферменти, що каталізують перетворення ліпідів, молекули яких мають полярні частини, вступають у контакт із поверхнею субстрату шляхом електростатичних взаємодій.

Мікробні ліпази можна розділити на дві групи згідно з позиційною специфічністю субстратів [48]. Ферменти першої групи не мають ферментної специфічності і вивільняють жирні кислоти з усіх трьох положень гліцерину. Характерними для позиційно-неспецифічних ліпаз є поява гліцерину в реакційній суміші вже на початковому етапі гідролізу, тоді як при гідролізі позиційно-специфічними ліпазами гліцерин починає з'являтися тільки після досягнення 20–50 % глибини розщеплення тригліцеридів. Друга група ліпаз звільняє жирні кислоти позиційно специфічно. Найчастіше специфічність дії ліпаз пов'язана з 1 і 3 положенням ацилгліцеринів. Основними продуктами, що утворюються в результаті даного ліполізу, є 2-моногліцериди та вільні жирні кислоти. Ліпази каталізують процеси трансетерифікації жирів (ацидоліз),

алкоголю, інтеретерифікацію. Ці процеси ґрунтуються на трансферазній дії ліпаз [45].

Залежно від оптимального для дії ліпаз рН, вони поділяються на кислі (4–6), нейтральні (6,5–7,2) та лужні (7,5–9) [45, 48].

Утворення ферментів мікроорганізмами залежить не тільки від продуктивності штамів, а й від умов їх культивування, які впливають на ріст та розвиток продуцента, на його біосинтетичну здатність [90]. Біосинтез ліпаз грибами та іншими мікроорганізмами залежить від багатьох факторів, до яких відносять вік культури, що використовується як посівний матеріал, кількості посівного матеріалу, аерації та температури вирощування, вихідного значення рН середовища, співвідношення різних компонентів поживного середовища тощо. Аналіз літературних даних показав, що кожна грибна культура, або точніше, кожен продуцент ліпази "вимагає" специфічних умов культивування і, відповідно, оптимального складу поживного середовища [26, 47, 49].

Відмінності в активності ліпаз навіть у окремих штамів одного виду можуть коливатися в десятки та сотні разів. Деякі мікроорганізми можуть містити дві або три ліпази з різними властивостями. Крім того, деякі мікробні ліпази мають специфічність до жирних кислот, що входять в молекулу триацилгліцериду. Фізико-хімічні (оптимальні температура, значення рН, наявність поверхнево-активних та перекисних сполук), каталітичні властивості ліпаз, отриманих з різних джерел, помітно відрізняються одна від одної.

До складу середовищ для культивування мікроорганізмів – продуцентів ліпаз часто додають компоненти ліпідної природи, оскільки, на думку багатьох дослідників, ліпази є індукцибельними ферментами [45-49]. Найчастіше до складу поживних середовищ додають оливкову та бавовняну олії, рідше – соняшникову, рапсову, кукурудзяну, касторову, соєву, лляну олії [45, 48]. Є дані про те, що ряд продуцентів збільшує біосинтез ліпаз в присутності не тільки олій, але й жирних кислот, стимулюючий ефект відзначають тільки до ненасичених жирних кислот; насичені жирні кислоти не сприяють активному біосинтезу ферменту.

Але навіть ті мікроорганізми, які у присутності ліпідів підвищують біосинтетичну здатність відносно ліпаз, дуже чутливі до рівня ліпідів у середовищі. Багато вчених відзначають, що концентрація ліпідів у середовищі має становити не більше 10–50 % кількості присутнього в середовищі джерела вуглецю, що відповідає 5–20 г/л, оскільки підвищення концентрації ліпідів у середовищі часто призводить до значного зниження рівня біосинтезу ферменту. Очевидно, це пов'язано з тим, що продукти їх розщеплення, що накопичуються, починають пригнічувати процес біосинтезу ліпази [45, 48, 49]. Виявлено, що спостерігається падіння ферментативної активності за рахунок субстратного інгібування. Дослідження ступеня інгібування ліпази жирними кислотами показало, що ступінь інгібування зростає із збільшенням концентрації останніх у реакційному середовищі. Мабуть, адсорбуючись на субстраті, жирні кислоти просторово та електростатично перешкоджають доступу ферменту до його поверхні [48].

Пропонується використовувати як джерело вуглецю та стимулятора утворення ліпаз поверхнево-активні речовини (ПАР). Довголанцюгові ПАР зазвичай поділяються на три групи: аніонні, катіонні та неіоногенні. Для біосинтезу ліпаз зазвичай застосовують у складі середовищ неіоногенні ПАР, до яких відносяться різні твіни, спани та жовчні кислоти, які відносяться до групи аніонних ПАР. Але ПАР також по-різному діють на ріст мікроорганізмів і синтез ліпаз. Багато авторів відзначають інгібуючий ефект ПАР. Це питання складне, воно потребує індивідуального експериментального підтвердження та вивчення для кожного продуцента [47].

Вивчено також вплив іонів металів та солей жовчних кислот на активність ліпази. При цьому виявлено, що в регуляції активності ферменту можуть брати участь іони кальцію, міді, цинку тощо, солі жовчних кислот у концентраціях до 20 мМ, понад цю концентрацію вони гальмують процес ліполізу [27].

Не менш важливим, ніж джерело вуглецю, є джерело азоту, що споживається. Відомо, що більшість продуцентів ліпаз використовують для побудови клітин та утворення ферментів найрізноманітніші джерела азоту. У

складі середовищ використовують мінеральні, органічні форми азоту та змішані джерела азоту. Проте рівень ліпазної активності цих джерел різний і визначається індивідуальними особливостями культури. Присутність у середовищі амінокислот, вітамінів, нуклеїнових кислот та інших сполук сприяє біосинтетичній діяльності багатьох мікроорганізмів [45].

Таким чином, при культивуванні продуцентів ліпаз необхідний ретельний підбір умов культивування та складу поживного середовища.

#### **1.4.2. Інтенсифікація споживання субстрату при гетерофазному культивуванні попередньою обробкою поживного середовища**

Гетерофазні процеси культивування використовуються людиною з давніх-давен. Тим не менш, досі при створенні нових технологій виникають проблеми, пов'язані з підвищенням їхньої ефективності.

Як відомо з літератури, системи, що складається з двох і більше дисперсних фаз, мають інші реологічні властивості, ніж однофазні системи [49]. У разі гетерофазного культивування в системі присутні чотири фази: водний розчин мінеральних компонентів, колонії мікроорганізмів, субстратна фаза та газова повітряна фаза. Відомо, що збільшення розміру частинок твердої фази призводить до різкого зростання в'язкості системи. Аналогічний ефект спостерігається у разі підвищення концентрації частинок у крупнодисперсних системах. Зі зростанням в'язкості системи різко знижується масопередача та швидкість росту мікроорганізмів [27, 46].

Аналіз літератури показує, що при гетерофазному культивуванні, коли фаза субстрату перебуває у рідкому стані (емульсія), подрібнення частинок до потрібного розміру може бути досягнуто інтенсивним перемішуванням. Наприклад, відомо, що при культивуванні дріжджів на н-парафінах нафти близько однієї третини всіх мікроорганізмів споживають краплі діаметром менше 3 мкм, а дві третини адсорбуються на поверхні діаметром від 3 до 5 мкм. Споживання частинок більшого розміру не відбувається, тому диспергування

н-парафінів, на ефективність якого впливає перемішування, відіграє важливу роль у процесі культивування [46].

Однак, при проведенні гетерофазного культивування з твердим субстратом перемішування недостатньо для подрібнення частинок до необхідних розмірів. Пояснити дане явище можна тим, що поверхневий натяг твердих тіл на порядок - два більше, ніж у рідин, а, отже, потрібно значно більше підведення енергії для диспергування [47]. Тому під час проведення процесів гетерофазного глибинного культивування у присутності твердих джерел вуглецю субстрат або поживне середовище вимагають попередньої обробки.

Виділяють чотири способи попередньої обробки субстратів: механічний, фізичний, хімічний та біологічний. Механічні методи обробки субстратів полягають у їхньому подрібненні на різних видах млинів (кульові, колоїдні, вібрмлини), дезінтеграторах та дробарках, диспергуванні на вальцях. До фізичних методів відноситься обробка у-променями або потоком електронів, мікрохвильовим випромінюванням, нагрівання на повітрі або в присутності інертного газу, у воді або органічному розчиннику, охолодження, обробка при підвищеному або зниженому тиску, дія ультразвуку. Хімічні методи базуються на здатності тих чи інших сполук за рахунок хімічних реакцій (гідроліз, окислення тощо) переводити субстрат у більш доступну для споживання форму. Зазначений варіант попередньої обробки багато років використовується при виробництві кормових дріжджів та етилового спирту на рослинній сировині [46].

Всі зазначені способи давно застосовуються при проведенні ферментацій на целюлозній сировині. Показано, що при культивуванні на соломі гриба *Trichoderma viride* зменшення розміру частинок за рахунок дроблення з 1 см до 0,05–0,2 см дозволяло значно посилити масообмін, аерацію середовища та скоротити терміни культивування. До того ж вміст білка в біомасі змінювався від 8–10 % до 12–15 % [37]. Як зазначають автори, такий ефект досягався за рахунок того, що зменшення розміру частинок дозволило збільшити концентрацію субстрату, не знижуючи ефективність масообміну.

Аналіз літератури показує, що останнім часом попередню обробку субстрату стали розглядати як спосіб підвищення інтенсивності біодеструкції жиромісних відходів [46].

Відомо, що під дією лугів жири піддаються гідролізу (омиленню). Реакція незворотна, так як карбоксилатні іони не вступають у реакцію із гідроксильними групами гліцерину. Перебігу реакції сприяє те, що перші порції мила, діють як ПАР. При цьому кінцеві продукти реакції розчиняються у воді.

В даний час показана можливість здійснення лужного гідролізу жиромісних стоків м'ясопереробної промисловості [50]. Як вказують автори, гідроліз проводили в ємності, об'ємом 1 л, заповненій стічними водами на 80 %. Стічні води містили приблизно 3 г/л свинячого жиру. Концентрація гідроксиду натрію становила 0,05–0,4 н. Гідроліз проводили при перемішуванні з частотою 60 об/хв при кімнатній температурі протягом 4 годин. При цьому ХСК значно не змінювалося при всіх концентраціях лугу. Однак при рН 13,2 розмір часток знижувався приблизно на 36 % (з 315 до 214 мкм).

Дослідження впливу лужного гідролізу субстрату на ефективність біодеструкції легкоплавкої фракції свинячого жиру аборигенною мікрофлорою відходів м'ясопереробки показали, що даний спосіб передобробки збільшує накопичення біомаси в період періодичного культивування на 43 % [50].

Отримані результати свідчать про низьку ефективність лужного гідролізу жиромісних відходів. До недоліків цього методу попередньої обробки можна також віднести велику тривалість процесу, що робить його енергетично не вигідним, оскільки при його проведенні потрібно здійснювати перемішування і значне підведення тепла для інтенсифікації процесу.

В даний час вивчено передобробку жиромісних стічних вод ліпазою гриба *P. restrictum* [5]. Встановлено, що при проведенні анаеробного очищення стічних вод без попередньої обробки ХСК знижувалося на 50 %, якщо ж попередня обробка здійснювалася, то ХСК знижувалося на 90 %.

В літературі повідомляється про можливість використання для попередньої обробки жиромісних стічних вод термостійкою ліпазою бактерій *Pseudomonas*

*aeruginosa*. Ця ліпаза характеризується оптимумом рН 8 та температурним оптимумом 55 °С [8].

Таким чином, ферментативний гідроліз жировмісних відходів є значно ефективнішим, ніж лужний. До переваг даного способу попередньої обробки можна також віднести меншу енергоємність, оскільки процес ферментативного гідролізу йде в більш м'яких умовах і не вимагає значного підігріву середовища. Проте, на вартість розглянутого способу попередньої обробки істотно впливає вартість ферментних препаратів. Оскільки регенерувати фермент після проведення гідролізу досить проблематично, метод попередньої обробки жировмісних відходів шляхом їх ферментативного гідролізу виявляється вкрай дорогим і нерентабельним.

З вище сказаного можна дійти невтішного висновку, що хімічні методи попередньої обробки взагалі не вигідні, оскільки є або низько ефективними, або енергоємними і дорогими. Така особливість цього виду попередньої обробки відома вже давно [6].

Аналіз літератури показує, що для диспергування різних речовин останні кілька десятиліть у таких галузях промисловості як хімічна та нафтохімічна, харчова, фармацевтична, біотехнологічна дедалі частіше застосовується ультразвук [51]. Даний метод є досить ефективним, не вимагає значних витрат енергії і має низку переваг.

З вищесказаного випливає, що з безлічі можливих варіантів утилізації жировмісної фази стоків рибопереробної промисловості біодеструкція з метою отримання кормового білкового продукту є найбільш перспективною. Однак, при проведенні культивування мікроорганізмів на жирах неминуче виникають складнощі, пов'язані з гетерофазністю процесу. Інтенсифікація даного процесу може бути здійснена за рахунок попередньої обробки поживного середовища за допомогою лужного або ферментативного гідролізу, проте обидва ці процеси значно поступаються всім параметрам ультразвукової попередньої обробки [51].

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1 Визначення хімічних показників жирової фази стоків рибопереробних підприємств

Основним об'єктом дослідження були жировмісні стоки рибопереробного підприємства ТОВ «РЗК» Південний (м. Білгород-Дністровськ Одеської області), які відбирали із шламозбірника. Хімічні показники усередненої проби відходів (загальний жир, вільні жири, кислотне та перикисне число жиру) визначали відповідно до ДСТУ 660:2019, ДСТУ ISO 7847:2006, ДСТУ EN 14105:2009.

*Визначення загального вмісту жиру.* В основі методу лежить екстрагування жиру із суміші органічним розчинником з подальшим гравіметричним визначенням його вмісту відносно вихідного зразка.

Із знежиреного фільтрувального паперу згортають циліндр, в який поміщають 2 невеликі шматочки знежиреної вати і зважують. Потім циліндр щільно закручують з одного боку і поміщають на дно один із шматочків вати. У циліндр вносять наважку аналізованого зразка масою 3 г, зверху поміщають другий шматочок вати і закручують другий кінець циліндра.

Після цього проводять повторне зважування і зразок поміщають в апарат Сокслета. Визначають масу порожньої колби –  $g_k$ . Зібраний апарат накривають азбестовим полотном, заповнюють розчинником (етанол: хлороформ = 1:2) у кількості 150 мл і нагрівають протягом 2–3 год з використанням електричної плитки, забезпечуючи рівномірне кипіння розчинника, залитого в колбу. Кінець кип'ятіння визначають візуально, відбираючи краплю екстракту з охолодженої камери апарату та поміщаючи її на чисте предметне скло. Екстракцію вважають закінченою, якщо після випаровування органічного розчинника на склі не залишається жирових плям.

Після закінчення апарат розбирають, з колби відганяють леткі компоненти (органічний розчинник і воду), приєднуючи колбу до установки перегонки. Завершують відгін летких компонентів при

температурі 100–103 °С. Після охолодження колбу зважують. Також зважують висушений паперовий циліндрик.

Масову частку жиру у вологому зразку  $X$  (%) обчислюють за формулою:

$$X = 100 \cdot (G_{\text{жир}} - g_{\text{к}}) / g. \quad (2.1)$$

Оцінку масової частки води у зразку  $Y$  (%) проводять за формулою:

$$Y = 100 \cdot (g_{\text{зр}} - [G_{\text{жир}} - g_{\text{к}}] - g_{\text{ц}}) / g. \quad (2.2)$$

Масову частку жиру в сухому зразку  $X_1$  (%) обчислюють за формулою:

$$X_1 = X \cdot 100 / (100 - Y), \text{ де} \quad (2.3)$$

$G_{\text{жир}}$  – маса колби з висушеним жиром, г;

$g_{\text{к}}$  – маса порожньої колби, г;

$g$  – наважка аналізованого зразка, г;

$g_{\text{зр}}$  – наважка аналізованого зразка в паперовому циліндрику, г;

$g_{\text{ц}}$  – маса сухого циліндрика із залишком.

Визначення масової частки вільно-витягнутого жиру. В основі методу лежить розчинення ліпідів у бінарній суміші органічних розчинників, їх відділенні та гравіметричному визначенні масової частки видобутого жиру.

Наважку зразка масою близько 2 г поміщають у паперовий циліндрик, потім його переносять у ділильну воронку в яку додають 20 мл екстрагуючої суміші (етанол : хлороформ = 1:2). Проводять екстракцію протягом двох хвилин шляхом перевертання ділильної воронки.

Екстракцію повторюють ще двічі із зменшенням об'єму розчинника до 10 мл. Суміш екстрактів переносять у круглодонну попередньо зважену колбу. Потім ділильну воронку обполіскують 5 мл екстракційної суміші та екстракт виливають у колбу. Для видалення розчинників здійснюють перегонку. Потім зважують колбу з жиром та додають 10 мл хлороформу. Через 5 хвилин зливають хлороформ. Таке виділення ліпідів розчиненням повторюють ще двічі. Після чого колбу залишають у тязі на 30 хвилин. Потім колбу з неліпідними домішками зважують.

Масову частку жиру у вологому зразку  $X$  (%) обчислюють за формулою:

$$X = (g_1 - g_2)/g. \quad (2.4)$$

Масову частку жиру в сухому зразку  $X_1$  (%) обчислюють за формулою:

$$X_1 = (g_1 - g_2)/g*(1 - Y), \text{ де} \quad (2.5)$$

$g_1$  – маса колби з жиром, г;

$g_2$  – маса колби з неліпідними домішками, г;

$g$  – маса наважки зразка, г,

$Y$  – масова частка води.

Визначення кислотного числа жирів та олій. Кислотне число (КЧ) – це кількість міліграмів гідроксиду калію КОН, необхідне для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1 г жиру або олії.

Конічну колбу зважують, після чого вносять жир у кількості 2 г і проводять повторне зважування. У колбу додають розчинник (етанол: хлороформ = 1:2) у кількості 20 мл та 1 мл 1 % розчину фенолфталеїну в етиловому спирті. Колбу перемішують до повного розчинення жиру і титрують з бюретки 0,1 М розчином КОН до слабкого рожевого забарвлення розчину, що не зникає протягом 30 секунд. Кислотне число КЧ (мг КОН/г) у вологому зразку розраховують за формулою:

$$\text{КЧ} = 5,611 * V/g. \quad (2.6)$$

Кислотне число КЧС (мг КОН/г) у сухому зразку розраховують за формулою:

$$\text{КЧС} = \text{КЧ} * 100 / (100 - Y), \text{ де} \quad (2.7)$$

5,611 – титр 0,1 М розчину КОН,

$V$  – кількість розчину КОН, який пішов на титрування, мл,

$g$  – наважка жиру, г,

$Y$  – масова частка води у зразку, %.

Як кінцевий результат беруть середнє арифметичне трьох паралельних визначень окремих проб, обчислення проводять до першого десяткового знаку.

## **2.2. Визначення мікробіологічних показників жирових відходів та дослідження властивостей автохтонних культур мікроорганізмів**

Мікробіологічні характеристики, а також виділення та дослідження автохтонних культур мікроорганізмів здійснювалося з використанням стандартних методів [52].

Визначення КУО та виділення ізолятів мікроорганізмів здійснювалося методами Виноградського (накопичувальних культур) та Коха.

Вивчення властивостей автохтонних бактерій проводили відповідно до [52], при цьому визначали: морфологічні ознаки вегетативних клітин та колоній, грамтип, наявність внутрішньоплазматичних включень, споруутворення.

Дослідження властивостей грибного ізоляту проводили за стандартною схемою відповідно до [52] при цьому визначали: морфологічні (характеристики вегетативних клітин та колоній; утворення міцелію, хламідоспор, балістоспор; ріст культури на щільних та рідких середовищах; природа внутрішньоплазматичних включень; характеристики статевого процесу), фізіологічні (асиміляція різних джерел вуглецю та азоту; здатність до зброджування цукрів; ріст на безвітамінному середовищі; стійкість до підвищених осмотичних тисків; ріст культури при різних температурах) та біохімічні (ліполітична, уреазна активності; утворення органічних кислот, ефірів, крохмалеподібних з'єднань; чутливість до антибіотиків) ознаки.

## **2.3. Культури мікроорганізмів та умови їх культивування**

Мікробними об'єктами були штами мікроорганізмів, що мають ліполітичну активність: бактерії – *B.mesentericus*, *B.subtilis*, *Acinetobacter sp.*; гриби – *A.mysae*, *P.orysae*, дріжджі – *Geotrichum sp.* Культивування проводили в колбах об'ємом 250 мл (100 мл середовища) при перемішуванні (150 об/хв) та у ферментері об'ємом 5 л із заповненням поживним середовищем на 70 % при перемішуванні (250 об/хв) та аеруванні повітрям 170 л/год.

Вирощування бактерій здійснювалося за 37 °С на середовищі такого складу, г/л:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	– 3,0,
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	– 7,0,
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,25,
$\text{NH}_4\text{Cl}$	– 1,0,
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	– 0,02,
$\text{NaCl}$	– 0,5,

дистильована вода – до 1,0 л, рН – 7;

як джерело вуглецю використовували відвар соєвого борошна та легкоплавку фракцію свинячого жиру (концентрації вказані у тексті).

Склад середовища для культивування грибів та дріжджів (середовище Рідера), г/л:

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	– 0,1,
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	– 1,0,
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,7,
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	– 3,0,
$\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	– 0,4,
$\text{NaCl}$	– 0,5,

дистильована вода – до 1,0 л, рН – 5,0;

як субстрат використовували легкоплавку фракцію свинячого жиру, жирову фазу стоків рибопереробних підприємств (концентрації вказані у тексті).

Характеристика дріжджів *Geotrichum sp.* [52]. Основним мікробним об'єктом дослідження у цій роботі був штам *Geotrichum sp.* Характерною особливістю даного штаму є:

- 1) відсутність бродильної активності,
- 2) здатність швидко зростати на олеаті, на середовищах з високою (30–50 %) концентрацією глюкози,
- 3) нездатність використовувати маніт як єдине джерело вуглецю.

Серед різноманітних азотовмісних речовин клітини утилізують етиламін, L-лізин, кадаверин, L-триптофан, глютамін і не використовують нітрат, нітрит, креатин, креатинін, імідазол як єдине джерело азоту. Клітини ростуть без додавання вітамінів. Однак, введення в середовище культивування біотинової та фолієвої кислот, ніацину, пантотенату і особливо тіаміну значно прискорює ріст клітин. Клітини досліджуваного штаму мають високу ліпазну, уреазну та протеїназну активності, не утворюють полісахаридних капсул, не екскретують крохмалоподібні речовини, не утворюють меланіни, не мають  $\alpha$ -глюкозидазної активності (не розщеплювали арбутин).

Колонії досліджуваного штаму, зазвичай біло-кремового кольору, при рості на середовищах з тетразолієвим індикатором набували яскравого фіолетового забарвлення. Реакція з діазонієвим синім була негативною. У складі вуглеводів клітинної стінки поряд з глюкозою та маннозою, виявлено і галактозу. Особливістю досліджуваного штаму є його здатність рости і на різних субстратах у присутності високих концентрацій NaCl та широкому діапазоні рН. Оптимальна температура росту – 25–35 °С, максимально переносима температура 37 °С. Наявність в середовищах високих концентрацій NaCl не змінювало діапазон цих температур. Важливими ознаками досліджуваного штаму були його чутливість до дії 1 % циклогексїмїду та здатність рости на еритриті як єдиному джерелі вуглецю. Висока температура плавлення клітинної ДНК (74,4 °С) свідчила про відносно високий вміст Г+Ц (48,3 мол. %).

Штам *Geotrichum sp.* здатний утилізувати п-парафіни, жирні кислоти та інші рідко утилізовані субстрати в якості єдиного джерела вуглецю, що становить промисловий інтерес. Крім того, *Geotrichum sp.* чудово підходить для вивчення шляхів біодеградації різних гідрофобних сполук (включаючи аміни, олії, жирні кислоти). Дріжджі *Geotrichum sp.* відомі як «надпродуценти» органічних кислот ( $\alpha$ -кетоглутарової та лимонної), амінокислот, лізину. Іншою відмінністю *Geotrichum sp.* є їх природна здатність екскретувати великі білкові молекули типу ліпаз, фосфатаз, протеїназ. *Geotrichum sp.* має значні переваги

для вивчення та застосування порівняно з іншими видами дріжджів, оскільки цей штам не токсичний, може рости при високих значеннях щільності (щільність культури може досягати 100 OD) і піддається технічним прийомам класичної і молекулярної генетики. Оскільки дріжджі *Geotrichum* sp. можуть рости в засолених, лужних і кислих умовах маючи високоактивний комплекс ліпаз, це відкриває нові можливості для біодеградації жирової складової стічних вод рибопереробних підприємств.

#### 2.4. Визначення ліполітичної активності мікроорганізмів

Ліполітичну активність визначали за реакцією гідролізу оливкової олії [53].

До реакційної суміші, що містить 4,5 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8,0) і 5 мл 40 % емульсії оливкової олії в 2 % полівініловому спирті доливають 0,5 мл культуральної рідини або попередньо обробленої суспензії клітин культури (ретельно промиті буфером). Тест-пробу інкубують протягом 30 хв при температурі 37 °С, після чого додають 10 мл суміші етанол : ацетон (1:1). Ступінь розщеплення оливкової олії визначають, відтитровуючи продукти гідролізу розчином гідроксиду натрію (0,05 М NaOH), у присутності 1 %-ого тимолфталейну, до появи блакитного забарвлення. Контрольну пробу обробляють аналогічно тест-пробі, але ліпазу вносять безпосередньо перед титруванням. Специфічну активність ліпази виражають у мікромоль олеїнової кислоти, що вивільняється за 1 годину при гідролізі субстрату 1 мг біомаси.

Розрахунок питомої ліполітичної активності (ПЛА), в од.акт./мг біомаси (за сухою вагою), проводять за формулою:

$$\text{ПЛА} = [(V - V_k) * K] : [t * V_E * C], \text{ де} \quad (2.8)$$

$V$  – кількість 0,05 М NaOH, витраченого на титрування тест-проби, мл;

$V_k$  – кількість 0,05 М NaOH, витраченого на титрування контрольної проби, мл;

$K$  – кількість олеїнової кислоти, що відтитрується 1 мл 0,05 М NaOH ( $K = 50$ ), мкмоль;

$t$  – час реакції, год;

$V_E$  – обсяг суспензії клітин, що додається до реакційної суміші, мл;

$C$  – концентрація біомаси (на суху речовину), мг/мл.

Розрахунок загальної ліполітичної активності (ЗЛА) здійснювався за такою формулою:

$$\text{ЗЛА} = \text{ПЛА} * C, \text{ де} \quad (2.9)$$

$C$  – концентрація біомаси у культуральній рідині (на суху речовину), мг/мл.

Вилучення ендоліпази здійснювали двома способами, причому, необхідно відзначити, що отримані результати були схожими. В обох випадках біомасу концентрували центрифугуванням і ретельно промивали фосфатним буфером (рН 8).

Перший спосіб вилучення ферментів здійснювався шляхом перетирання біомаси у фарфоровій ступці з наважкою піску. Потім робили визначення ліполітичної активності як описано вище.

В ході другого способу концентрована суспензія клітин піддавалася ультразвуковій обробці з робочою частотою 25 кГц протягом 10 хвилин. Потім робили визначення ліполітичної активності як описано вище.

## **2.5. Визначення основних показників мікробної біомаси**

Вміст сирого протеїну, істинного білка, загальних вуглеводів, загального жиру, нуклеїнових кислот в мікробній біомасі визначали відповідно до ДСТУ 8723:2017. Вміст нуклеїнових кислот та загальних вуглеводів за методами, описаними в [9].

Визначення сирого протеїну методом К'ельдаля. Метод базується на мінералізації наважки аналізованого матеріалу концентрованою сірчаною кислотою в присутності селену до утворення сульфату амонію, за кількістю

азоту в отриманому сульфаті амонію, яку визначають відгоном аміаку в кислоту, знаходять вміст сирого протеїну.

У круглодонну колбу К'ельдаля вносять 0,5 г біомаси, додають на шпателі 0,5 г каталізатора селенового і 10 мл концентрованої сірчаної кислоти. Колбу ставлять на плитку для спалювання (окислення органічних речовин до вуглекислого газу та води). При повному знебарвленні розчину спалювання закінчують, колбу охолоджують і вміст колби кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл і доводять до мітки дистильованою водою. Після ретельного перемішування приступають до відгону аміаку на апараті К'ельдаля. Перед початком перегонки до приймача вносять 10 мл реактиву Конвею. У перегінну колбу вносять 10 мл проби, потім доливають 10 мл 40 %-ного розчину гідроксиду натрію. Перегонку проводять протягом 30 хвилин, аміак, що виділяється, поглинається реактивом Конвею з утворенням борату амонію. Далі поглинений аміак відтитрують 0,05 н сірчаною кислотою до зміни зеленого забарвлення у вихідне.

Розрахунок вмісту загального азоту проводять за формулою:

$$N = (V * 0,05 * 14 * 100 / H * 10) * 100\%, \text{ де} \quad (2.10)$$

N – вміст азоту у пробі;

V – об'єм сірчаної кислоти, витраченої на титрування (мл);

0,05 – концентрація титранту (мг-екв/мл);

14 – кількість азоту (мг), що зв'язує 1 мг-екв сірчаної кислоти;

100 – об'єм розчину у мірній колбі (мл);

10 – кількість розчину, взятого для відгону аміаку (мл);

H – наважка матеріалу (мг).

Кількість сирого протеїну розраховується за формулою:  $X = N * 6,25$ .

Визначення масової частки білка за Барнштейном. Сутність методу полягає у видаленні з продукту водорозчинних небілкових азотовмісних сполук при обробці продукту гарячою водою, відновленні азоту органічних сполук, що залишилися при мінералізації продукту сірчаною кислотою до аміаку,

титрометричному визначенні аміаку та перерахунку його кількості на вміст білка за Барнштейном.

У хімічну склянку відважують 0,5–0,2 г продукту, доливають 100 мл окропу дистильованої води. Склянку ставлять на нагрівач і кип'ячать вміст 2–3 хвилини. Потім склянку знімають і не охолоджуючи рідини, доливають 20 мл розчину сірчаноокислої міді, вміст перемішують, додають 20 мл розчину гідроксиду натрію з масовою часткою 2,5 %, знову перемішують і залишають при кімнатній температурі на 1 годину. Відстоєну рідину декантують через фільтр, осад у склянці промивають гарячою водою, декантацією зливаючи промивні води, через той же фільтр, потім осад переносять на фільтр і промивають його гарячою водою до зникнення в промивних водах реакції на сульфат-іон, для чого в пробірку відбирають кілька крапель промивних вод і додають 2–3 краплі розчину хлориду барію; відсутність помутніння вказує на повноту промивання. Промитий осад разом з фільтром підсушують на повітрі або в сушильній шафі при температурі не вище 105–107 °С і поміщають у колбу К'ельдаля. Випробування проводять одним із встановлених способів мінералізації.

Визначення загального вмісту вуглеводів у фенол-сірчаній реакції (метод Дюбуа) [9]. При визначенні вмісту вуглеводів у біомасі попередньо здійснюють екстракцію 70 % водним розчином спирту. Для цього проба в кількості 1 г поміщається в круглодонну колбу, до неї додають 20 мл розчину спирту і інкубують протягом 20 хв при 60 °С зі зворотним холодильником. Потім пробу фільтрують і повторюють процедуру з осадом ще двічі. Фільтрати поєднують і доводять у мірній колбі до 100 мл.

Розведений спиртовий екстракт вносять піпеткою в товстостінні пробірки. Об'єм у кожній пробі доводять до 1 мл. Одночасно готують контрольну пробу з 1 мл дистильованої води та серію стандартних розчинів глюкози з концентрацією від 10 до 100 мкг/мл.

Одночасно у всі пробірки додають по 1 мл 5 %-го розчину фенолу в дистильованій воді, ретельно перемішують струшуванням, а потім додають

5 мл концентрованої сірчаної кислоти, так само швидко перемішують і залишають у темному місці для настання зафарбовування.

Через 15 хв знімають показання оптичної густини при 490 нм проти контрольного зразка. Будують калібрувальну криву. Концентрацію вуглеводів у пробі визначають за стандартною калібрувальною кривою, враховуючи розведення проби.

Результати експериментів обробляли методами математичної статистики. Значення показника достовірності знаходили за критерієм Стьюдента при довірчій вірогідності  $P=0,95$  і міри свободи  $f=n-1$ . Допустимою величиною відносної помилки рахували її значення, що не перевищує 5 %.

### РОЗДІЛ 3

## БІОКОНВЕРСІЯ ЖИРОВМІСНОЇ ФАЗИ СТОКІВ РИБОПЕРЕРОБНИХ ПІДПРИЄМСТВ В КОРМОВУ ДОБАВКУ

Оскільки склад жирової фази стоків може істотно варіювати в результаті життєдіяльності автохтонної мікрофлори, а також залежно від якості сировини, що переробляється, зразки відбирали протягом декількох циклів функціонування підприємства з шламозбірника на 1, 5 і 13 добу після надходження. Дослідження хімічного складу жирових відходів стоків одних термінів зберігання (табл. 3.1) виявили незначні відмінності в масових частках аналізованих сполук в складі жирової сировини, що свідчить про однотипність відходів, що утворюються в ході роботи підприємства.

Таблиця 3.1– Хімічні показники жировмісної фази стоків рибопереробки з різними строками зберігання в шламозбірнику\*

Зберігання відходів, діб	Загальний жир, %	Вільно-вилучений жир, %	Кислотне число	Сирий протеїн, %
1	86,9–88,4	82,2–84,3	190,1–219,4	12,5–13,9
5	70,3–76,6	63,3–74,6	131,4–140,3	17,5–21,0
13	58,3–61,4	46,1–48,3	118,8–124,6	19,0–22,1

\*- з урахуванням розкиду показників різних проб

Однак, явні зміни складу жирової маси в процесі її витримування в шламозбірнику свідчать про активний розвиток автохтонної мікрофлори, яка споживає жир, знижуючи його частку. При цьому накопичується мікробна біомаса, в результаті чого зростає вміст сирого протеїну і вуглеводів. Паралельне зниження масової частки вільного жиру і кислотного числа, ймовірно, пов'язане зі споживанням мікрофлорою, що розвивається, найбільш легкозасвоюваних жирів, в той час як важкозасвоюванні жири залишаються не спожитими.

При вивченні мікробіологічних показників жирових відходів виявлено високу засміченість (до  $10^8$  кл/г) відходів (табл. 3.2). Із збільшенням терміну зберігання відходів знижується чисельність бактерій і зростає кількість грибів.

Таблиця 3.2 – Мікробіологічні показники жировмісної фази стоків рибопереробки з різними строками зберігання в шламозбірнику

Зберігання відходів, діб	КУО, 10 <sup>6</sup> кл/г	
	бактерії	гриби
1	100,2	2,5
5	15,4	86,5
13	8,8	167,9

У ході виділення аборигенної мікрофлори здійснювалося як поверхнєве, так і глибинне культивування, як на стандартних, так і на середовищах, що містять різні фракції жировмісних відходів, а також ряд складових жирів, а саме: гліцерин та вищі карбонові кислоти. Як джерела мікроорганізмів використовували жири, відібрані зі шламозбірника протягом декількох циклів функціонування.

При виділенні природної мікрофлори досліджуваної жировмісної фази стоків було виявлено, що бактеріальна культура в основому переважає у відходах першого дня. Далі кількісне співвідношення поступово зміщується у бік переважання грибів, а до тринадцятого дня вміст бактерій мінімальний, що дозволяє нам припустити більш високу життєздатність грибної культури порівняно з бактеріальною.

Відзначено, що ряд інших культур (бактерії, цвілеві гриби), присутні в поодиноких кількостях, вони не здатні асимілювати жирову складову стоків і, мабуть, є аллохтонними для даного типу відходів. Найбільш високі показники засвоєння жирового субстрату мали ізольовані бактерії та гриби і, оскільки ці мікроорганізми були домінуючими контамінантами відходів і мали високу ліполітичну активність, необхідним етапом подальших досліджень було дослідження їх властивостей та з'ясування перспективності їх використання для біоконверсії жировмісної фази стоків.

### 3.1. Дослідження властивостей бактеріального ізоляту

У результаті вивчення морфологічних особливостей бактеріального штаму було виявлено, що це культура є ізоморфною. Клітини мають форму паличок, розмір яких становить 1,4 x 0,5 мкм (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Характеристики бактеріальної культури

Форма колонії	Кругла
Профіль колонії	Випуклий
Край колонії	Гладкий
Структура колонії	Випукла
Поверхня колонії	Кругла
Блиск та прозорість колонії	Блискуча
Консистенція колонії	Слизова, легко знімається з агару
Колір колонії	Безбарвна
Форма клітини	Палички
Розмір клітини	1,4 x 0,5 мкм
Взаємне розташування клітин	Окремі клітини
Грам-тип*	Позитивний
Наявність ендоспор**	Присутні

\* - дослідження грам-типу штаму проводилося методом Крегенса та традиційним забарвленням за Грамом;

\*\* - наявність ендоспор визначалося забарвленням методом Циля.

Також вивчено ступінь чутливості до антибіотиків, яку досліджували методом паперових дисків [52]. Встановлено, що бактеріальний штам є високочутливим до бензилпеніциліну, оксациліну та левоміцетину, причому найбільший вплив на мікроорганізми має останній.

Досліджено особливості росту бактеріального ізоляту на поживних середовищах, що містять глюкозу, рибу'ячий жир, жиромісну фазу стоків рибопереробки, що знаходилась у відстійниках один день (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Ростові характеристики бактерій при культивуванні в періодичних умовах

Джерело вуглецю	Тривалість лаг-фази, год	Питома швидкість росту, год <sup>-1</sup>	Максимальне накопичення біомаси, г/л
Глюкоза	7,5	0,04	2,45
Риб'ячий жир	23	0,09	1,8
Відходи 1-го дня	20	0,11	2,22

Отримані результати дозволяють говорити, що бактеріальний штам недоцільно використовувати для біодеградації жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств з метою отримання білкової біомаси, так як культура має низьку питому швидкість росту і вихід біомаси. Проведений аналіз одержаної біомаси при культивуванні на відходах 1-го дня показав, що даний продукт не становить цінності для подальшого використання (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Склад біомаси, одержаної при культивуванні бактерій на відходах 1-го дня

Сирий протеїн, %	23–25
Загальний жир, %	45–48
Вуглеводи, %	24–25,5
Нуклеїнові кислоти, %	0,4–0,7
Колір	сірий
Тест на токсичність	не токсична

Отримана біомаса має низький вміст білкових речовин, який не перевищує 25 %, що не дозволяє віднести описану бактеріальну культуру до високобілкових. Високий вміст жироподібних речовин показує, що субстрат утилізується не повністю, а споживається лише його легкозасвоювана частина.

### 3.2. Дослідження властивостей грибного ізоляту

У ході вивчення клітин грибного ізоляту, попередньо вирощеного на рідких та твердих середовищах різного складу, встановлено, що досліджувана культура гетерогенна за морфологією. Клітини відносно великі, сильно варіюють за розмірами та формою: є довгасті, витягнуті палички із закругленими кінцями та майже круглі клітини. У молодих культурах переважають клітини рівні, паличкоподібні, середній розмір  $13,8 \times 5,5$  мкм (рис. 3.1). У більш старих культурах клітини виявляють більшу різноманітність за формою та розмірами (зустрічаються клітини типу «чобіток»), особливо за несприятливих умов росту (рис. 3.2.)

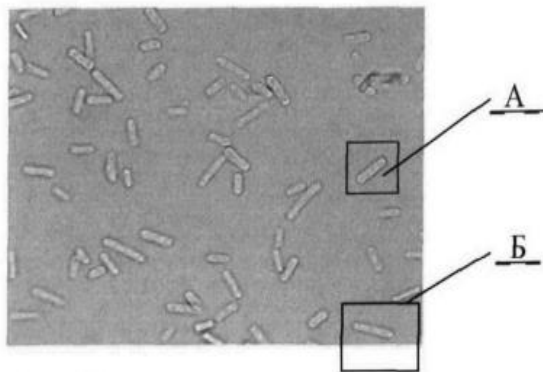


Рис. 3.1. Однодобова культура:

А – клітини із закругленими кінцями, Б – довгасті клітини

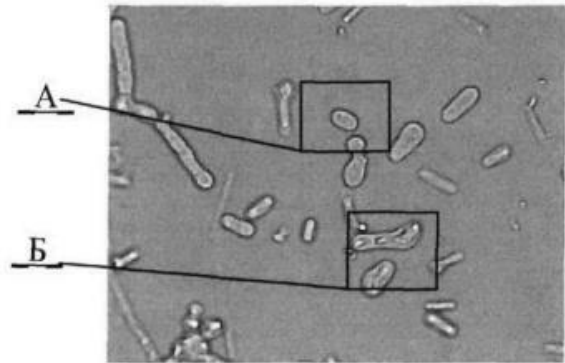


Рис. 3.2. 10-ти добова культура:

А – округла клітина, Б – клітина типу «чобіток»

У ході досліджень мікроморфології встановлено, що для цієї культури характерний як артричний (розпад міцелію на клітини), так і бластичний (брунькування) тип вегетативного розмноження. Причому брунькуються клітини по голобластичному механізму, іноді між клітинами утворюється широкий перешийок, тобто для досліджуваної культури характерний і поділ брунькуванням, що і обумовлює прямокутну форму клітин.

Також при вивченні автохтонних грибів різного віку було виявлено, що на певній стадії життєвого циклу після брунькування материнські та дочірні

клітини не роз'єднуються, а продовжують брунькуватися. В результаті виникають міцеліальні структури. Таким чином, для автохтонної культури характерне явище диморфізму: вид може рости у двох формах – одноклітинній та міцеліальній.

Для вивчення міцеліальних структур у цій роботі використовували пластинки з картопляним агаром, накриті покривним склом. При цьому спостерігалось бурхливе утворення міцелію. Встановлено, що досліджувана культура здатна утворювати як істинний, так і примітивний (що складається із клітин одного типу) псевдоміцелій. В аеробних умовах клітини утворювали типовий псевдоміцелій – границя між клітинами псевдоміцелію представлена їх вигнутими кінцями, кінцеві клітини більш короткі, ніж попередні, добре помітні перетяжки у зоні перегородок (рис. 3.4). Це типово дріжджове зчеплення. У мікроаерофільних умовах (під покривним склом) клітини більші, сильно варіюються за розміром, і при цьому переважає істинний міцелій (розділений простими септами): границя між клітинами – різко заломлююча світло пряма перегородка, кінцеві клітини довші, ніж попередні, немає перетяжок в зоні перегородок (рис. 3.3).

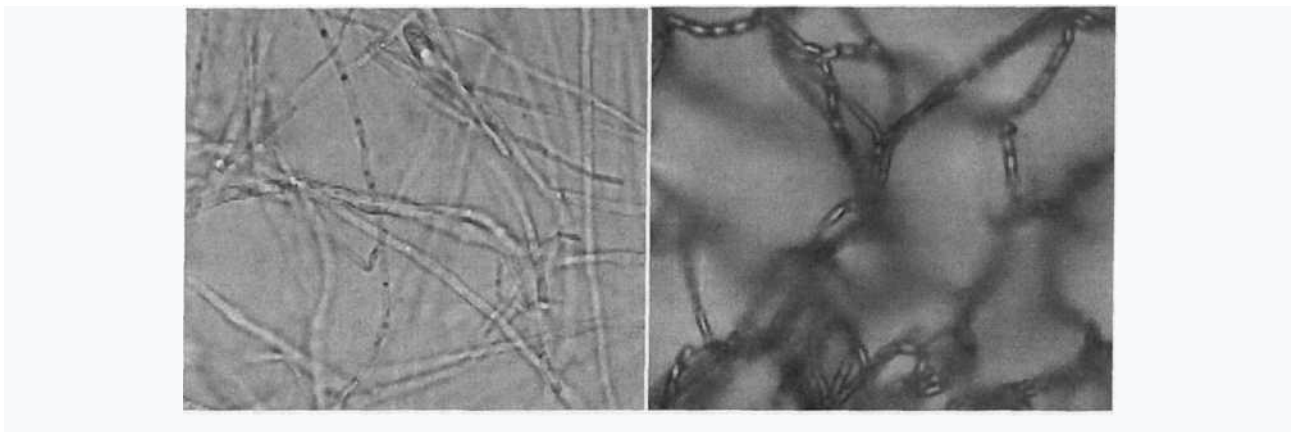


Рис. 3.3. Істинний міцелій

Рис. 3.4. Псевдоміцелій

Поряд із двома видами міцелію спостерігалось утворення в гіфах істинного міцелію з ділянок цитоплазми безстатевих ендогенних клітин, ендоспор: від великого істинного гіфа відходять пучки дрібнішого псевдоміцелію. Таким чином, було встановлено, що поряд з основними типами вегетативного

розмноження для досліджуваної автохтонної культури, характерне безстатеве розмноження за допомогою ендоспор, що говорить про плеоморфізм досліджуваної культури.

Для вивчення особливостей росту автохтонної культури на щільних середовищах проводилося культивування культури у чашках Петрі на сушло агарі. Посів проводився як штрихом, так і уколом.

В результаті досліджень колоній, що утворюються при вирощуванні на щільних середовищах, встановлено, що досліджувана культура характеризується швидким ростом, утворюючи сухі білі колонії з ворсинчастим краєм, який проглядається при просвічуванні (табл. 3.6).

Таблиця 3.6. – Характеристики грибного ізоляту

Форма колонії	Кругла, з фестончастим краєм
Профіль колонії	Горбистий
Край колонії	Неправильний
Структура колонії	Волокниста
Поверхня колонії	Шорстка
Блиск та прозорість колонії	Матова
Консистенція колонії	М'яка, легко знімається з агару
Колір колонії	Біла

За результатами дослідження морфологічних ознак життєвий цикл досліджуваної культури може бути описаний наступним чином: поодинокі клітини розмножуються брунькуванням або бруньковим поділом, на певному етапі клітини після вегетативного розмноження не роз'єднуються, а утворюють міцелій (істинний і псевдо), який знову розпадається на окремі артроспори або ж на ньому виникають безстатеві ендоспори. Статевих спор виявити не вдалося, що може пояснюватися кількома причинами. Можливо, що досліджувана культура гетероталлична і не вдалося підібрати потрібний тип спарювання, чи статевий процес може запуститися лише за певних умов оточуючого

середовища, також можливо, що здатність досліджуваного виду до статевого розмноження було втрачено під час еволюції.

При дослідженні фізіологічних ознак культури встановлено, що грибний ізолят не здатний до зброджування цукрів; засвоює широкий спектр безазотистих джерел вуглецю шляхом їх окиснення в аеробних умовах та синтезує всі необхідні для росту вітаміни; найкраще росте на середовищах, що містять як джерело азоту солі амонію; здатний до росту при підвищеному осмотичному тиску середовища, створюваному глюкозою (до 300 г/л), але не розвивається при вмісті натрію хлориду в поживному середовищі понад 20 г/л.

Оскільки досліджувана культура була виділена з жировмісної фази стоків, було проведено також вивчення характеру споживання жирів та їх компонентів. Як основне джерело вуглецю були обрані: вища гранична карбонова кислота – стеаринова, вища ненасичена карбонова кислота – олеїнова, багатоатомний спирт – гліцерин, оскільки жир, що міститься у стічних водах рибопереробних підприємств, є складним і неоднорідним субстратом.

В результаті досліджень було встановлено, що максимальне накопичення біомаси – 13,96 г/л – досягається при культивуванні на гліцерині, питома швидкість росту при цьому становить 0,03 год<sup>-1</sup>. При рості на стеариновій кислоті культура накопичує до 6,86 г/л біомаси, проте питома швидкість росту в цьому випадку вища і дорівнює 0,04 год<sup>-1</sup>. Найменший ріст спостерігається на олеїновій кислоті (4,8 г/л), але при цьому питома швидкість росту максимальна і становить 0,18 год<sup>-1</sup>.

Для повного опису автохтонного гриба потрібно було визначити деякі біохімічні ознаки, які широко використовуються у діагностичній практиці. При цьому виявлено, що культура уреазонегативна; добре росте на середовищі з желатином, не розріджуючи його; має ліполітичну активність; культура не утворює органічних кислот, ефірів та крохмалеподібних сполук.

У результаті проведених досліджень щодо визначення морфологічних, фізіологічних та біохімічних властивостей автохтонної культури було складено схему стандартного опису мікроорганізму (табл. 3.7).

Таблиця 3.7 – Схема стандартного опису автохтонної культури

<p>1) Ріст на рідких поживних середовищах</p>	<p>Досліджуваний штам гетерогенний по морфології. Клітини великі (13,75 x 5,5 мкм), сильно варіюють розмір і форма: є довгасті, витягнуті палички із закругленими краями та майже круглі клітини. Для автохтонної культури характерний як артричний (розпад міцелію на артроспори), так і бластичний типи вегетативного розмноження. Причому клітини здатні як до голобластичного брунькування так і до поділу.</p> <p>У рідкому середовищі ця культура росте у вигляді плівки. Плівка – ворсиста, біла, щільна, товста.</p>
<p>2) Ріст на твердих поживних середовищах</p>	<p>Спостерігається менша гетерогенність по морфології, ніж при культивуванні на рідких середовищах. Клітини великі, переважно витягнуті, овальні, округлих менше. У 30-добових культурах клітини зменшуються у розмірах, проявляється більший плеоморфізм. Характеристика гігантської колонії: колонія біла, матова, легко знімається з агару, формою – кругла з фестончастим краєм, профіль колонії – бугристий, край – неправильний. Також колонія має волокнисту структуру та шорстку поверхню.</p>
<p>3) Ріст на пластинках з картопляним агаром</p>	<p>Спостерігається бурхливе утворення міцелію. Зустрічається як істинний, так і псевдоміцелій. В аеробних умовах клітини утворюють типовий псевдоміцелій. У мікроаерофільних умовах</p>

	переважає справжній міцелій. Зустрічаються безстатеві ендоспори.
4) Утворення балістоспор	Не виявлено.
5) Утворення хламідоспор	Не виявлено.
6) Опис життєвого циклу	Одиночні клітини розмножуються брунькуванням або бруньковим поділом, на певному етапі клітини після вегетативного розмноження не роз'єднуються, а утворюють міцелій (істинний і псевдо), який знову розпадається на окремі артроспори або ж на ньому виникають безстатеві ендоспори. Статеву спори виявити не вдалося.
7) Утворення цукрів	Відсутнє.
8) Асиміляція джерел вуглецю	Було встановлено, що досліджувана культура здатна споживати широкий спектр джерел вуглецю. Хороший ріст зафіксовано при асиміляції глюкози, сахарози, фруктози, ксилози, маннози, лактози, сорбіту, інуліну, етанолу, гліцерину, стеаринової, олеїнової та молочної кислот. Повільний ріст характерний для даного штаму при споживанні як єдине джерело вуглецю арабінози, мальтози, галактози, яблучної кислоти, ацетату натрію тощо.
9) Асиміляція джерел азоту	Для даного штаму не характерний ріст на середовищі з нітратом калію як єдиного джерела азоту, тобто культура є нітрат-негативною. Хороший ріст спостерігається на середовищі, що містить амонійний азот.

10) Ріст в середовищі без вітамінів	Цей штам добре росте в безвітамінному середовищі, а отже, здатний сам синтезувати всі необхідні для росту вітаміни.
11) Ріст на середовищах з високим осмотичним тиском	Ріст культури можливий: при концентрації глюкози не вище 300 г/л, при концентрації натрію хлориду не вище 20 г/л.
12) Ріст при різних температурах	Ріст можливий в інтервалі температур від 4 до 42 °С. Оптимальна температура розвитку даної культури: 28–32 °С.
13) Виділення крохмалоподібних з'єднань	Культура не утворює крохмалоподібних сполук.
14) Гідроліз сечовини	Культура уреазонегативна.
15) Розрідження желатини	Культура добре росте на середовищі з желатином, не розріджуючи його.
16) Асиміляція жиру	Дана культура є автохтонною для жировмісної фази стоків рибопереробної промисловості, вона має високу ліполітичну активність, добре гідролізує жирові субстрати.
17) Утворення органічних кислот	Кислотоутворення при вирощуванні даного штаму на крейдяному агарі не виявляється.
18) Утворення ефірів	Утворення ефірів при культивуванні даного штаму немає.

Отримані морфологічні характеристики автохтонної культури спочатку дозволили припустити, що цей мікроорганізм належить до одного з наступних родів: *p. Geotrichum* або *p. Trichosporon*.

Із літературних даних відомо, що мікроорганізми, об'єднані у *p. Geotrichum* відносяться до анаморфних аскоміцетових дріжджових організмів. Клітини мікроорганізмів цього роду великі, циліндричні (рис. 3.6), здатні

утворювати рясний істинний міцелій, що розпадається на артроспори (рис. 3.7, 3.8). Іноді на міцелії утворюються безстатеві ендоспори.

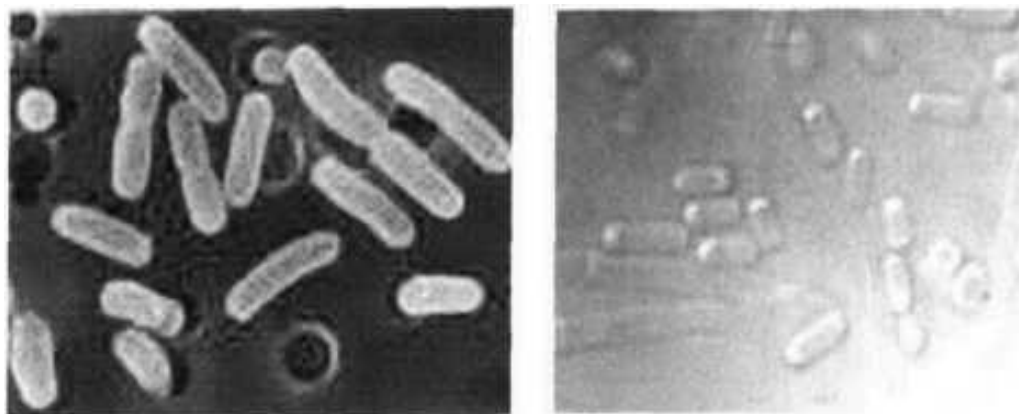


Рис. 3.6. Вид клітин, типовий для представників р. *Geotrichum*, [54]

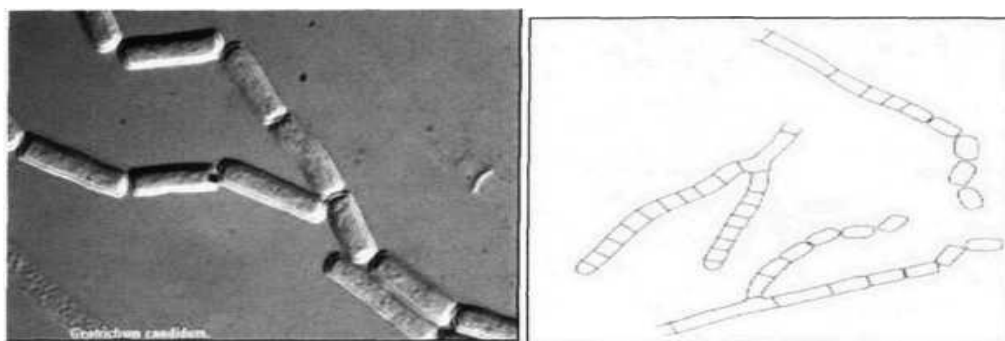


Рис. 3.7. Міцелій *G. Candidum*, [54]

Рис. 3.8. Міцелій *G.drawing*, [54]

У свою чергу дріжджові організми р. *Trichosporon* відносяться до анаморфних базидіоміцетових дріжджів [54]. Клітини мають циліндричну форму. Утворення істинного міцелію з артроспор, на якому можуть утворюватися ендоспори, також характерно для представників р. *Trichosporon* (рис. 3.9).

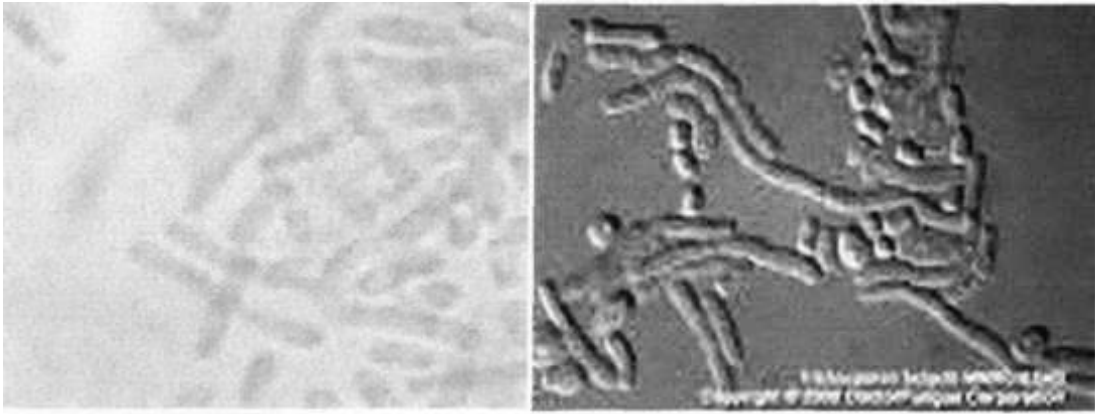


Рис. 3.9. Вид клітин, типовий представників р. *Trichosporon*, [54]

З літературних даних [54] відомо, що *Geotrichum sp.* відрізняються від *Trichosporon sp.* відсутністю уреазної активності. Оскільки при вивченні біохімічних ознак автохтонної культури було встановлено, що дана культура уреазнегативна, можна припустити, що досліджувана культура належить до дріжджоподібних грибів *Geotrichum sp.*

### **3.3. Біоконверсія жировмісної фази стоків рибопереробки з використанням виділеного штаму гриба *Geotrichum sp.***

У ході дослідження біоконверсії жировмісної фази стоків рибопереробки з використанням грибного ізоляту культивування здійснювали в лабораторному ферментері на середовищі, що містить жирові відходи (20 г/л) з різними термінами зберігання у шламозбірнику (1–13 днів). Дослідження грибного ізоляту виявили високу активність екзоліпази (120 од./мг АСБ) та ендоліпази (68 од./мг АСБ). Ростові характеристики *Geotrichum sp.* при культивуванні на жирових відходах у періодичних умовах представлені у табл. 3.8.

Аналіз складу біомаси, отриманої після культивування на відходах різного «віку», наочно показує, що культура аборигенних дріжджів може бути використана в процесі біодеградації жировмісної фази стоків рибопереробної промисловості з метою отримання кормової добавки, причому у разі використання свіжих відходів отримана біомаса може бути віднесена до високобілкових, оскільки вміст білка досягає 45 %.

Таблиця 3.8 – Ростові характеристики *Geotrichum sp.* при культивуванні на жирових відходах в періодичних умовах

Характеристика	Термін зберігання відходів у шламозбірнику, діб		
	1	5	13
Тривалість культивування, год	46	72	82
Швидкість росту, год <sup>-1</sup>	0,10	0,06	0,04
Максимальне накопичення біомаси, г/л	13,5	9,1	6,4
Вихід біомаси, г/г	0,68	0,46	0,37
Склад біомаси, %			
– білок	44 – 45	28 – 29	19 – 20
– сирий протеїн	53 – 55	34 – 35	23 – 25
– загальний жир	11,0 – 12,5	15,3 – 19,7	25,0 – 26,5

При дослідженні різних режимів культивування гриба за показниками якості одержуваної біомаси, був зроблений висновок про перевагу глибинного гетерофазного культивування в періодичному режимі. Проте, цей режим нерентабельний за економічними показниками. Інші режими культивування (з підживленням субстрату, доливний, безперервний) призводили до значного збільшення вмісту ліпідів та зниження кількості білка в кінцевому продукті. Це дозволяє рекомендувати виділений ізолят грибів для одержання мікробних ліпідів (табл. 3.9).

Таблиця 3.9 – Характеристика режимів культивування та отриманих біомас *Geotrichum sp.*

Характеристика	А	Б	В	Г	Д
Тривалість лаг-фази, год	3	3	3	3	72
Швидкість росту, год <sup>-1</sup>	0,10	0,06	0,10	0,10	0,01
Тривалість культивування, год	46	80	–	–	432

Максимальне накопичення біомаси, г/л	13,5	24,1	12,1	12,1	4,5
Склад біомаси, %					
– сирий протеїн	53–55	33–35	40–42	39–41	сліди
– білок	44–45	28–29	36,0–37,5	35–37	сліди
– загальний жир	11,0–12,5	28–30	22–24	25–27	90–95

А – періодичне глибинне гетерофазне культивування;

Б – глибинне гетерофазне культивування з підживленням субстрату;

В – відокремлено-доливне культивування з відбиранням 10 %;

Г – безперервне культивування зі швидкістю протікання 0,1 год<sup>-1</sup>;

Д – твердофазне культивування.

### **3.4. Технологічна схема біоконверсії жиромісної фази стоків рибопереробних підприємств у дріжджову біомасу кормового призначення**

На основі проведених досліджень розроблено принципову технологічну схему біоконверсії жиромісних відходів рибопереробки у дріжджову біомасу кормового призначення.

Технологічна схема передбачає:

- використання адаптованого до субстрату мікроорганізму. Адаптація посівного матеріалу включає селекцію дріжджів щодо їх стійкості до дії перекису водню та пристосованості до утилізації відходів, що зберігаються в шламосбірнику;

- попередню обробку поживного середовища для диспергування жиру;

- стадію ферментації в безперервному або відбірно-доливному режимі;

- концентрування біомаси методом відстоювання та сушіння на стрічковій сушарці.

Графічне зображення технологічної схеми подано на рис. 3.10.

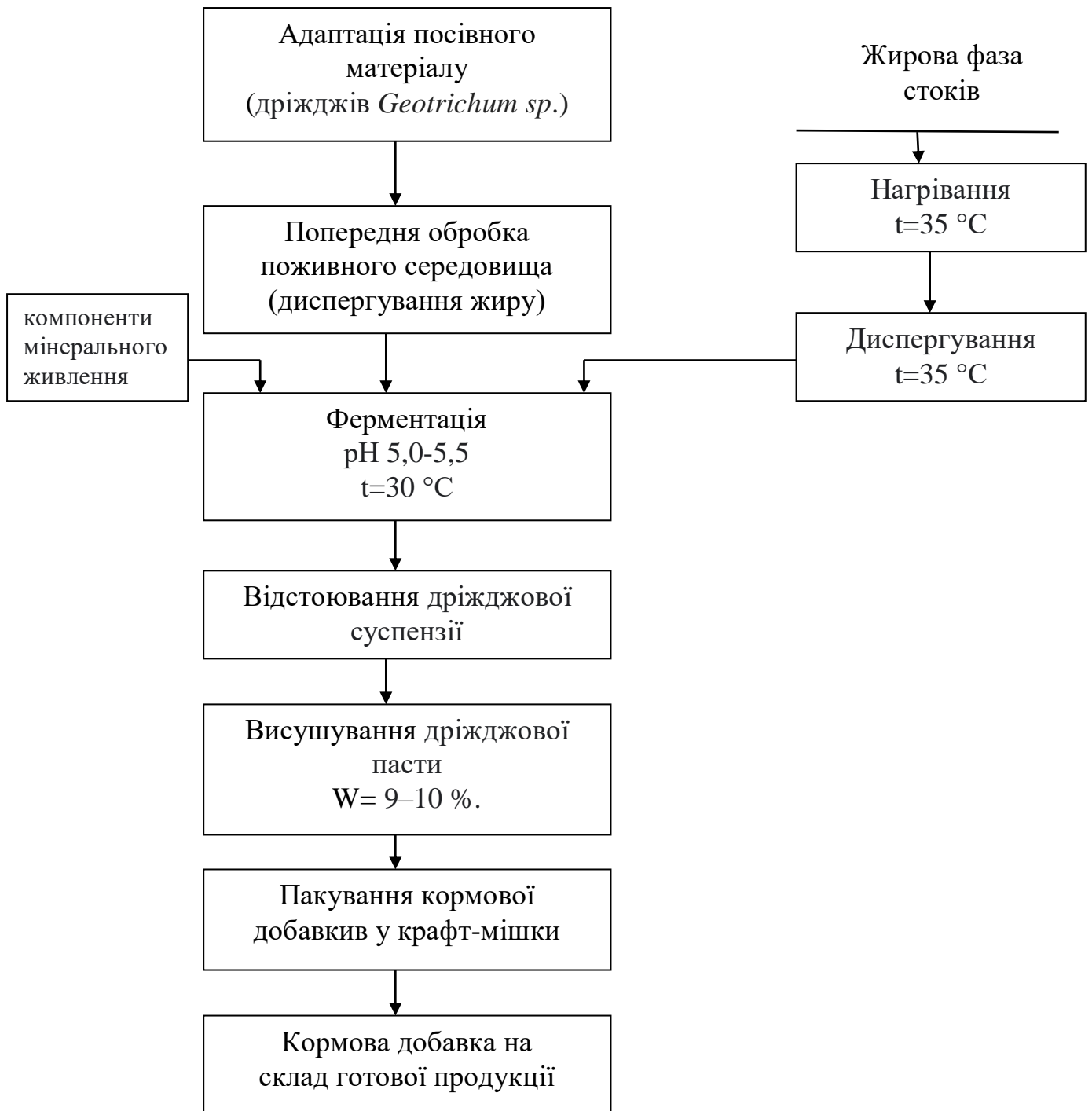


Рис. 3.10. Технологічна схема біоконверсії жировмісної фази стоків рибопереробних підприємств у дріжджову біомасу кормового призначення

Вищезазначений варіант сушіння обраний тому, що це один із самих ефективних та дешевих варіантів, який дозволяє також використовувати різні наповнювачі для стандартизації та отримання товарних форм продукту. Як наповнювач може бути використана пивна дробина, яка утворюється у великій кількості на пивоварних заводах.

Розроблена технологія передбачає здійснення селекції культури дріжджів *Geotrichum sp.* щодо субстрату (жирових відходів рибопереробки) в рамках лабораторії та подальше культивування в інокуляторах різного об'єму.

Основний процес проходить у ферментаторах. При цьому підтримують рН в інтервалі 5,0–5,5. Температуру в ферментаторі підтримують на рівні 30 °С. Для приготування поживного середовища у ферментатор подаються всі необхідні компоненти мінерального живлення. Розчин поживних солей та жирових відходів готуватися в ємностях та подається в установку безперервної стерилізації, де стерилізується. Після чого поживне середовище проходить через теплообмінник, рекуператор і холодильник, де охолоджується до температури 35 °С, проходить диспергування і подається в ферментер.

Дріжджова суспензія надходить у відстійник. Паста, одержувана у процесі відстоювання, із вмістом 15,8 % АСБ, надходить на стрічкову сушарку, де підсушується до залишкової вологості 9–10 %.

Отриманий висушений матеріал надходить у шнековий змішувач, а звідти в автоматичний ваговий дозатор, де запаковується в крафт-мішки, які прямують на склад готової продукції або безпосередньо до споживачів.

## РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

### 4.1 Правила безпеки роботи в лабораторіях мікробіологічного профілю

При виконанні робіт в лабораторії на працюючих можуть впливати небезпечні та шкідливі виробничі фактори [55]:

– біологічні (мікроорганізми: бактерії, віруси, рикетсії, спірохети, хламідії, гриби; гельмінти, найпростіші тощо, а також продукти їх життєдіяльності; макроорганізми: тварини, людина і продукти її життєдіяльності; культури клітин і тканин, генетичні фрагменти, діагностичні препарати тощо);

– хімічні (реактиви, дезінфекційні засоби, канцерогенні, подразнюючі, сенсibiliзуючі, мутагенні, алергенні та інші речовини);

– механічні: виробниче обладнання (обладнання, що працює під тиском, центрифуги, лабораторне скло, ріжучий, колючий інструментарій, гострі краї, задирки та ін.);

– фізичні (електричний струм, ультрафіолетове, електромагнітне випромінювання, недостатня освітленість, відхилення вологості і температури робочої зони від встановлених норм, підвищена (занижена) рухомість повітря, підвищений вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони, підвищений шум, гаряча вода та пара);

– людські (нервово-психічні, фізичні (перевантаження персоналу), акти вандалізму тощо);

– пожежонебезпека.

Лабораторія повинна бути забезпечена водопроводом, каналізацією, електрикою, засобами зв'язку, вентиляцією, опаленням, газифікована [55].

Приміщення мікробіологічних лабораторій, в яких проводять роботу з біологічними патогенними агентами (БПА) III–IV груп безпеки, за ступенем безпеки для персоналу діляться на дві зони: "заразну" та "чисту". Дозволяється проведення одночасної роботи з різними видами збудників в одній бактеріологічній кімнаті, якщо це викликано виробничою необхідністю, при цьому біологічна безпека забезпечується

виконанням вимог, що пред'являються до роботи з найбільш небезпечним видом [54].

Після закінчення роботи з БПА, об'єкти з посівами переносять у сховища (сейфи, холодильники, термостати, шафи і т. п.) і опечатують їх. Двері кімнат запираються на замок. Проводять дезінфекцію робочих поверхонь в приміщенні, обробляють руки 70 град. етиловим спиртом. Проводять вологе прибирання і вмикають на 60 хвилин бактерицидні лампи.

Об'єкти з культурами збудників зберігають за окремими групами в металевих водостійких ємкостях зі щільно закритими кришками, які поміщають в холодильники або залізні шафи (сейфи). Ємкості та сховища повинні бути опечатані.

Вакцинні штами зберігають окремо від патогенних. Забороняється зберігати в одному холодильнику живі культури мікроорганізмів і діагностичні, лікувальні препарати або реактиви.

Облік БПА в лабораторії ведуть в журналах за затвердженими формами. Журнали повинні бути пронумеровані, прошнуровані, скріплені печаткою і зберігатися у фахівця, який відповідає за їх ведення.

В кожній лабораторії повинні бути складені власні Правила техніки безпеки і протиепідемічного режиму, які враховують специфічні умови роботи, характерні для даної лабораторії, затверджені керівником установи і вивішені на помітному місці в лабораторії. З ними повинні бути ознайомлені усі працівники лабораторії.

Весь персонал лабораторії повинен бути навчений надавати першу допомогу працівникам при аварії або нещасному випадку [55].

**Вимоги до приміщень.** Лабораторії не можна розташовувати в цокольному поверсі, в житлових будинках і приміщеннях [55].

Категорично забороняється розташування в приміщенні лабораторії інших підрозділів, сторонніх установ та організацій.

Лабораторії розташовують, як правило, в окремому будинку з 2-ма входами або в ізольованій частині будинку. На вхідних дверях повинні

бути позначені: назва лабораторії і міжнародний знак "Біологічна небезпека", графік роботи лабораторії. Двері повинні мати кодові замки. Всі приміщення лабораторії повинні бути непроникними для гризунів та комах.

Виробничі лабораторії, що працюють ізБПА III–IV груп небезпеки повинні розташовуватись у окремих будівлях, не пов'язаних з виробничими приміщеннями, або ізольованому блоці з окремим входом.

Виробничі лабораторії, що працюють із БПА IV групи небезпеки можуть розташовуватись в ізольованому блоці виробничого корпусу.

Діагностичні лабораторії, що поводять дослідження із БПА III–IV груп небезпеки повинні мати 2 входи: перший для персоналу, другий для прийому матеріалу для дослідження (дозволяється прийом через передаточне вікно).

У лабораторіях дослідних установ, що проводять експериментальні дослідження з БПА III–IV груп небезпеки, а також у виробничих – дозволяється один вхід. Вікна цокольного і першого поверхів, незважаючи на наявність охоронної сигналізації, закривають металевими решітками, що не порушують правил пожежної безпеки.

*Опалення та вентиляція.* Приміщення лабораторії повинні мати центральне опалення. Температура повітря в лабораторних кімнатах повинна підтримуватись у межах 18-20 °С. В умовах жаркого клімату в робочих кімнатах та боксах встановлюються кондиціонери. Під час роботи з біологічним матеріалом їх вимикають. Для лабораторій мікробіологічного профілю слід передбачати окремі системи припливно-витяжної вентиляції, які відповідають ДБН В.2.5-67:2013 "Опалення, вентиляція та кондиціонування", ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень». В усіх лабораторіях, що будуються або реконструюються, необхідно передбачити обладнання автономної припливно-витяжної вентиляції з встановленням фільтрів тонкого очищення повітря, що викидається з "заразної" зони (або обладнання цих приміщень боксами біологічної безпеки). Магістральні короби припливно-витяжної

вентиляції, електричних, водопровідних, каналізаційних мереж розміщуються у спеціальних нішах коридорів, щоб забезпечити вільний доступ до них під час профілактичного огляду та ремонту [55].

*Водопровід та каналізація.* Приміщення лабораторії повинні бути обладнані водопроводом з гарячою і холодною водою та каналізацією відповідно до ДБН В.2.5-64:2012 «Внутрішній водопровід та каналізація. Частина I. Проектування. Частина II. Будівництво. Зі Зміною № 1».

Усі лабораторні кімнати обладнуються водопровідними раковинами зі змішувачами холодної та гарячої води для миття рук персоналу, які розміщують біля виходу. Бажано, щоб крани відкривалися за допомогою ліктів. Безпосередньо біля раковини встановлюють пристрої, в яких повинні постійно знаходитися засоби для дезінфекції рук і миючі засоби.

Висушування рук проводиться електрорушниками або рушниками разового користування.

Санітарно-технічні прилади, обладнання, крани, раковини, унітази тощо повинні знаходитись у справному стані, систематично чиститись від іржі та інших нашарувань, не мати тріщин та інших дефектів. Несправні прилади підлягають терміновій заміні.

Місця біля раковин, інших санітарно-технічних приладів, а також обладнання, експлуатація якого пов'язана зі зволоженням стін, облицьовують глазурованою плиткою або іншими вологостійкими матеріалами.

*Освітлення.* Усі приміщення лабораторії повинні мати природне та штучне освітлення, яке відповідає вимогам ДБН В. 2. 5. 28– 2006 «Природне і штучне освітлення» та ДСН 3.3.6.042-99. Для окремих кімнат (термальна, бокс для досліджень на стерильність, фотолабораторія та інші) допускається відсутність природного освітлення. У кожній кімнаті повинен бути загальний вимикач. Світильники і арматура повинні бути закритого типу і доступні для вологої обробки.

Якщо вікна орієнтовані на південь необхідно передбачити захист робочих столів від попадання прямого сонячного світла шляхом використання світлозахисних плівок, жалюзі з матеріалу, стійкого до дезінфектантів [55].

*Стіни.* Поверхня стін у лабораторних приміщеннях повинна бути водостійкою, легко митися; на висоту 1,5 м стіни облицьовують глазурованою плиткою або фарбують олійною фарбою світлих тонів; у автоклавних, боксах, віварії – на всю висоту – світлою глазурованою плиткою або іншими облицьовувальними матеріалами, дозволеними МОЗ України для цієї мети.

*Підлога* в лабораторних приміщеннях має бути гладкою, легко митися, стійка до дії деззасобів, при цьому покриття не повинно бути слизьким.

*Ширина основних проходів* до робочих місць або між двома рядами обладнання має бути не менше 1,5 м з урахуванням виступаючих конструкцій.

*Двері* всіх виробничих приміщень повинні бути гладкими, без виступів. Вікна і двері приміщень "заразної" зони повинні бути герметичними.

Лабораторії, в яких проводять роботу з БПА, повинні мати такий основний набір приміщень:

«Заразна» зона:

- приміщення для забору проб;
- приміщення для прийому, реєстрації матеріалу і видачі результатів досліджень;
- боксовані приміщення або приміщення, оснащені боксами біологічної безпеки;
- бокси для проведення санітарно-бактеріологічних досліджень;
- кімната для обробки і первинного посіву біологічного матеріалу (посівна);
- робочі кімнати (бокси) для бактеріологічних, серологічних, вірусологічних, паразитологічних досліджень;
- кімната для люмінесцентної мікроскопії;

- кімната для проведення зоентомологічних робіт;
- блок для роботи із зараженими тваринами;
- автоклавна для знезараження матеріалу;
- термостатна (може не бути).

«Чиста» зона:

- кімната (гардероб) для верхнього одягу;
- кімната для надягання робочого одягу;
- приміщення для підготовчих робіт (препараторська, мийна, кімната для приготування поживних середовищ з боксом для розливу середовищ);
- стерилізаційна;
- приміщення з холодильною камерою або холодильниками для зберігання поживних середовищ та діагностичних препаратів;
- кімната для приймання їжі, відпочинку;
- кімната для адміністративної роботи, для роботи з літературою;
- душова;
- туалет для персоналу;
- кладові.

Приміщення мікробіологічних лабораторій, де проводять роботу із БПА, обладнуються ультрафіолетовими опромінювачами.

В лабораторних приміщеннях повинно бути чисто, заборонено присутність будь-яких об'єктів, що не мають відношення до роботи.

В "заразній" зоні лабораторії забороняється:

- зберігати особистий одяг та взуття, зонти, продукти харчування, косметику;
- палити, зберігати і приймати їжу, пиття;
- зберігати будь-які речовини невідомого походження;
- пробувати на смак і вдихати невідомі речовини;
- проводити інші види робіт та вирощувати квіти у вазонах;
- працювати без спеціального або санітарного одягу і засобів індивідуального захисту;

- сушити будь-що на опалюваних приладах;
- захищати проходи, коридори, підходи до засобів пожежогасіння.

**Вимоги до апаратури, меблів та обладнання.** Лабораторія повинна мати обладнання та засоби вимірювальної техніки – (ЗВТ), що необхідні для проведення досліджень. На кожен одиницю обладнання, що використовується, має бути паспорт підприємства виробника: розроблена, затверджена керівником установи та вивішена на робочому місці інструкція з експлуатації, з урахування вимог біологічної безпеки.

Обладнання та ЗВТ повинні відповідати вимогам нормативних документів на методи досліджень, що проводить лабораторія і утримуватися умовах, що забезпечують їх зберігання, захист від пошкоджень та передчасного зношування.

Столи, на яких проводяться мікроскопічні дослідження при денному освітленні, повинні розміщуватись біля вікон.

Лабораторні меблі повинні бути з пластиковим покриттям або пофарбовані олійною (емалевою) фарбою світлих тонів. Лабораторні стільці повинні мати гігієнічне покриття, що добре миється. Внутрішні та зовнішні поверхні меблів повинні бути гладкими, без щілин та пазів, що утруднюють обробку знезаражуючими речовинами.

Робочі поверхні столів повинні бути із водонепроникного, кислотолужностійкого, незгораючого матеріалу, який не псується від обробки вогнем та дезінфікуючими розчинами. Стандартна ширина робочої поверхні 76 см.

Обладнання лабораторії повинно бути таким, щоб попередити (обмежити) контакт між працюючим та інфекційним агентом, виготовлене з матеріалів непроникних для рідин, стійких до корозії, міцним, не мати гострих країв, шорсткості, незакріплених деталей.

Газові пальники повинні утримуватися в чистоті та порядку, для чого їх періодично розбирають і чистять; мати справні крани і м'які з'єднуючі шланги, що не допускають проникнення газу до приміщення.

Центрифугу розміщують так, щоб працівник був в змозі бачити і правильно розміщувати на її дні стакани.

Термостати і термостатні кімнати дезінфікують не рідше одного разу на місяць.

Обробку їх здійснюють тільки при вимкненні із мережі.

При експлуатації термостата персоналу лабораторії забороняється:

– ставити в термостат легкозаймисті речовини;

– самостійно знімати запобіжні ковпаки з регулюючого обладнання.

***Вимоги до застосування засобів захисту працюючих.*** Персонал лабораторій забезпечується медичними халатами, піжамами (комбінезонами), шапочками, змінним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту залежно від характеру робіт, що виконуються, згідно діючих галузевих норм.

Спеціальний одяг, взуття та інші засоби індивідуального захисту повинні відповідати характеру та умовам роботи, забезпечувати безпеку праці, підбиратися індивідуально для кожного працівника, закріплюватися за ним і зберігатися окремо від особистого одягу.

Спеціальний одяг підбирається таким чином, щоб краї подолу та рукавів повністю закривали власний одяг. Взуття повинно бути з таких матеріалів, що легко миється та обробляється. Забороняється носити взуття із тканини та з відкритим носком.

Зміна робочого одягу повинна проводитись в міру забруднення, але не рідше ніж 1 раз на тиждень.

Для роботи в боксі, крім основного спецодягу, необхідно мати стерильний комплект: халат, шапочку, маску, гумові рукавички, бахіли, які зберігаються у передбокснику. Оптимальним є використання одноразового стерильного одягу.

**Вимоги до організації роботи.** Час безперервної роботи з біологічним матеріалом обмежується 3–4 годинами, після чого встановлюється годинна перерва. При необхідності проведення термінових досліджень ця перерва скорочується до 30 хвилин. Дослідження в нічний час здійснюються тільки при екстремальних ситуаціях.

Всі роботи з біологічним матеріалом I–III груп патогенності, а також зараження тварин, проводять з дотриманням принципу парності (не менше двох осіб, один з яких – лікар або науковий співробітник). Робота у вечірній, нічний час, у вихідні та святкові дні проводиться за письмовим дозволом керівника установи при умові дотримання позмінної роботи й наявності двох осіб.

При необхідності короткочасного (до 10 хв) виходу з робочої кімнати (боксу) працівник може залишити об'єкти з БПА на столі (в боксі безпеки), якщо в кімнаті залишається інший працівник або двері кімнати закриваються на замок.

Забороняється викликати працівників від робочого місця під час виконання ними будь-якого виду роботи з БПА.

Прийом відвідувачів, суспільна робота, зберігання і приймання їжі і пиття, паління і застосування косметичних засобів дозволяються тільки в спеціально відведених приміщеннях.

Для попередження перевтоми та пошкодження зору під час роботи з мікроскопом та іншими оптичними приладами необхідно: забезпечити правильне освітлення поля зору; проводити мікроскопію то одним, то другим оком, не закривати непрацююче око; через кожні півгодини роботи влаштовувати перерви по п'ять хвилин.

## **4.2 Вимоги безпеки при виконанні робіт в мікробіологічних лабораторіях**

*Загальні правила безпеки.* Кожен працівник лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг, який зберігається в індивідуальних шафах, окремо від верхнього одягу.

Тип захисного костюма і частота його зміни визначаються залежно від характеру роботи.

В спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторних приміщень (адміністративні, побутові приміщення тощо).

При роботі зі скляними приладами необхідно:

– захищати руки рушником при зборі скляних приладів або з'єднанні окремих частин їх за допомогою каучуку або гуми; при розламуванні скляних трубок притримувати лівою рукою трубку біля надпилу;

– при закриванні колби, пробірки або іншої тонкостінної посудини пробкою тримати посудину за верхню частину шийки ближче до місця, куди повинна бути вставлена пробка, захищаючи руку рушником;

– оплавляти і змочувати водою кінці трубок і паличок до одягання каучуку; при плавленні кінців трубок і паличок користуватися тримачами.

Щоб уникнути травмування при різанні скляних трубок, складанні і розбиранні скляних приладів додержуються таких заходів безпеки:

а) скляні, трубки невеличкого діаметра ламають після підрізки їх напилком, попередньо захистивши руки рушником;

б) при вставленні скляних трубок у гумові пробки або шланги (при складанні приладів) попередньо змочують зовні скляну трубку і внутрішні краї шлангу або отвір у пробці водою, гліцерином або вазеліновою олією.

Гострі краї скляних трубок оплавляють. В усіх випадках руки захищають рушником;

в) збирають скляні прилади і деталі в місцях, обладнаних підкладками (піноуретан, гума тощо);

г) при вставленні скляних трубок або термометра в просвердлену пробку останню не впирають в долоню, а тримають за бічні сторони. Трубку або термометр тримають якнайближче до кінця, що вставляється в пробку. При можливості скляний посуд і скляні частини заміняють пластиковими.

Нагріту посудину не можна закривати притертою пробкою, поки вона не охолоне.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

Великі хімічні склянки з рідиною піднімають тільки двома руками так, щоб відігнуті краї стакана спиралися на вказівні пальці.

При закупорюванні пробками посудин із реактивами враховують їх властивості. Гумові пробки сильно набухають під дією деяких реактивів (спирт, бензол, ацетон, ефір), а під дією галогенів (бром, йод) втрачають еластичність. Такі реактиви краще закупорювати скляними притертими пробками. Луг не можна закупорювати притертою пробкою, тому що карбонати, що утворюються між пробкою і горлом, щільно заклинюють пробку.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При змішуванні (розведенні) речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

Нагрівання сильнодіючих отруйних речовин проводять тільки в круглодонних колбах і не на відкритому вогні.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

– всю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

– концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;

– при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім помалу додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;

– при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями. Щоб запобігти розігріванню розчину, при приготуванні розчинів лугів, посуд попередньо поміщають у водяну баню;

– розбивання великих шматків їдкого лугу на дрібні роблять користуючись захисними фартухом і рукавичками, у спеціально відведеному місці, при цьому розбиті шматки накривають бельтингом або іншим матеріалом;

– концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації;

– бутлі з кислотами, лугами й іншими їдкими речовинами переносять удвох у спеціальних ящиках (кошиках) або перевозять на спеціальному візку, попередньо перевіривши цілісність тари;

– при кип'ятінні кислотних і лужних розчинів не можна щільно закривати посуд (пробірки і колби) пробкою до повного їх охолодження;

– при митті посуду хромовою сумішшю запобігають попаданню її на шкіру, одяг, взуття.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт і ін.) дотримуються таких вимог:

– усі роботи проводяться у витяжній шафі при включеній вентиляції, вимкнутих газових пальниках;

– нагрівання легкозаймистих речовин проводять у витяжній шафі на піщаній або водяній бані з закритим електронагрівом. Категорично забороняється:

– доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;

– під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

– привести в порядок робоче місце;

– залишки шкідливих речовин здати на зберігання;

– старанно вимити руки з милом, рот прополоскати водою.

Категорично забороняється збереження в лабораторії несправних або розбитих апаратів зі ртуттю.

При роботі з БПА, реактивами заборонено торкатися обличчя, рота, носу, очей руками. При роботі з БПА виконують такі вимоги:

– працюють з БПА користуючись інструментом (петлею, пінцетом, ножицями тощо). Забороняється торкатися досліджуваного матеріалу руками;

– перед використанням посуду, піпетки, обладнання, шприци тощо повинні бути перевірені на цілісність і справність;

– усі технічні маніпуляції проводять таким чином, щоб уникнути виникнення аерозолів;

– пробки матраців, флаконів, пробірок відкривають тільки над полум'ям пальника. БПА вносять в посудини так, щоб не інфікувати горловину посудини. Краї отворів посудин прожарюють над полум'ям пальника і закривають пробками. Забороняється переливання рідких культур і матеріалу, що досліджується;

– при піпетуванні користуються піпетками з грушами, дозаторами або автоматичним обладнанням. Кінець піпетки завжди повинен бути нижче рівня рідини в посудині або рідина з піпетки повинна стікати по внутрішній стінці посудини;

– обов'язкова наявність ватної пробки у тупому кінці піпетки, що дозволяє уникнути можливості контамінації;

– інфекційний матеріал не слід перемішувати шляхом піпетування, а також з силою виприскувати з піпетки;

– центрифугування проводиться спеціально підготовленим персоналом. Якщо в процесі центрифугування розбивається пробірка, що вміщувала БПА, центрифугу відключають від мережі, знезаражують і очищають забруднені місця.

## РОЗДІЛ 5

### ЦИВІЛЬНИЙ ЗАХИСТ

В приміщеннях науково-дослідних лабораторій зосереджено електрообладнання, використовується потенційно небезпечних речовин під час проведення наукових досліджень, а також зберігаються вибухонебезпечні речовини на території лабораторного корпусу – все це збільшує вірогідність виникнення техногенних аварій. Оскільки в лабораторії існує ймовірність виникнення ситуації техногенного характеру (пожежі, вибуху, забруднення навколишнього середовища) питання необхідності захисту працівників є досить актуальним і потребує розгляду.

Для гасіння загорань і пожеж на початковій стадії використовують первинні засоби пожежегасіння – вогнегасники. Виконаємо **розрахунок потрібної кількості первинних засобів пожежегасіння та потрібного запасу води.**

Визначити клас та підклас пожежі для лабораторного корпусу (вихідні дані для розрахунку), показники піни, потрібну кількість первинних засобів пожежегасіння, запас води для лабораторного корпусу.

*Вихідні дані для розрахунку:*

- об'єм піни 2 л;
- об'єм розчину 20 л;
- стійкість піни 304 с;
- горючий речовина - папір, деревина;
- розмір будівлі лабораторії: довжина 36 м, ширина 24 м, висота 10,4 м.

1. Потрібна кількість первинних засобів пожежегасіння може бути визначена із співвідношення:

$$n = \frac{S_{заг}}{S_n} \quad (5.1)$$

де  $S_{заг}$  – сумарна площа приміщень усіх поверхів будівлі,  $m^2$ ;

$S_n$  – нормативна площа,  $m^2$ , вибираємо за [56, табл. 5.6].

За [56, табл. 5.6]  $S_n = 100 \text{ м}^2$ ;  $S_{заг} = 36\text{м} \cdot 24\text{м} = 864 \text{ м}^2$ .

$$n = 864 / 100 = 8,6 = 9 \text{ вогнегасників.}$$

Отриманий результат округлюємо у бік найближчого більшого цілого числа. Приймаємо 9 вогнегасників.

2. Протипожежне водопостачання лабораторного корпусу здійснюється системою протипожежного водопроводу. Необхідний запас води повинен складати,  $\text{м}^3$ :

$$Q = 3600 \cdot \tau \cdot q \quad (5.2)$$

де  $\tau$  – середній час гасіння пожежі, 3 год;

$q$  – загальна витрата води,  $\text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ .

$$q = q_{зовн} + q_{вн} + q_{авт} \quad (5.3)$$

де  $q_{зовн}$  – витрата води на зовнішнє пожежегасіння,  $\text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ ;

$q_{вн}$  – витрата води на внутрішнє пожежегасіння,  $\text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ ;

$q_{авт}$  – витрата води на автоматичні установки пожежегасіння,  $\text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ ;

Витрати води на пожежегасіння залежать від об'єму будівлі та приймаються за табл. 5.1.

$$V_{будів} = 36\text{м} \cdot 24\text{м} \cdot 10,5\text{м} = 9072 \text{ м}^3 = 9,072 \text{ тис. м}^3$$

Таблиця 5.1 – Витрати води на пожежегасіння, [56]

Спосіб пожежегасіння	Витрата води на пожежегасіння, $\text{л} \cdot \text{с}^{-1}$ , при об'ємі будівлі, тис. $\text{м}^3$					
	до 3	3-5	5-20	20-50	50-100	100-200
зовнішнє	10	10	15	20	30	35
внутрішнє	2-2,5					
автоматичне	30	30	30	30	30	35

Згідно даних табл 5.1 для  $V_{будів} = 9,072 \text{ тис. м}^3$  витрати води на пожежегасіння складуть:

$$q_{зовн} = 15 \text{ л} \cdot \text{с}^{-1}$$

$$q_{вн} = 2 \text{ л} \cdot \text{с}^{-1}$$

$$q_{авт} = 30 \text{ л} \cdot \text{с}^{-1}$$

$$q = 15 + 2 + 30 = 47 \text{ л} \cdot \text{с}^{-1}$$

Необхідний запас води повинен складати,  $\text{м}^3$ :

$$Q = 3600 \cdot \tau \cdot q = 3600 \cdot 3 \cdot 47 = 507600 \text{ л} = 507,6 \text{ м}^3$$

Таблиця 5.2 – Класифікація пожеж, [56]

Клас А	горіння твердих речовин, що супроводжується (підклас А1) або не супроводжується (підклас А2) тлінням
Клас В	горіння рідких речовин, що не розчиняються (підклас В1) або розчиняються (підклас В2) у воді
Клас С	горіння газів
Клас Д	горіння металів легких, за винятком лужних (підклас Д1), лужних (підклас Д2), а також металовмісних сполук (підклас Д3)
Клас Е	горіння електроустановок під напругою

Згідно табл. 5.2 пожежа в лабораторному корпусі відноситься до класу А.

*Висновок.* На випадок пожежі в лабораторному корпусі необхідно 9 первинних засобів пожежегасіння (вогнегасників) та запас води  $507,6 \text{ м}^3$ . Клас пожежі А.

## ВИСНОВКИ

1. Визначено основні хімічні та мікробіологічні показники жировмісної твердої фази стоків рибопереробних підприємств. Встановлено, що у процесі витримування відходів у шламозбірнику (1–13 днів) в результаті життєдіяльності мікроорганізмів, автохтонних для відходів рибопереробки, вміст жирів знижується з 97 до 58%.

2. Виділено та охарактеризовано автохтонні мікроорганізми. Виявлено, що домінуючим організмом автохтонної мікрофлори відходів є гриби *Geotrichum sp.* Дані гриби мають високу ліполітичну активністю та здатні асимілювати жири.

3. Досліджено вплив різних режимів культивування мікроорганізмів на характеристики технологічного процесу та якість мікробної біомаси. При дослідженні різних режимів культивування гриба за показниками якості одержуваної біомаси, був зроблений висновок про перевагу глибинного гетерофазного культивування в періодичному режимі.

4. Розроблено технологію мікробної біоконверсії жирової фази стоків рибопереробних підприємств в білкову біомасу кормового призначення у процесі аеробного глибинного гетерофазного культивування на жирових субстратах дріжджів *Geotrichum sp.*

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Актуальні проблеми рибопереробної галузі : монографія / Баль-Прилипка Л. В., Старкова Е. Р., Лебський С. О., Андрощук О. С. Київ : Компринт, 2018. 214 с.
2. Shahidi F., Botta J. R. Seafood processing by-products. Seafoods chemistry, processing, technology and quality. Glasgow : Blackie Academic and Professional, 1994. 330 p.
3. Ioannis S. Arvanitoyannis, Aikaterini Kassaveti Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology*. 2008. № 43. P. 726–745.
4. Дуденко Н. В., Панікарова Б. О., Горбань В. Г. Аналіз харчової та біологічної цінності відходів переробки рибної сировини. *Технологічний аудит і резерви виробництва*. 2015. № 6/7(26). С. 39–41. doi: [10.15587/2312-8372.2015.55765](https://doi.org/10.15587/2312-8372.2015.55765)
5. Семенова О. et al. Очищення стічних вод харчових підприємств. *Scientific Collection «InterConf»*. 2023. № 164. С. 183–190.
8. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.
6. Ковальчук В. А. Високопродуктивні біоокислювачі в системах очистки стічних вод підприємств м'ясної та молочної промисловості. *Науковий вісник будівництва. Харків : ХДТУБА, ХОТВ АБУ*. 2010. Вип. 60. С. 247–251.
7. Ковальчук В. А., Ковальчук О. В., Самелюк В. І. Біотехнологія очистки стічних вод підприємств харчової промисловості. *Коммунальное хозяйство городов*. 2010. № 93. С. 182–187.
8. Паска М. З. Технологія тваринних жирів: навч. пос. Львів : ЛКТ ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького, 2010. 135 с.
9. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.

10. Ruggieri Luz, Artola Adriana, Gea Teresa, Sanchez Antoni. Biodegradation of animal fats in a co-composting process with wastewater sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation (Elsevier)*. 2008, Vol. 62, Issue 3. P. 298 – 303. DOI: [10.1016/j.ibiod.2008.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.02.004)
11. Аветісян Ю. І., Копаниця Ю. Д., Аргатенко Т. В. Оптимальне управління флотаційним блоком комплексу знежирення стічних вод жирового комбінату. *Проблеми водопостачання та гідравліки*. 2009. Вип. 12. С. 78–88.
12. Сухацький Ю. В., Знак З. О. Флотація як стадія кавітаційно-флотаційної технології очищення водних гетерогенних середовищ від дисперсних твердих частинок та органічних сполук. *Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2019. Вип. 2, № 1. С. 53–58.
13. Kempers P. Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes. *European journal of Science and technology*. 2009. Vol. 111, Issue 7. P. 627–645 DOI: [10.1002/ejlt.200900057](https://doi.org/10.1002/ejlt.200900057)
14. Коляда М. К., Плаван В. П., Сафранов Т. А., Мельник К. С. Розробка методу утилізації колагекнівмісних відходів рибопереробної промисловості. *Вісник КНУТД*. 2016. № 2(96). С. 177–182.
15. Шестопалов О. В., Гетта О. С., Рикусова Н. І. Сучасні методи очищення стічних вод харчової промисловості. *Екологічні науки*. 2019. № 2(25). С. 20–27. DOI: [10.32846/2306-9716-2019-2-25-4](https://doi.org/10.32846/2306-9716-2019-2-25-4)
16. Ромашко І. С., Мартинюк І. О. Утилізація жирових відходів переробки риби. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького*. 2014. 16, № 3(4). С. 148–151.
17. Lakhal D., Bahlaouan B., Boutaleb N., Fathi A., Taiek T., Abouakil N., Lazar S. Biotransformation of Ternary Mixture of Organic Industrial Waste into Poultry Feed. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2018. A8. P. 171–181. DOI: [10.17265/2161-6256/2018.03.005](https://doi.org/10.17265/2161-6256/2018.03.005)
18. Muhammad Bilal, Hafiz Iqbal. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges

and opportunities. *Food Research International*. 2019. V. 123. P. 226–240 DOI: [10.1016/j.foodres.2019.04.066](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.066)

19. Rustad T. O. Utilisation of marine by-products. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2003. № 2. P. 458–463.

20. Ashok Kumar, Renata Gudiukaite, Alisa Gricajeva, Mikas Sadauskas, Vilius Malunavicius, Hesam Kamyab, Swati Sharma, Tanvi Sharma, Deepak Pant. Microbial lipolytic enzymes – promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. *Energy*. 2020. Vol. 192. P. 127–142. DOI: [10.1016/j.energy.2019.116674](https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.116674)

21. Fan Meng, Hangyao Wang, Guangming Zhang, Xuemei Li, Yi Zhang, Zhiguo Zou. One-step treatment and resource recovery of high-concentration non-toxic organic wastewater by photosynthetic bacteria. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 251. P. 121–127. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.12.002](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.002)

22. Haifeng Lu, Guangming Zhang, Shichao He. Production of photosynthetic bacteria using organic wastewater in photobioreactors in lieu of a culture medium in fermenters: From lab to pilot scale. *Journal of Cleaner Production*. 2020. Vol. 259. P. 158–163. DOI: [10.1016/j.jclepro.2020.120871](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120871)

23. Cristian A., Puyol D., Munoz R. A systematic optimization of piggery wastewater treatment with purple phototrophic bacteria. *Chemosphere*. 2020. Vol. 253. P. 134–145. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.126621](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126621)

24. Mara Cristina P. Zenevycz, Jacques A., Debora de Oliveira, Agenor Furigo Jr., Aleksandra Valerio, J. Vladimir Oliveira. A two-step enzymatic strategy to produce ethyl esters using frying oil as substrate. *Industrial Crops and Products*. 2017. Vol. 108. P. 52–55. DOI: [10.1016/j.indcrop.2017.06.018](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.018)

25. Vivek P., Sanvidhan G. Effect of lipase from different source on high fat content wastewater of dairy industry. *Indian Journal of Biotechnology*. 2018. Vol. 17(2). P. 244–250. DOI: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/45100>

26. Prem Chandra, Ranjan Singh, Pankaj Kumar Arora. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact*. 2020. P. 2–42. DOI: [10.1186/s12934-020-01428-8](https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8)

27. Гуцол Н. В., et al. Використання вторинних продуктів олійно-жирового виробництва у тваринництві. *Корми і кормовиробництво*. 2019. № 87. С. 136–143.
28. Venugopal V. Enzymes from Seafood Processing Waste and Their Applications in Seafood Processing. *Adv Food Nutr Res*. 2016. Vol. 78. P. 47–69
29. Novik G., Meerovskaya O., Savich V. Waste Degradation and Utilization by Lactic Acid Bacteria: Use of Lactic Acid Bacteria in Production of Food Additives. *Bioenergy and Biogas*. 2017. P. 105–146. DOI: 10.5772/intechopen.69284
30. Голуб Н. Б., Шинкарчук М. В., Козловець О. А. Шляхи підвищення продукування біогазу при зброджуванні жировмісних відходів шкіряного виробництва. *Вісник Хмельницького національного університету*. 2018. № 2(259). С. 103–107.
31. Гаценко К. В., Волошин М. Д. Технологія отримання біогазу на основі харчових відходів. *Збірник наукових праць Дніпропетровського технічного університету*. 2019. Том 1, № 34. С. 131–136. DOI: [10.31319/2519-2884.34.2019.26](https://doi.org/10.31319/2519-2884.34.2019.26)
32. Пилипенко О. Розвиток харчової промисловості України. *Наукові праці НУХТ*. 2017. Т. 23, № 3. С. 15–25.
33. Oswal N., Sarma P. M., Zinjarde S. S., Pant A. Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast. *Bioresource Technology*. 2002. Vol. 85. P. 35–37. DOI: [10.1016/s0960-8524\(02\)00063-9](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(02)00063-9)
34. Chigusa K., Hasegawa T., Yamamota N., Watanabe Y. Treatment of waste water from oil manufacture plant by yeasts. *Water Science and Technology*. 1996. Vol. 34. P. 51–58. DOI: [10.1016/S0273-1223\(96\)00820-7](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00820-7)
35. Zinjarde S. S., Pant A., Deshpande M. V. Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted seawater. *Mycological Research*. 1998. Vol. 10. P. 553–558. DOI: [10.1017/S0953756297005418](https://doi.org/10.1017/S0953756297005418)

36. De Felice B., Pontecorvo G., Carfagna M., Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnologica*. 1997. Vol. 17. P. 231–239. DOI: [10.1002/abio.370170306](https://doi.org/10.1002/abio.370170306)
37. Pctruccioli G. Interventi chimici e fisici sulle acque di vegetazione e abbattimento parziale del loro stesso inquinamento / Acts of Round Table on the disposal of olive oil mill wastewaters. 1986. Accademia Nazionale dell'OHvo Spoleto. 138 p.
38. Scioli D., De Felice B. Impiego di ceppi di lievito nella depurazione dei reflui dell'industria olearia. *Microbiol Enzimol*. 1993. Vol. 43. P. 61–69.
39. Custodo S., Vollaro L. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Wat. res*. 1997. Vol. 31. № 10. P. 2520–2524. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00083-3)
40. Олійничук С., Данілова К., Коваль О. Ферментативний гідроліз крохмале-і целюлозовмісної сировини до зброджуваних цукрів у виробництві біоетанолу. *Продовольчі ресурси*. 2019. № 7.13. С. 121–130.
41. Вишницька С.В., Зозульов О.В. Стан та тенденції розвитку вітчизняного ринку комбікормів та біологічно-вітамінних добавок. *Економічний вісник Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут»*. 2023. № 26. С. 102–108.
42. Єгоров Б. В. Технологія виробництва комбікормів : підручник. Одеса : Друк. дім, 2011. 448 с.
43. Капрельянц Л. В. Біотехнологічні основи переробки вторинної рослинної сировини в харчові та кормові продукти. 1993.
44. Деркач В. В. Розробка технології та обладнання переробки відходів деревини у кормовий продукт.
45. Капрельянц Л.В. Ферменти в харчових технологіях. Одеса: ОНАХТ, 2009. 468 с.
46. Мадані М.М. Біоконверсія жирових відходів м'ясопереробки з використанням дріжджів *Y. lipolytica*. *Техногенно-екологічна безпека*. 2023. № 2. С. 32–41. DOI: [10.52363/2522-1892.2023.2.4](https://doi.org/10.52363/2522-1892.2023.2.4)

47. Pabai F., Kermasha S., Morin A. Use of continuous culture to screen for lipases-producing microorganisms and interesterification of butter fat by lipases isolates. *Canadian Journal Of Microbiology*. 1996. Vol. 42, Issue 5. P. 446–452.
48. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посіб. К. : НУХТ, 2010. 323 с.
49. Капрельянц Л.В. Теоретичні основи біотехнології: навч. посіб. Харків : Факт, 2020. 291 с.
50. Masse L., Kennedy K.J., Chou S.P. // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2001. Vol. 76. P. 629–635.
51. Терещенко М. Ф., Кирилова А. В. Оцінка впливу ультразвукового сигналу на біологічні тканини. *Вісник НТУУ “КПІ”. Сер. Приладобудування*. 2010. Вип. 39. С. 130–136.
52. Капрельянц Л., Пилипенко М., Єгорова А. Технічна мікробіологія: лаб. практикум / за ред. Л. В. Капрельянца. Одеса : Сімекс-прінт, 2012. 144 с.
53. Александрова К. В., Шкода О. С., Васильєв Д. А. Визначення активності ферментів в біологічних середовищах. Одиниці активності ферментів. Ензимопатії. Медична ензимологія : методич. посіб. Запоріжжя : ЗДМУ, 2015. 45 с.
54. Антоненко С. В. Методичні рекомендації та лабораторний практикум «Клітинна біологія». Київ, Мала академія наук, 2018. 36 с.
55. Левченко О. Г., Землянська О. В., Праховнік Н. А., Зацарний В. В. Безпека життєдіяльності та цивільний захист: підруч. Київ : Каравела, 2021. 268 с.
56. Третьяков О. В., Доронін Є. В., Халмурадов Б. Д., Зозуля С. В. Основи пожежної безпеки: підруч. Київ : ЦУЛ, 2024. 356 с.