

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК
(прізвище та ініціали)

«__» червень 2022 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

(підпис) Віктор СТАБНІКОВ
(прізвище та ініціали)

«__» червень 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Культивування *Bacillus megaterium* для виробництва фосфорномобілізуючого біодобрива

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

Середінський Андрій Анатолійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник

Буценко Людмила Миколаївна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

Тетяна Гнатюк

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології і екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична

промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Стабніков В.П.

«01» квітня 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Середінський Андрій Анатолійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Bacillus megaterium* для виробництва фосфорномобілізуючого біодобрива»

керівник роботи Буценко Людмила Миколаївна, д.б.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 27.05.22

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *B. megaterium* NCT-2, цільовий продукт: фосфобактерин

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва фосфобактерину – 1 аркуш (А1). Апаратурна схема виробництва фосфобактерину – 1 аркуш формату (А1).

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строки виконання	Примітка
1	<i>Характеристика фосфобактерину</i>	<i>01.04.21-05.04.22</i>	
2	<i>Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування</i>	<i>06.04.21-11.04.22</i>	
3	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>12.04.21-20.04.22</i>	
4	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	<i>21.04.21-27.04.22</i>	
5	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>28.04.21-03.05.22</i>	
6	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>04.05.21-07.05.22</i>	
7	<i>Контроль виробництва</i>	<i>24.05.21-27.05.22</i>	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____

Середінський А.А.
(прізвище та ініціали)

Буценко Л.М.

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячено розробленню технологічної та апаратурної схем біосинтезу бактеріального добрива «Фосфобактерин» з використанням штаму *Bacillus megaterium* NCT-2, який, за умови росту на середовищі з сахарозою та дріжджовим екстрактом, синтезує 3 г/л біомаси. Розрахована потужність виробництва біодобрива, яка становить 390 кг готового продукту на рік. Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних агентів та підготовка і стерилізація поживних середовищ) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці та посівних апаратах об'ємами 20 л і 200 л, а також виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 2 м³).

Біологічне добриво «Фосфобактерин» є екологічним для довкілля та безпечним для людей. Препарат на основі *Bacillus megaterium* NCT-2 здатен розкладати нерозчинні сполуки фосфору в ґрунті в доступні для рослин форми. Бактеріальне добриво має широкий спектр дії. Бактерії *Bacillus megaterium* NCT-2 сприяють підвищенню продуктивності зернових культур, кукурудзи, картоплі, ріпаку, буряків та соняшнику. Завдяки використанню біопрепарату у ґрунті зменшується кількість шкідливих та патогенних мікроорганізмів, рослини стають менш чутливими до хвороб, краще переносять стрес

Дипломний проект викладений на 75 сторінках друкованого тексту, містить 12 таблиць, та 9 рисунків. Складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (50 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *Bacillus megaterium* NCT-2, фосфатмобілізація, біодобриво, технологічний процес, біосинтез, фосфобактерин.

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив	Середінський А.А.				РЕФЕРАТ		Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Буценко Л.М.								75
Рецензент					Кафедра БТМ				
Н. Контр.									
Затверд.	Стабніков В.П.								

Зміст

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	8
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	17
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	19
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	19
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	19
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера	20
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	21
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА.....	25
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	25
4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера..	26
4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря	27
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	28
4.1.4. Обґрунтування підготовки та стерилізації поживного середовища	31
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	35
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	38
РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	48
7.1.1. Обґрунтування стадій отримання готового препарату «Фосфобактерин».....	48
7.1.2. Вибір способу сушіння біомаси та відповідного обладнання.....	50
7.1.3. Змішування з наповнювачем та вибір відповідного обладнання... ..	53
7.1.4. Пакування препарату та вибір відповідного обладнання.....	53

7.1.5. Маркування та вибір відповідного обладнання.....	54
7.2. Орієнтовний продуктивний розрахунок з врахуванням особливостей процесів і втрат по кожній стадії отримання продукту	56
2.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	58
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	60
8.1. Мікробіологічний контроль.....	60
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	61
8.3. Карта постадійного контролю	64
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	71

ВСТУП

Фосфор є незамінним елементом для загального розвитку рослин. Він відіграє важливу роль: сприяє зростанню коренів і пагонів, підвищує схожість насіння. Коріння рослин можуть поглинати лише фосфор у вигляді неорганічних сполук. Сполуки фосфору в ґрунті заряджені негативно, тому вони легко реагують з позитивно зарядженими іонами заліза, алюмінію та кальцію з утворенням нерозчинних і недоступних рослинам сполук. Тому фосфор у ґрунті переважно знаходиться у зв'язаному стані, тому концентрація його рухомої форми нижча.

Потреби рослин у фосфорі особливо високі на початкових етапах росту, коли ґрунт ще недостатньо прогрітий для оптимального поглинання елемента. У цей період рослини надзвичайно чутливі до фосфатного голодування, дефіцит якого згодом неможливо компенсувати.

Препарат на основі штаму *Bacillus megaterium* NCT-2 має здатність мінералізувати органічні фосфоровмісті речовини, покращувати мінеральне живлення рослин, стимулювати їх ріст і розвиток завдяки забезпеченню їх біологічно активними речовинами та збільшувати стійкість рослин до фітопатогенів [1].

Новизна роботи полягає у використанні нового, штаму для промислового отримання препарату «Фосфобактерин». За застосування біодобрив на основі *Bacillus megaterium* NCT-2 вдасться зменшити кількість внесення фосфорних солей в ґрунт. У рослин збільшується стресостійкість, що впливає на показник врожайності культур. Препарат «Фосфобактерин» має широкий спектр застосування, оскільки його можна застосовувати як до овочевих культур, так і до технічних чи злакових.

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив		Середінський А.А.						75
Керівник		Буценко Л.М.			Кафедра БТМ			
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

РОЗДІЛ 1.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Питання сільського господарства в Україні сьогодні є найбільш актуальними в контексті сталого розвитку. Нині розвиток сільського господарства невіддільний від хімічних добрив. Рішенням проблеми ґрунтоутворення та подальших змін ґрунту в цілому може бути припинення надмірного внесення мінеральних (хімічних) добрив або відмова від них і перехід на сучасні органічні та біологічні добрива. В даний час використання біодобрив в аграрному секторі поширене недостатньо.

Бактеріальне добриво - препарат, що містить живі клітини мікробної культури. При внесенні в ґрунт або рослини вони утворюють колонії і полегшують надходження біологічних елементів у рослини в доступній формі.

Фосфобактерин - біодобриво отримане на основі паличкоподібних бактерій *B. megaterium*; являє собою рідину, яка містить клітини, зокрема, фосфатмобілізуючих бактерій [1].

Фосфатмобілізуючі бактерії перетворюють наявні в ґрунті нерозчинні фосфати у доступні для рослин форми. Їх роль полягає в перетворенні неорганічних сполук фосфору та пов'язаних з ними металів – Mg, Ca, Zn, Fe та ін. в доступні рослині органічні, або підвищені такої до ступності.

До таких бактерій відносять роди *Bacillus megaterium* та *Pseudomonas aureofaciens*. Разом з цим покращується й засвоєння фосфорних мінеральних добрив. Високоактивні штами бактерій роду *Bacillus*, здатні мобілізувати фосфор з його органічних та важкорозчинних неорганічних сполук.

Ці мікроорганізми, також, характеризуються високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів і бактерій

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Середінський А.А.				ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Керівник	Буценко Л.М.						
Рецензент							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
					Літ.	Арк.	Акрушів
							75
					Кафедра БТМ		

При застосуванні біопрепарату на основі бактерій роду *Bacillus* зменшується потреба у фосфорних добривах, що призводить до зниження додаткових затрат. Завдяки використанню біопрепарату у ґрунті зменшується кількість шкідливих та патогенних мікроорганізмів, рослини стають менш чутливими до хвороб, краще переносять стрес [2].

Бактерії *B.megaterium* сприяють підвищенню продуктивності зернових культур, кукурудзи, картоплі, ріпаку, буряків та соняшнику.

Таблиця 1.1

Характеристика біодобрива “Фосфобактрин”

Назва біодобрива	“Фосфобактрин”
Тип	Мікробіологічне біодобриво
Діюча речовина	<i>Bacillus megaterium</i> var. <i>Phosphaticum</i> вказіть штам
Застосування	Рекомендується для обробки зернових культур, картоплі, цукрових буряків.
Механізм дії	Бактерії перетворюють наявні в ґрунті нерозчинні фосфати у доступні для рослин форми [3]
Клас небезпеки	(нетоксичний, непатогенний) [2]
Умови зберігання	3 місяці при температурі в 5-12°C [2]
Застосування	Передпосівний обробіток насіння препаратом проводять за день або в день посіву. Насіння обробляють, перемішуючи (вручну або в машинах для протруювання, очищених від ядохімікатів), і злегка підсушують на повітрі, уникаючи прямої дії сонячних променів. Гектарна порція препарату становить 50-100 мл. Для обробки відповідної партії насіння зазначену дозу препарату розводять водою кімнатної температури до необхідного обсягу [1]

Переваги	<p>Екологічна безпечність для людей, тварин, риб, бджіл та навколишнього середовища;</p> <ol style="list-style-type: none">1. Збагачують землю корисними елементами2. Покращують фізіологічні властивості ґрунту3. Перетворюють фосфор у доступну форму4. Покращують фосфорне живлення5. Виступають в якості стимуляторамів росту6. Є адаптогенами навколишнього середовища;7. Збагачують землю корисними елементами8. Покращують фізіологічні властивості ґрунту9. Перетворюють фосфор у доступну форму10. Покращують фосфорне живлення11. Виступають в якості стимуляторамів росту12. Є адаптогенами
----------	---

РОЗДІЛ 2.

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Штам *Bacillus megaterium* NCT-2 є ефективним штамом, використовуваним в якості складової біодобрива. Штам *B. megaterium* NCT-2 здатний до фосфатмобілізації, що активно використовується в аграрній біотехнології.

Штам *B. megaterium* NCT-2 має хорошу стійкість до високих температур. Більше того, *B. megaterium* NCT-2 є важливою для відновлення вторинних речовин засолення ґрунту бактерією і може помітно зменшити кількість нітратів та фосфатів у ґрунті.

Представлені дані в табл. 2.1. засвідчують про те, що штам *B. megaterium* NCT-2 синтезує найбільшу кількість біомаси серед представлених біологічних агентів, що при підборі продуцента біодобрива є одним із головних критеріїв.

Також слід звернути увагу на те, що біологічний агент не росте на дороговартісному середовищі, що вказано у табл. 2.2., тому і собівартість готового продукту буде незначною. Підрахунок собівартості одного граму біомаси представлений на табл. 2.3.

Отже, підсумувавши всі плюси та мінуси можна дійти висновку, що найкращим біологічним агентом для продукування власної біомаси є *B. megaterium* NCT-2.

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив	Середінський А.А.				ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Буценко Л.М.								75
Рецензент							Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Затверд.	Стабніков В.П.								

Особливості одержання фоосфобактерину

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Кількість клітин КУО/мл	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компоненти	Конц., г/л					
<i>Bacillus megaterium</i> var <i>phosphaticum</i> (PB - 1)	Поживний бульйон	13	1x10 ⁹	6,4	24	t = 32 °C pH=7,0 500 об/хв	M. Gomathy, M Thangaraju, S. Gunasekaran, N.O. Gopal, Sporulation and regeneration efficiency of phosphobacteria (<i>Bacillus megaterium</i> var <i>phosphaticum</i>), 2007 47(3):259-62. doi: https://doi.org/10.1007/s12088-007-0047-1
	Глюкоза	1					
	MgSO ₄	0,25					
	KCl	1					
	CaCl ₂ x2H ₂ O	0,15					
	MnSO ₄ x4H ₂ O	3,96					
	FeSO ₄ x7H ₂ O	2,78					

<p><i>Bacillus megaterium</i> NCT-2</p>	<p>Сахароза КН₂РО₄ MnSO₄ Дріжджовий екстракт</p>	<p>15 0,5 0,05 3</p>	<p>1,25x10¹¹</p>	<p>6,7</p>	<p>24</p>	<p>t = 35°C pH = 7,2 180 об/хв</p>	<p>Yaowei Chi, Daxin Wang, Miao Jiang, Shaohua Chu, Bin Wang, Yue Zhi, Pei Zhou, Dan Zhang. Microencapsulation of <i>Bacillus megaterium</i> NCT-2 and its effect on remediation of secondary salinization soil, 2020; 37(2): 134-143, doi: 10.1080/02652048.2019.1705409</p>
<p><i>Bacillus megaterium</i> 501 GR</p>	<p>Меляса NaNO₃ КН₂РО₄ MgSO₄</p>	<p>20 3 1 0,2</p>	<p>0,5x10⁹</p>	<p>6,5</p>	<p>48</p>	<p>t = 37°C pH = 7,3 140 об/хв</p>	<p>Патент №RU2558291C2 Полифункциональное средство для растениеводства Круглов Ю.В. Лисини Т.О. Опуб.: 27.07.2015 Бюл. № 21</p>

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів
фоофобактерину**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонент а, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3,4,5,6,7, 8,9,10,11 12,13,)*
<i>Bacillus megaterium</i> <i>var</i> <i>phosphaticum</i> (PB - 1)	Поживний бульйон – 13	1880	24,44	1
	Глюкоза – 1	53	0,053	2
	MgSO ₄ – 0,25	50	0,0125	3
	KCl – 1	40	0,04	4
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	90	0,09	5
	CaCl ₂ x2H ₂ O – 0,15	1108	0,166	6
	MnSO ₄ x4H ₂ O – 3,96	39,50	0,156	7
	FeSO ₄ x7H ₂ O – 2,78	30	0,0834	8
	Вартість 1 л середовища – 25,04 грн			
<i>Bacillus megaterium</i> NCT-2	Сахароза – 15	8	0,12	9
	KH ₂ PO ₄ – 0,5	48,66	0,02	10
	MnSO ₄ – 0,05	23	0,001	11
	Дріжджовий екстракт – 3,0	1100	3,3	12
	Вартість 1 л середовища – 3,44 грн			
<i>Bacillus megaterium</i>	Меляса – 20	65	1,3	13
	NaNO ₃ – 3	60	0,18	14

501 GR	KH_2PO_4 – 1	48,66	0,047	10
	MgSO_4 – 0,2	93	0,019	15
	Вартість 1 л середовища – 1,55 грн			

Примітка. * - Ціни наведено станом на квітень 2021 р.

1. <http://starko.com.ua/seredovyshe-49fr>
2. <https://prom.ua/p637964189-glyukoza.html?>
3. <https://prom.ua/p185455693-magnij-ternokislyj-mgso4.html?>
4. https://prom.ua/p1375330629-hlorid-kaliya-1kg.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpc_1,2_promyshlennaya_himiya&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQjwkZiFBhD9ARIsAGxFX8AvIxzjbrpGqE5H2VZzejgn4JJfX7mGnD6UVn-RuS78DQMwCRNiCLwaArKNEALw_wcB
5. <https://www.systopt.com.ua/item-kalij-fosfornokyslyj-kaliyu-fosfat-2-zamishhenyj>
6. <https://luxpl.com/product-7595238338>
7. <https://runainter.com/ua/p415526849-marganets-ternokislyj-sulfat.html>
8. https://klebrig.com.ua/p1207572772-zheleznyj-kuporos-1kg.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjw47eFBhA9EiwAy8kzNIbYBUW8c3R8MvfCZVp0yiNDyI0GWyB-3Fq7zuUHQXJJPBT_kfOH6BoCm9YQAvD_BwE
9. <https://odessa.flagma.ua/uk/sahar-optom-o9033096.html>
10. <https://dnepropetrovsk.flagma.ua/uk/monokaliyfosfat-kaliy-fosfornokisly-o3796221.html>
11. <https://prom.ua/p1076964410-sulfat-margantsa-1kg.html>
12. <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
13. <https://prom.ua/ua/p1348935797-melassa-sveklovichnaya-1000ml.html>
14. https://prom.ua/p1375326408-nitrat-natriya-1kg.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpc_1,2_promyshlennaya_himiya&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQjwkZiFBhD9ARIsAGxFX8AmW0cIFFUKalrHdBPHpczGrtsX2dsa4sX-xm-nvuSdKUr1o55OylsaAkD1EALw_wcB
15. <https://ukrchemgroup.com/p783600334-sulfat-magniyamagnij-ternokislyj.html>

Умовна вартість 1 г фосфобактерину , синтезованого на суміші ростових субстратів

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого біохімічні ознаки біологічного агента

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>Bacillus megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i> (PB - 1)	6,4	24	0,27	25,04	3,91
<i>B. megaterium</i> NCT-2	6,7	24	0,56	3,44	0,51
<i>Bacillus megaterium</i> 501 GR	6,5	48	0,14	1,55	0,24

Bacillus megaterium - це грам-позитивна паличка довжиною 3,5-7 мкм і завширшки 1,5-2 мкм. Вона розташовується одиночно, попарно або ланцюжками, рухлива, утворює спори, капсул не формує. Тип поділу: простий.

У ранній стадії розвитку це рухливі поодинокі палички, при старінні утворюють ендоспори, що локалізуються в одному з кінців клітки. Мікроорганізми утворюють овальні ендоспори. У силу вищевикладеного технологія вирощування зводиться до одержання спор [4].

Колонії правильної форми, округлі, з чітко окресленими краями, опуклі, кремові, молочно-білі, матові або з жирним блиском. Клітини товсті (до 2 мкм), завдовжки до 10 – 12 мкм, поодинокі або з'єднані в ланцюжки.

На МПА зростають колонії сіро-білого кольору, гладкі, блискучі з рівними краями. Капустяна паличка викликає помутніння МПБ з утворенням незначного осаду. Мікроб чутливий до кислої реакції середовища. Оптимальна температура розвитку 25-30°C



Рис.2.1. Колонія *B. megaterium* під мікроскопом



Рис.2.2 Колонія *B. megaterium* на чашці Петрі

При запозиченні рисунків обов'язково потрібно надати посилання на джерело і додати це джерело у список літератури, якщо його ще там немає

Мікроорганізм є аеробом для оптимальною температурою росту є +31° С та оптимумом рН=7 . Здатний до мобілізації фосфору із ортофосфатів кальцію. Добре зберігається на скошених агаризованих середовищах при +4°С. Здатний до утворення кислоти з глюкози [5].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетична класифікація для *Bacillus megaterium* була наведена згідно Другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [6].

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *Megaterium*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Бактеріальне добриво це препарати, що у своєму складі містять живі клітини культур мікроорганізмів. При застосуванні на ґрунті чи рослинах, утворюють колонії та сприяють надходженню біоелементів до рослин в доступній формі. На основі біомаси бактерій *B. megaterium* отримують велику кількість біодобрив, але ми розглянемо користь біодобрива на основі «Фосфобактерин», яке містить клітини, зокрема, фосфатмобілізувальних бактерій [7].

Фосфатмобілізуючі бактерії перетворюють наявні в ґрунті нерозчинні фосфати у доступні для рослин форми. Їх роль полягає в перетворенні неорганічних сполук фосфору та пов'язаних з ними металів – Mg, Ca, Zn, Fe та ін. в доступні рослинні органічні, або підвищенні такої доступності.

Враховуючи корисні властивості цільового продукту його використовують для підвищення врожайності зернових, картоплі, цукрових буряків та інших. сільськогосподарських рослин. Використання даного препарату відбувається в якості передпосівної обробки за день або в день посіву культури для збільшення врожайності.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Так як даний препарат використовують для великої кількості аграрних культур, для визначення річної потреби необхідно визначити яку культури ми будемо обробляти. Станом на 2021 рік в Україні найбільшу засівну площу становлять зернові культури 15,6 млн. га [8].

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив		Середінський А.А.						75
Керівник		Буценко Л.М.						
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ ₁₈			

Також необхідно врахувати що ми не зможемо обробляти всі засіяні площі цієї культури на території України нашим препаратом, тому для подальших розрахунків приймемо 10 % від загальної кількості засіяних площ.

$$15\,600\,000 \times 10\% = 1\,560\,000 \text{ га}$$

Як написано ля обробки гектраної норми насіння використовують 5 г сухого препарату(біомаси)[3]. Отже для вище розрахованої засівної площі кількість препарату буде становити:

$$1\,560\,000 \text{ га} \times 5 \text{ г} = 7\,800\,000 \text{ г (біомаси)}$$

Також необхідно врахувати конкуруючі умови на ринку і факт, що не всі підприємці будуть використовувати даний препарат для передпосівної обробки, то визначення необхідної кількості приймемо 5 % від розрахованої загальної кількості біомаси для виготовлення препарату.

$$7\,800\,000 \text{ г} \times 5\% = 390\,000 \text{ г}$$

(річна потреба біомаси для виготовлення препарату)

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Розрахувавши річну потребу яка становить 390 кг приймемо кількість робочих трудоднів $T_{рд} = 96$ днів.

Розрахуємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 96 / 31 = 74,3, \text{ приймемо } N_{цк} = 75$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (24 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,1$. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл, кг /цикл

$$V_{цк} = \frac{V_{нт}}{N_{цк}} = \frac{390}{75} = 5,2 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні E_{cb} , м³

$V_{кр} = K1 \cdot G_{цк} \cdot C_{Ргп} / X_{кр} \cdot (1 - E_{cb}) = (1,1 \times (5,2 / 2) \times 0,95) / (3 \times (1 - 0,15)) = 1,065$
(5,2 / 2) = 2,6 кг (без наповнювача, з врахуванням втрат) оскільки в процесі приготування препарату додається наповнювач (каолін) 50%.

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{ф}$, м³

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 1,065 / (1 - 0,1) = 1,18$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, м³

$$V_{пф} = V_{ф} / K_{ф} = 1,18 / 0,6 = 1,96$$

З таблиці 1 вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, м³

$$V_{Гф} = 2$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{уф}$, частка

$$K_{уф} = V_{ф} / V_{Гф} = 1,18 / 2 = 0,59$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримуємо $V_{пц} = 1\,065$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини враховуємо її втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які становлять 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{пц}}{1 - E_{ф}} = \frac{1\,065}{1 - 0,1} = 1\,183 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить:

$$V_{ф} = \frac{V_{роб.1}}{K_{зап}} = \frac{1\,183}{0,6} = 1\,971 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ф} = 2 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = \frac{V_{роб.1}}{V_{ф}} = \frac{1\,183}{2\,000} = 0,59$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 1}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + E_{\phi 1}} = \frac{1\,183}{1 + 0,1} = 1\,075,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1\,183 - 1\,075,5 = 107,5 \text{ л}$$

Для одержання 107,5 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), які становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{107,5}{1 - 0,1} = 119,4 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi 2} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{119,4}{0,6} = 199 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\phi 2} = 0,2 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\phi 2}} = \frac{119,4}{200} = 0,59$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi 2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + E_{\phi 2}} = \frac{119,4}{1 + 0,1} = 108,5 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 119,4 - 108,5 = 10,9 \text{ л}$$

Для одержання 10,9 л інокуляту у посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\phi 2}$), які

становлять 10 %. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{10,9}{1 - 0,1} = 12,1 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi3} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{K_{\text{зап}}} = \frac{12,1}{0,6} = 20,6 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\phi3} = 20$ л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\phi3}} = \frac{12,1}{20} = 0,605$$

Кількість посівного матеріалу для ферментера ($E_{\phi2}$) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + E_{\phi2}} = \frac{12,1}{1 + 0,1} = 11 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 12,1 - 11 = 1,1 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм}} = 1,1$ л можна одержати культивуванням *B. megaterium* NCT-2 у колбах на качалці. Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становить:

$$N = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}} = \frac{1\ 100}{750 * 0,2} = 7,3$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 8 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біодобрива на основі біомаси *B. megaterium* у

ферментері об'ємом 2 м^3 з коефіцієнтом заповнення $0,6$ відбуватиметься у три етапи (рис.1.1, табл 1.1).

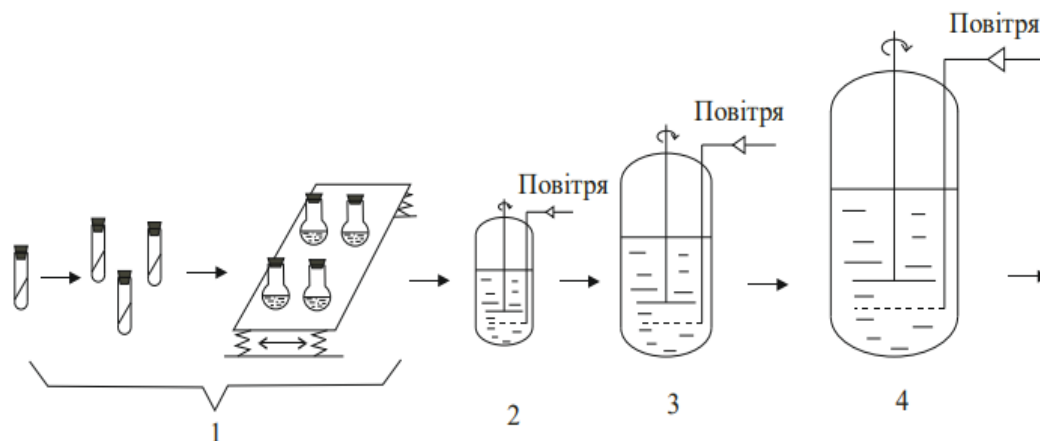


Рис. 3.1. Схема приготування посівного матеріалу *B.megaterium* NCT-2:

1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агарі в пробірках і в колбах на качалці); 2–3 – вирощування в інокуляторах об'ємом (м^3): 2 – $0,02$; 3 – $0,2$; 4 – виробничий біосинтез в ферментері об'ємом (м^3): 2 .

Таблиця 3.1

Узагальнені дані розрахунку техніко-економічного обґрунтування

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	0,750	0,2	0,15	1,1	0,11
2	20	0,6	12,1	11	1,1
3	200	0,59	119,4	108,5	10,9
4	2 000	0,59	1 183	1 075,5	107,5

РОЗДІЛ 4.

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Штам *B.megaterium* NCT-2 культивується при температурі $+35^{\circ}\text{C}$, при постійній примусовій аерації очищеним стерилізованим повітрям. Швидкість перемішування становить 1,5 об/хв. Рівень рН середовища становить 7,2, тобто середовище є нейтральним і є сприятливими для розвитку сторонньої мікрофлори, яка може погіршити ріст біомаси біологічного агенту та/або вступати з ним в симбіоз утворюючи нові штами.

Для запобігання контамінації необхідно створити асептичні умови. Дані умови можна забезпечити стерилізацією всього устаткування, поживного середовища перед його засівом, аераційного повітря та піногасників. Асептичні умови досить важко досягти культивуванням поверхневим методом, тому правильним є культивування глибинним методом. Стерилізація апаратів і комунікацій має велике значення й при глибинному способі культивування. Сама ретельна стерилізація може не дати ефекту, якщо порушено герметичність устаткування, тому ще однією необхідністю є герметизація всіх комунікацій виробництва [9].

Отже, культивування для отримання біомаси *B.megaterium* NCT-2 слід проводити глибинним культивуванням з постійною аерацією та постійним перемішуванням культуральної рідини.

НУХТ БТЕК 04.02.16 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Середінський А.А.			ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Буценко Л.М.						75
Рецензент						Кафедра БТМ 24		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

4.1.1. Обґрунтування способу культивування та типу ферментера

Глибинне культивування біологічних агентів є найбільш поширеним способом, який використовується в біотехнології для отримання мікробних мас. Ферментери для глибинного культивування дозволяють найбільш ефективно створювати оптимальні умови для реалізації потенціальних властивостей біологічних агентів.

B. megaterium NCT-2 - облігатний аероб, отже під час культивування мікроорганізму необхідне аераційне повітря. Для контролю рівня тиску, створеного при подачі аераційного повітря потрібен манометр . Культивується в рідкому середовищі з рівнем рН 7,2 , тобто нейтральному. Для контролю рівня рН необхідно встановити відповідні датчики.

Важливим є підтримання температури на оптимальному рівні, тому ферментер має бути оснащений і сорочкою для підігріву та охолодження середовища культивування.

У процесі культивування штам не утворює міцелію та не накопичує метаболіти, що підвищують в'язкість середовища. Тому для інтенсифікації процесу та збагачення культуральної рідини киснем допустимо використання лопатевої мішалки.

Для культивування *B.megaterium* NCT-2 ферментер також має бути оснащеним: відбійниками для забезпечення масообміну та теплообміну, манометром, термометрами, мішалками, датчиками піноутворення та фільтрами для стерилізації повітря.

Готових моделей, що задовольняють потреби ферментаційного процесу, серед представлених на ринку знайдено не було. Проте, є можливість виготовлення ферментеру на замовлення. Даний ферментер буде відповідати всім критеріям, необхідним для культивування штаму *B.megaterium* NCT-2. Такі послуги надає ТОВ «Аргон Центр» (м.Бровари, Україна)[10].

4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Штам *B. megaterium* NCT-2 вирощується при постійній примусовій аерації очищеним стерилізованим повітрям, отже необхідно передбачити стадію підготовки аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря буде здійснюватися в окремих будівлях (компресорних відділеннях), оскільки витрати повітря будуть великі.

Стадії підготовки аераційного повітря такі:

- забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці $H \sim 15$ м (висота поверху – 5 м, кількість поверхів – 2, висота поверхів – 10 м, разом з косим дахом будівлі (+3 м) – 13, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;
- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120 – 200°C);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» для конденсації вологи;
- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері, який також зменшує пульсації руху повітря, які можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація тиску та температури підігріванням до 45–50 °C парою у відповідних теплообмінниках;
- очищення в головних ємнісних набивних фільтрах, установлених поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення $E=95\%$;
- очищення в індивідуальних фільтрах ($E=99,99\%$), установлених на ферментері, повітря до яких подається безпосередньо від головних фільтрів через трубопроводи (колектори).

Повітря в боксах і лабораторіях, де працюють з посівною культурою, стерилізують за допомогою УФ-ламп.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

При виборі мийних і дезінфікуючих засобів необхідно враховувати їх вартість і вартість утилізації необхідної площі виробничого майданчика.

Використовуйте приблизно 1 мл мийного або дезінфікуючого робочого розчину на 1 м².

Витрати мийних та дезінфікуючих концентратів та їх виробничі витрати наведені в таблиці. 4.1.

Після аналізу даних табл. 4.2. Можна зробити наступні висновки:

- Каустична та кальцинована сода рекомендовані для очищення обладнання, інвентарю, комунікацій, тари;
- Для очищення та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей – Дезактин та Хлорантоін заощаджують гроші, оскільки вони є очисниками та дезінфікуючими засобами.

Для запобігання розвитку стійких штамів мікробів слід застосовувати метод кожні 3 місяці.

Таблиця 4.1.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів

Назва миючого/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, м ³ (л)	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувально -го засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації	1-2	2184 м ³	992 м ³	12	1 062
			218,4 м ³	99,2 м ³		1 062
Кальцинована сода	Обладнання, інвентар, комунікації	1-2	2184 м ³	992 м ³	10	1 180
			218,4 м ³	99,2 м ³		1 180
Хлорне вапно	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	1-2	3860	286	20	143
			8280	758		364
Дезакгін	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,2	2860	286	135	211,85
			8280	758		539,3
Гембар	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	5	3860	286	150	190,7
			8280	758		485,3

В промисловому виробництві в якості мийних та дезінфікувальних засобів використовують:

Кальцинована сода у водних розчинах частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі (55 ± 5 °C) розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до (45 ± 5 °C) їх мийна здатність різко падає. Розчини кальцинованої соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію [11].

Хлорне вапно. Для виготовлення 1 чи 2 % розчину хлорного вапна спочатку готують 10 % розчин. У скляній ємкості розчиняють 1 кг хлорного вапна в 10 л води. Воду додають поступово, розмішуючи розчин дерев'яним шпателем. Після розчинення хлорного вапна розчин перемішують ще кілька хвилин і дають відстоятися протягом доби. Після відстоювання розчин фільтрують і виготовляють з нього 1 чи 2% розчин хлорного вапна, взявши відповідно 1000 чи 2000 мл 10% розчину і доводять об'єм до 10 л. Застосовують для поточної дезінфекції поверхонь приміщення, прибирального матеріалу, санітарно-технічного устаткування та комунікацій. Розчин не ушкоджує вироби з нержавіючої сталі, алюмінію, скла, кахлю, полімерних матеріалів.

Каустична сода (їдкий натр, NaOH) добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1–2 %) розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію [12].

Рекомендується використовувати 0,5 % розчини каустичної соди із температурою (45 ± 5 °C) для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також 1 та 2 % розчини із температурою (55 ± 5 °C) для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій.

“Дезактін” – дезінфекційний засіб з мийним ефектом виробництва ТОВ “ДЕЛАНА”. Не кородують об'єкти, котрі виготовлені із металу, скла, гуми,

полімерних матеріалів, деревини, кахлю, порцеляни, фаянсу, а також поверхні технологічного обладнання та устаткування з лакофарбовим, полімерним та гальванічним покриттям, не фіксують білкові та жирові забруднення на оброблених поверхнях, виявляють змочувальні та мийні властивості, добре змиваються. Дезактін виявляє бактерицидні, туберкулоцидні та фунгіцидні властивості. Рекомендується використовувати: 0,2 % розчини дезактину для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю, технологічного та санітарно-технічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари.

“Гембар” добре розчинний у воді. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, полімерних матеріалів та гуми. Після висихання розчину на оброблених поверхнях утворюється плівка. Гембар виявляє бактерицидні та віруліцидні властивості. Рекомендується використовувати 5,0 % розчини гембару для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю та санітарно-технічного обладнання [13].

4.1.4. Обґрунтування підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез біомаси (3 г/л) досягається за умов росту *B. megaterium* NCT-2 на поживному середовищі з наступним складом, (г/л):

- Сахароза – 15;
- KH_2PO_4 – 0,5;
- MnSO_4 – 0,05;
- Дріжджовий екстракт – 3.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 2 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у три стадії (в колбах на качалці та у посівних апаратах об'ємом 20 л, 200 л).

Для вирощування початкового посівного матеріалу використовують середовище, яке наведено раніше. Стерилізація буде відбуватись в автоклаві, через невеликий об'єм поживного середовища. Зважаючи на режим стерилізації компонентів поживного середовища, поділимо його на наступні композиції:

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

Композиція Б: KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: MnSO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Сахароза та дріжджовий екстракт (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. KH_2PO_4 (композиція Б) стерилізується при 131 °С, 40 хв окремо від MnSO_4 для запобігання утворення нерозчинних осадів. MnSO_4 (композиція В) стерилізуються при 131 °С, 40 хв. Стерилізація композицій А, Б і В здійснюється в автоклаві.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

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

Композиція Б: KH_2PO_4 , MnSO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Оскільки для даної стадії біосинтезу потрібно 11 л поживного середовища, для даного процесу змінюють склад композицій (основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію Б). Композицію Б готують в колбі, потім розчин подають у посівний апарат об'ємом 20 л, з сорочкою і мішалкою, де і відбувається стерилізація при рН 4,5. Рівень рН доводять до 4,5, щоб уникнути випадання осаду, для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

Композицію А стерилізують в збірнику за наступних режимів: 112 °С, 0,05 МПа упродовж 30 хв.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Для цієї стадії необхідно 108,5 л поживного середовища, поділ композицій відбувається, як і для попередньої стадії. Композицію А готують і стерилізують в окремому реакторі-змішувачі. Композицію Б готують в окремому збірнику, а стерилізують в інокуляторі (для зменшення ймовірності

контамінації), процес стерилізації відбувається при рН 4,5, щоб уникнути випадання осаду. Для цього середовище підкислюють 6%-м розчином хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації композицій в інокулятор перистальтичним насосом подають композицію А і доводять рН до 7,2 за допомогою внесення 6%-ого розчину натрій гідроксиду.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Виробничий біосинтез буде відбуватись в ферментері об'ємом 2 м³ та для цієї стадії необхідно 1 075,5 л поживного середовища.

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

Композиція Б: КН₂РО₄, МnSO₄ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

В композиції Б об'єднані сіль фосфату та сіль мангану, отже при стерилізації в ферментері доводимо рН до 4...4.5. Стерилізують композицію безпосередньо в ферментері при 131 °С, 40 хв. Композицію А готують в збірнику та стерилізують при 112 °С, 30 хв. Після закінчення стерилізації в ферментер подають композицію А та доводять рН до 7,2 6%-м розчином NaOH.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Проаналізувавши компоненти поживного середовища можна зазначити, що в середовищі відсутні піноутворюючі компоненти тому немає необхідності в попередньому приготуванні і внесенні в поживне середовище піногасника.

Під час стерилізації компонентів поживного середовища, солі були об'єднані в одну композицію тому необхідно передбачити приготування титрувальних агентів, для унеможливлення випадання осадів, також необхідно після стерилізації поживного середовища врегулювати рівень Рн для досягнення оптимальних умов росту *B. megaterium* NCT-2.

Отже необхідно в технологічній схемі передбачити етап підготовки титрувальних агентів, а саме: 6% розчину NaOH та 6% розчину HCl.

Розрахунок вмісту та особливості приготування розчинів та стабілізації рН
середовища

Об'єм середовища, л	NaOH		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
1,1	-	-	-	-
11	22	у колбі на 50 мл	22	у колбі на 50 мл
108,5	217	у колбі на 0,5 л	217	у колбі на 0,5 л
1 075,5	2,15 л	у колбі на 2,5 л	2,15 л	у колбі на 2,5 л

**РОЗДІЛ 5.
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ**

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу біодобрива на основі біомаси *B. megaterium* NST-2

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник металевий, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «ЗГО-ГРУП», Україна [14].
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр G2. Фільтруючий матеріал – синтетичні волокна поліестера, вологостійкість до 100%, термостійкість до 80 оС. Виробник: Компанія «Ліаг Технік Сервіс Україна» [15].
К-3	Компресор	1	Компресор поршневий Intertool PT-0007, продуктивність 420 л/хв, потужність двигуна 3 кВт. Фірма: «Intertool» (Україна) [16].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник фреоновий VENTS ОКФ 400x200-3. Кількість рядів трубок – 3, розмір патрубків – 400x200. Виробник: «Vent-Market» (Україна) [17]
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря Р 750.700, номінальний об'єм 0,75 м3, робочий тиск 10 бар, спосіб установки горизонтальний/вертикальний. Виробник: «Тринсел Груп» (Україна) [18].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник Roep Est двухрядний 100-50, матеріал – алюміній, 0,1 мм. Теплопродуктивність 105,6 кВт, витрата повітря 6500 м3/год. Виробник: Італія. Фірма: «Оллан» (Україна) [19].
Ф-7	Фільтр головний	1	Фільтр F7. Фільтруючий матеріал на тканинній основі, Е = 80-95 %. Виробник: «Свежий воздух» (Росія) [20].

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Середінський А.А.			СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Буценко Л.М.						75
Рецензент						Кафедра БТМ ³⁴		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ФІ-8 ФІ-13 ФІ-19	Фільтр індивідуальний	4	Фільтр індивідуальний НЕРА класу очищення Н14, ефективність 99,995%, площа фільтрації від 2,7 до 20 м ² , пропускна здатність 270-2000 м ³ відповідно. Тестовано згідно EN 1822; стійкість до вологи до 100%; витримує температуру повітря до 70 °С; не містить силікон. Виробник: «NEW FILTER» (Україна) [21].
ПА-9	Посівний апарат	1	Посівний апарат ХС-20L об'ємом 20 л, ширина 50 см, висота 50 см, довжина 145 см, оснащений барботером, температурним датчиком, турбінною мішалкою відкритого типу (250 об/хв), трубою перетискування, пробовідбірником, скло боросилікатне марки 3.3., сталь нержавіюча 304. Виробник: "AG!" (Китай) [22].
Н-10	Насос перистальтичний для перекачування розчину від РЗ-14 у інокулятор ПА- 17	1	Перистальтичний насос МР-3086.9 Максимальний тиск – до 1,4 бар, продуктивність 78 л/год [23]
Р-11	Реактор-змішувач	1	Реактор з нержавіючої сталі 316L об'ємом 15 л; виробник – ХімМікс; довжина – 1300 мм; ширина – 790 мм; висота 1700 мм; оснащений сорочкою та якірною мішалкою [24]**
Р-12	Реактор-змішувач для розчинення розчину солей	1	Реактор з нержавіюча сталь 316L об'ємом 5 л; виробник – Тирит; діаметр 450 мм, висота 1430 мм; оснащений сорочкою та якірною мішалкою [25]

ПА-14	Посівний апарат	1	Посівний апарат об'ємом 200 л, діаметр 1,05 м, висота 2,1 м, оснащений сорочкою, барботером, турбінною мішалкою відкритого типу (250 об/хв), трубою перетискування, пробовідбірником, сталь AISI 304. Виробник: "Mobius" (США) [26].
Д-15	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний ДВСВ-Ф. Мінімальна межа дозування – 5 кг, максимальна – 70 кг. Розміри: 800*600*500 мм; дискретність відліку 0.005 кг. [27].
Р-16	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Об'єм апарату – 200 л; матеріал – нержавіюча сталь; перемішування здійснюється за допомогою якірної мішалки – 50-1000 об/хв; витримує тиск – 1,5 МПа, виробник – Тирит [28].
Н-17	Насос перистальтичний для перекачування розчину від ІН-20 у ферментер ІН-21	1	Перистальтичний насос МР-8. Швидкість обертання 35 об/хв, продуктивність 140 л/год [29]
Р-18	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації розчину	1	Реактор сталевий емальований об'ємом 10 л, виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; довжина – 420 мм; висота - 500 мм; ширина – 350 мм; оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв) [30].
Ф-20	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 2 м ³ , діаметр 1,75 м, висота 3,5 м, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, турбінною мішалкою закритого типу (40-400 об/хв), сталь AISI 304L. Виробник: «Mobius» (США) [26]

Список використаних джерел:

РОЗДІЛ 6.

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема синтезу фосфобактерину бактеріями *B.megaterium* NCT-2 включає в себе допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, приготування титрувальних агентів) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну та апаратурну схему біосинтезу фосфобактерину наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби повітрязабірника (ПЗ-1) у найвищій точці $H = 15$ м.

ДР 1.2. Очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинному фільтрі грубого очищення (Ф-2). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю $E = 90\%$, затримуються частинки $\delta > 50$ мкм.

ДР 1.3. Компресювання повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-3), відбувається нагрівання до 120-200 °С, тиск становить 1,0 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-осушувачі (Т-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи.

НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Середінський А.А.			ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Буценко Л.М.						757
Рецензент						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Рс-5), де усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря (від ДР 1.4) нагрівають до температури 45-50 °С у теплообміннику-нагрівачі (Т-6). Вологість повітря має становити 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить на головний фільтр (Ф-7), установлений біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря має становити 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ФІ-8, ФІ-13, ФІ-20) кожного інокулятора та ферментера (до ТП 4.4, ТП 4.5, ТП 5.1). Ступінь кінцевої очистки повітря становить $E = 99,995\%$ та $KУО = 0$.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6% розчину НСІ

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину НСІ для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 20 л

Потрібно приготувати 22 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища на стадії приготування ПС в інокуляторі об'ємом 20 л.

Для цього в колбу об'ємом 50 мл наливають 18,33 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 3,67 мл 36%-ї НСІ, відміряної мірним циліндром. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 2.1.2. Приготування 6% розчину НСІ для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 217 мл 6%-ї хлоридної кислоти, в колбу об'ємом 0,5 л вносять 180,83 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 36,17 мл 36%-ї НСІ, відміряної мірним циліндром.

ДР 2.1.3. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 2 м³

Для приготування 2,15 л 6%-ї хлоридної кислоти, в колбу об'ємом 2,5 л вносять 1792,5 мл дистильованої води і додають при постійному перемішуванні 357,5 мл 36%-ї HCl, відміряної мірним циліндром.

ДР 2.2. Приготування 6% розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 20 л

Для приготування 22 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду, який буде використаний на етапах нейтралізації середовища при приготуванні ПС для інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л, на технічних терезах зважити 1,32 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 50 мл і додають 22 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 217 мл 6%-го розчину натрій гідроксиду на терезах зважують 13 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 0,5 л і додають 217 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища в ферментері об'ємом 2 м³

Для приготування 2,15 л 6%-го розчину натрій гідроксиду на терезах зважують 129 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають в колбу об'ємом 2,5 і додають 2,15 л води, перемішують до повного розчинення закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту потрібно 1,1 л поживного середовища (ПС). Вміст компонентів для приготування ПС об'ємом 1,1 л наведено у таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1,1 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 1,1 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	15	16,5	А	0,7
Дріжджовий екстракт	3	3,3		
Вода		700 мл		
K_2HPO_4	0,5	0,55	Б	0,25
Вода		250		
$MnSO_4$	0,05	0,055	В	0,15
Вода		150		
Разом:				1,1

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 16,5 г сахарози та 3,3 г дріжджового екстракту і поміщають в колбу об'ємом 2,5 л. Додають 700 мл дистильованої води і перемішують до розчинення сахарози після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K_2HPO_4 – 0,55 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 250 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C, упродовж 40 хв.

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На аналітичних вагах зважують $MnSO_4$ 0,055 г. Наважку поміщають у

колбу об'ємом 250 мл, додають 150 мл водопровідної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, упродовж 40 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Для одержання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 20 л (ПА-9), потрібно приготувати 11 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено у таблиці. 6.2.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парюю у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 10,1 л.

Таблиця 6.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 11 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 11 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	15	165	А	1,2
Дріжджовий екстракт	3	33		
Вода		1,2 л		
K ₂ HPO ₄	0,5	5,5	Б	8,9
MnSO ₄	0,05	0,55		
Вода		8,9		
Конденсат		0,9		0,9
Разом:				11

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 165 г сахарози та 33 г дріжджового екстракту і поміщають в колбу об'ємом 2,5 л. Додають 1,2 л дистильованої води і перемішують до розчинення компонентів після чого закривають ватно-марлевою пробкою, та стерилізують в автоклаві при температурі 112°С упродовж 30 хв.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K_2HPO_4 – 5,5 г та $MnSO_4$ – 0,55 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 250 мл водопровідної води, та перемішують, після розчинення компонентів розчин поміщають в посівний апарат об'ємом 20 л (ПА-9), та за допомогою лічильника додають 8,65 л водопровідної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.1) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у інокуляторі при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 108,5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в таблиці 6.3.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 98,8 л.

Таблиця 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 108,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 108,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	15	1 627,5	А	10
Дріжджовий екстракт	3	325,5		
Вода		10 л		
Конденсат		1 л		1
K_2HPO_4	0,5	54,25	Б	88,8
$MnSO_4$	0,05	5,43		
Вода		88,8		
Конденсат		8,7		8,7
Разом:				108,5

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1 627,5 г сахарози та 325,5 г дріжджового екстракту і поміщають в реактор-змішувач об'ємом 15 л (Р-11). За допомогою лічильника додають 10 л водопровідної води і перемішують. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40°C при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізацію проводять безпосередньо у збірнику при 112°C упродовж 30 хв.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K_2HPO_4 – 54,25 г та $MnSO_4$ – 5,43 г. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-12), додають 3,8 л водопровідної води, та перемішують, після розчинення компонентів розчин поміщають в посівний апарат об'ємом 200 л (ПА-14), та за допомогою лічильника додають 85 л водопровідної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.2) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у інокуляторі при 131°C (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для биробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 2 м³

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 2 м³ (Ф-20), потрібно приготувати 1 073,64 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування даної кількості середовища наведено у таблиці 6.4.

Для визначення необхідної кількості води потрібної на приготування композиції необхідно враховувати конденсат (10%), оскільки стерилізація відбувається гострою парою у посівному апараті. Тоді об'єм води, потрібний для приготування композицій становить 976 л.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1 075,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента для приготування 1 075,5 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Сахароза	15	16 132,5	А	150
Дріжджовий екстракт	3	3 226,5		
Вода		150 л		
Конденсат		15 л		15
K ₂ HPO ₄	0,5	537,8	Б	827,7
MnSO ₄	0,05	53,8		
Вода		827,7		
Конденсат		82,8		82,8
Разом:				1075,5

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно – ваговий дозатор (Д-15) зважують 16 132,5 г сахарози та 3 226,5 г дріжджового екстракту і переносять у реактор – змішувач об'ємом 200 л (Р-16), через лічильник доливають 150 л водопровідної води, перемішують. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають гарячу пару і нагрівають розчин до 40 °С при перемішуванні 50 об/хв. Стерилізацію проводять безпосередньо у реакторі при 112°С упродовж 30 хв.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують K₂HPO₄ – 537,8 г та MnSO₄ – 53,8 г. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-18), додають 8,7 л водопровідної води та перемішують для кращого розчинення солей у сорочку збірника подають гарячу пару і нагрівають розчин солей, після розчинення компонентів розчин подають в ферментер об'ємом 2 м³ (Ф-20), додають 819 л водопровідної води та вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.3) до досягнення рН 4,5. Стерилізацію проводять безпосередньо у ферментері при 131°С (0,15 МПа) упродовж 40 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *B. megaterium* NCT-2 зберігають в холодильнику при температурі 4°C на скошеному агарі. Культуру необхідно пересівати через кожні 2 місяці, оскільки середовище буде пересихати.

Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають у чашку Петрі з МПА для одержання ізольованих колоній. Культивують у термостаті за температури 35°C протягом 24 годин.

ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Одержані ізольовані колонії (від ТП 4.2) пересівають петлею у пробірки з аналогічним поживним середовищем. Культивують у термостаті за температури 35 °C протягом 24 год.

ТП 4.4. Вирощування культури в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 2,5 л із стерильною композицією А (від ДР 3.1.1) зливають простерилізовану композицію Б (від ДР 3.1.2) та композицію В (від ДР 3.1.3), перемішують і розливають по 137 мл у 8 колб об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2 , тоді ставлять колби на качалки.

У пробірку з робочою культурою *B. megaterium* NCT-2 (від ТП 4.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (250 об/хв) за температури 35 °C протягом 24 год.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

В інокулятор об'ємом 20 л, в якому міститься стерильна композиції Б (від ДР 3.2.2), подають композицію А об'ємом (від ДР 3.2.1). Далі вносять 6% розчин NaOH (від ДР 2.2.1) до досягнення рН 7,2. Після оптимізації рН, через

засівну колбу вносять посівний матеріал (від *ТП 4.4*). Культивування здійснюють при температурі 35°C упродовж 24 годин, при постійній аерації 1,5 л/(л*хв) та перемішуванні 200 об/хв.

Кожні 8 год відбирають пробу, здійснюють мікробіологічний контроль і визначають концентрацію біомаси (2 г/л).

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

У посівний апарат з стерильною композиції Б (від *ДР 3.3.2*) самоплином подають композицію А (від *ДР 3.3.1*). Далі вносять 6%-ий розчин NaOH для досягнення оптимального значення рН 7,2 (від *ДР 2.2.2*). Після оптимізації рН подають посівний матеріал за допомогою перистальтичного насосу (Н-10) (від *ТП 4.5*).

Культивування здійснюють при температурі 35 °С упродовж 24 годин при постійній аерації 1,5 л/(л*хв) та перемішуванні 200 об/хв.

Кожні 8 год відбирають пробу і здійснюють мікробіологічний контроль посівного матеріалу, визначають концентрацію біомаси (2 г/л).

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 2 м³

У ферментер об'ємом 2 м³ з стерильною композицією Б (від *ДР 3.4.2*) за допомогою перистальтичного насосу (Н-17) вносять композицію А (від *ДР 3.4.1*), доводять рН середовища до 7,2 додаванням 6% -го розчину NaOH (від *ДР 2.2.3*). Після цього через трубу перетискування подають посівний матеріал (від *ТП 4.6*).

Культивування здійснюють при температурі 35°C упродовж 24 годин при постійній аерації 1,5 л/(л*хв) та перемішуванні 200 об/хв, до досягнення зазначеного рівня біомаси (3 г/л). Кожні 7-8 годин відбирають пробу та здійснюють мікробіологічний контроль.

РОЗДІЛ №7

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

7.1. Обґрунтування стадій отримання готового продукту

“Фофсфобактерин”

7.1.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Першим етапом на шляху отримання продукту є розділення вмісту ферментера на супернатант і біомасу клітин.

Фільтрація – пропускання суспензії через фільтруючий матеріал, під дією різниці тисків рідина проходить через пори і збирається у вигляді фільтрату, а тверді частинки – біомаса, на фільтруючій мембрані. Фільтрація через тканинні фільтри проводиться для частинок розміром від 10 мкм до 1 мм.

Центрифугування – поділ під дією відцентрових сил. Найбільш часто використовується для відділення дріжджів або бактерій. Центрифугування застосовується при щільності часток від 400 до 900 нм; ультрацентрифугування – від 10 нм до 1 мкм [37].

- компактне встановлення в установці, яка залишається корисною та чистою, якщо вона була належним чином спроектована (машини миються автоматично);

- установка може працювати безпілотно, якщо осад відносно постійний. Усі механічні запобіжні механізми входять до стандартного обладнання;

- значне збільшення вмісту сухих твердих речовин, які для деяких шламів наближаються до вмісту сухих твердих речовин, отриманих фільтр-пресами ;

- робота в мережі (без буферного бака), коли центрифуга передуює термічній сушарці або печі;

					НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Лит.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Середінський А.А.</i>						74
<i>Керівник</i>		<i>Буценко Л.М.</i>						47
<i>Рецензент</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

- можливість дуже швидко змінити функції машини; більш-менш ретельне зневоднення до більш-менш тривалого загущення, і це робиться просто шляхом зміни робочих змінних, зазначених у центрифугах високого тиску [38].

Оскільки *Bacillus megaterium* це бактерія з довжиною клітини до 4 мкм і діаметром 1,5 мкм, то найкращим варіантом для відділення біомаси буде центрифугування [39].

Наприклад, надійні центрифуги СЕРА, виготовлені в різних розмірах, забезпечують ефективну, економічно ефективну технологію в безлічі застосувань, починаючи від дослідницької лабораторії і закінчуючи виробничим заводом. СЕРА High Speed Centrifuge ефективно відокремлює від одного до кількох тисяч літрів біологічних культур та інших сумішей, що містять приблизно до 20% твердих речовин за об'ємом. Модель Z8, велика виробнича центрифуга, обробляє від 50 до 1500 літрів, залежно від вмісту твердих речовин. Вологість біомаси після процесу становить 75-85%.

Серед двох технологій, які зазвичай використовуються для розділення рідин, центрифугування та фільтрації, центрифуги СЕРА мають такі переваги:

- Економічний у використанні, без дорогих мембран або інших одноразових матеріалів.

- Швидше; На тій самій підлозі або лаві СЕРА обробляються в рази швидше, ніж системи фільтрації.

- Відсутність марного продукту; з високошвидкісними центрифугами СЕРА розділені тверді та рідкі компоненти легко доступні. Системи фільтрації уловлюють і вбудовують клітинну масу та інші тверді речовини.

- Стабільна продуктивність; Немає погіршення в середині пробігу, оскільки фільтри забиваються. Немає старіння мембрани або змін в партії. Відсутність хімічного вимивання з полімерних фільтрів.

- Міцний; Надміцна конструкція, стійкий до хімікатів і високих температур [40].

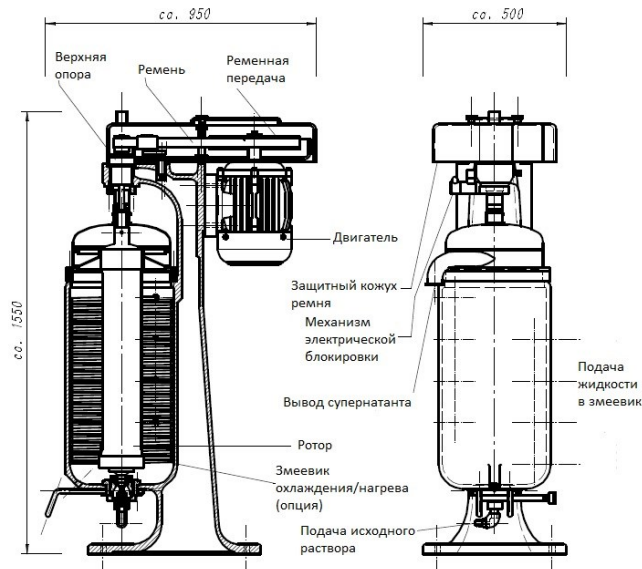


Рис. 7.1. Промислова проточна центрифуга СЕРА Z81

Отже, для відділення біомаси обираємо центрифугування в проточній центрифугі СЕРА Z81. Після центрифугування біомасу перекачують у реактор. У реакторі осад промивають питною водою. Після промивання вологість осаду складає 95%.

7.1.2. Вибір способу сушіння біомаси та відповідного обладнання

Сушіння – процес видалення вологи з матеріалів, при якому використовують теплову енергію для її випаровування та відведення пари, що утворюється.

Для сушіння біологічних об'єктів застосовують різноманітні способи і установки. Вони розрізняються як за агрегатним станом зв'язаної вологи у висушуваному матеріалі (сушіння з рідкого стану або з твердого), а також за способом підведення теплоти (контактна, конвективна і радіаційна).

При контактному сушінні матеріал нагрівається в результаті безпосереднього контакту з гарячими поверхнями (плитами, вальцями і т. п.).

В процесі конвективного сушіння теплота підводиться до висушуваного матеріалу за допомогою газоподібного сушильного агента-теплоносія, який служить джерелом тепла і використовується для відведення вологи, що випаровується. Сушильним агентом при конвективній сушці можуть бути повітря, топкові гази, а в окремих випадках - інертний газ. Інтенсивність сушіння визначається швидкістю теплообміну між сушильним агентом і

висушуваним матеріалом, яка залежить від коефіцієнта теплообміну, різниці температур (рушійної сили процесу теплопередачі) і поверхні контакту.

Конвективний спосіб сушіння відрізняється простотою і можливістю регулювання температури матеріалу

Метод конвективного сушіння знайшов широке застосування в біотехнології і лежить в основі роботи: пневматичних сушарок; розпилюючих сушарок; аерофонтанних сушарок; сушарок з киплячим шаром [41,42].

До переваг розпилювального сушіння можна віднести

- Одноетапна здатність сушіння розпиленням дає можливість завершити процес сушіння за лічені секунди та перевагу перед іншими промисловими методами сушіння.

- Процес працює на основних принципах і піддається автоматизації.

- Процес є універсальним і адаптованим до широкого кола галузей промисловості та їх сировини та специфікацій продукції.

- Практично будь-яку сировину, яку можна перекачувати – розчини, суспензії, суспензії, розплави, пасти, гелі – також можна сушити розпиленням.

- Сушіння розпиленням виробляє порошки з контрольованим розміром частинок і загальною якістю. Інші характеристики, якими керують під час сушіння розпиленням, включають об'ємну щільність, ступінь кристалічності та рівні залишкового розчинника [43].

Наприклад, розпилювальна сушарка Niro модель Production Minor. продуктивністю з випаровування вологи до 35 кг/годину залежно від продукту, зверху обладнана дисковою розпилювальною форсункою. У комплект поставки входить циклон, вентилятор та посадкова рама.

Установка Production Minor є прямою розпилювальною сушаркою з відцентровим дисковим розпиленням, верхнім підведенням теплоносія, вертикальною циліндричною камерою і дном киплячого шару продукту, з наступним його охолодженням у віброохолоджувачі. Нагрівання повітря проводиться теплогенератором (парокалорифером). Відділення сухого

продукту - в циклонах та/або системі очищення рукавними фільтрами. Залишкова вологість напівпродукту складає близько 5 %.



Рис. 7.2. Прямотечійна дискова розпилювальна сушарка Production Minor

Принцип роботи установки полягає у зневодненні диспергованого в обсязі сушильної камери на найдрібніші частинки рідкого продукту нагрітим повітрям. За допомогою розпилювача продукт розпорошується (диспергується) в обсязі сушильної камери. Повітря з приміщення очищається повітряним фільтром і подається нагнітальним вентилятором в газовий теплогенератор, і далі в повітрярозподільній пристрій сушильної камери. У результаті взаємодії потоків нагрітого повітря і розпорошеного продукту в сушильній камері відбувається процес зневоднення крапель продукту і утворення твердих сухих частинок. Установка сушильна може працювати в двох режимах - ручному (дистанційному) і автоматичному. Температура теплоносія на вході 150 °С на виході 65 °С. Регульованим параметром є температура повітря на виході з сушильної камери, температура вхідного повітря. Необхідна температура визначається видом продукту, уточнюється при налагодженні установки і задається за допомогою приладу автоматичного регулювання [44,45].

Отже, для сушіння біомаси обираємо прямотечійну дискову розпилювальну сушарку Production Minor.

7.1.3. Змішування з наповнювачем та вибір відповідного обладнання

Висушені клітини змішують із наповнювачем. В якості наповнювача використовується каолін порошковий (у співвідношенні 1:1) [46].

При внесенні наповнювача застосовують різні типи змішувачів (періодичні та безперервні). Коли необхідно змішати два або більше сухих препаратів або ввести наповнювач використовують змішувачі періодичної дії планетарних методів. Наприклад, представником таких змішувачів є тип ПШ.

Сипучий матеріал, який підлягає змішуванню завантажують через верхній штуцер в кришці в необхідних кількостях, при обертанні шнека матеріал піднімається його витками вгору близько стінок корпусу. Потім матеріал рухається до осі корпусу, де утворюється спадний потік матеріалу. У вузькій частині корпусу матеріал знову захоплюється витками шнека і піднімається вгору [47].

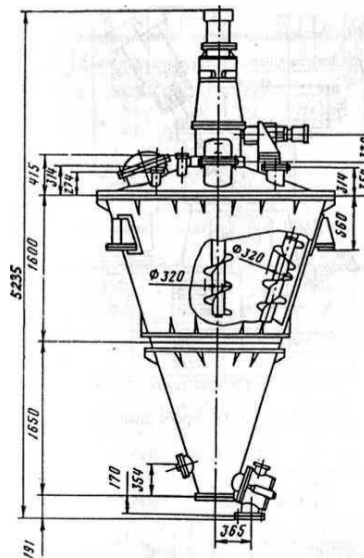


Рис. 7.3. Змішувач планетарно-шнековий типу ПШ

Змішувач планетарно-шнековий ПШ-р49 (р62) характеризується широким асортиментом змішуваних матеріалів, високою якістю змішування, повним виключенням зависання порошків при розвантаженні [48].

7.1.4. Пакування препарату та вибір відповідного обладнання

Розфасовують препарат у поліетиленові пакети по 200 г. В кожному грамі сухого доброякісного фосфоробактерину повинно міститися не менше $8 \cdot 10^9$

КУО/г (життєздатність клітин $\geq 90-95\%$). На відміну від нітрагіну й азотобактерину фосфобактерин має більшу стійкість при зберіганні [10].



Рис. 7.4. Фасувально-пакувальний автомат ЛЮКС ПАК

Фасувально-пакувальний автомат ЛЮКС ПАК з об'ємним дозатором. Призначений для фасування сипучих, гранульованих, порошкоподібних і дрібноштучних продуктів (цукор, сіль, крупи, сіль, гранули, порошки і т. д.) в харчовій, косметичній та інших галузях. Матеріал для пакування – поліетиленова плівка. Зварювання плівки відбувається - внапуск внутрішніми шарами. Виконання автомата з застосуванням пневмопривода. Продуктивність, до 40 уп/хв [49].

7.1.5. Маркування та вибір відповідного обладнання

Для маркування продукції використовують автомат для виготовлення етикеток GLM-Emaxx. Точність зважування та нанесення етикеток — це істотна економія часу. GLM-Emaxx є автоматичною системою для маркування продукції з компактною конструкцією, що найкраще підходить для підприємств невеликої потужності.

Придатний для використання у багатьох галузях: GLM-Emaxx використовується для нанесення етикеток, що містять змінні дані про продукт. Дуже зручний для застосування на підприємствах з невеликими обсягами виробництва. GLM-Emaxx наочно показує, що для досягнення високої

продуктивності зовсім не обов'язково мати велике приміщення. Цей компактний автомат може працювати як самостійна установка з ручною подачею на невеликій площі, а також інтегруватися в існуючі виробничі лінії для автоматичного маркування продуктів [50].



Рис. 7.5. Автомат для виготовлення етикеток та маркування продукції GLM-Emaxx 50/70

На етикетці повинно бути вказано:

- Зовнішній вигляд (однорідний порошок світло-сірого або жовтого кольору)
- Склад (*Bacillus megaterium*: $8 \cdot 10^9$ КУО/г (життєздатність клітин $\geq 90-95\%$); допоміжні речовини: каолін порошковий (у співвідношенні: 1:1)
- Масова частка води (близько 5%)
- Мікробіологічна чистота (препарат не містить сторонньої мікрофлори)
- Умови зберігання (зберігати у сухому місці за температури -25°C до $+25^{\circ}\text{C}$)
- Термін зберігання (практично не обмежений)
- Застосування (препарат із стимулюючим ефектом, рекомендується для обробки зернових культур, картоплі, цукрових буряків)
- Виробник [36].

Отже, загальна схема отримання готового продукту:

- Відділення біомаси центрифугуванням (промислова проточна центрифуга СЕРА Z81)
- Промивання осаду питною водою
- Сушіння біомаси (прямотечійна дискова розпилювальна сушарка Production Minor)
- Змішування з наповнювачем (змішувач планетарно-шнековий ПШ-р49)
- Пакування в поліетиленові пакети (фасувально-пакувальний автомат ЛЮКС ПАК)
- Маркування (автомат для виготовлення етикеток та маркування продукції GLM-Emaxx 50/70)

7.2. Орієнтовний продуктовий розрахунок з врахуванням особливостей процесів і втрат по кожній стадії отримання продукту

Загальні втрати при отриманні готового продукту “Фосфобактерин”

складають 15%

Враховуючи, що концентрація біомаси для *Bacillus megaterium* становить 3 г/л, то об'єм від центрифугованої біомаси становитиме $1065000 \text{ (г)} \times 3 \text{ (г)} / 1000 \text{ (г)} = 3195 \text{ г}$ біомаси; відомо, що після центрифугування отримуємо $3,1 \times 80 / 5 = 49,6$ кг біомаси вологістю 80% (без врахування втрат). *Втрати при центрифугуванні складатимуть 5%: $49,6 \times 0,05 = 2,48$ кг втрат, $49,6 - 2,48 = 47,12$ кг біомаси вологістю 80% з врахуванням втрат.* Отже, для відділення біомаси обираємо проточну центрифугу СЕРА Z81 з продуктивністю 500 л/год.

Після промивання осаду питною водою вологість біомаси повинна становити 95%, $47,12 \times 95 / 80 = 55,96$ кг біомаси вологістю 95%. *Втрати відсутні.*

Після чого біомасу відправляють на сушіння для видалення залишкової вологи. Потрібно отримати висушений препарат з вологістю 5%. Оскільки після промивання вологість біомаси становить 95%, то: $55,96 \times 5 / 95 = 2,9$ кг висушеного препарату з вологістю 5% (без врахування втрат). *Втрати при*

сушінні складатимуть 10%: $2,9 \times 0,1 = 0,3$ кг втрат. З врахуванням втрат об'єм висушеного препарату становитиме $2,9 - 0,3 = 2,6$ кг висушеної біомаси з врахуванням втрат. Отже, для сушіння обираємо прямотечійну дискову розпилювальну сушарку Production Minor продуктивністю за випаровуваною вологою 35 кг/год.

Висушену біомасу змішують з наповнювачем (каолін) у співвідношенні 1:1. $2,6 \times 2 = 5,2$ кг готового препарату “Фосфобактерин”. Змішування з наповнювачем проводять в планетарно-шнековому змішувачі ПШ-р49. *Втрати відсутні.*

Таблиця 7.1

7.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання	
			Надійшло	Втрати	Вийшло		
1	2	3	4	5	6	7	
ТП 6. Зберігання культуральної рідини							
1	ТП 6. Зберігання культуральної рідини	КР	1065 л	-	1065 л	Збірник КР об'ємом 1500 л	
ТП 7. Відділення біомаси							
2	ТП 7.1. Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	3,1 кг	5 % (0,16 кг)	3,1 – 0,16 = 2,9 кг біомаси та 44,22 л рідини (47,12 кг, вологість 80%)	Збірник об'ємом 5 л	промислова проточна центрифуга СЕРА Z81 продуктивністю 500 л/год (час роботи 2 год)
		Нативний розчин	1061,9 л	44,22 л	1061,9 – 44,22 = 1017,68 л	Збірник об'ємом 1500 л	
ТП 8. Промивання осаду							
3	ТП 8. Промивання осаду	Біомаса, вологість 80%	47,12 кг	-	55,96 кг, вологість 95%	Збірник об'ємом 80 л	

ТП 9. Сушіння							
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>1</i>
4	ТП 9.1. Сушіння в розпилювальній сушарці	Біомаса, вологість 95%	55,96 кг	10% (0,3), Видалення вологи (55,96 – 2,9 = 53,06 л)	2,9 – 0,3 = 2,6 кг	Збірник об'ємом 4 л	Прямотечійна дискова розпилювальна сушарка Production Minor Продуктивність за випаровуванню вологою, кг/год: 35 (час роботи 1,5 год)
ТП 10. Стандартизація							
6	ТП 10.1. Введення наповнювача	Біомаса, вологість 5%	2,6 кг	-	2,6 + 2,6 (каолін) = 5,2 кг готового препарату	Планетарно-шнековий змішувач ПШ-р49 Робочий об'єм камери 10 л (час роботи 1 год)	
ПМВ 11. Пакування, маркування, відвантаження							
7	ПМВ 11.1. Фасування, пакування, маркування	Готовий препарат вологістю 5%	5,2 кг	-	5,2 кг	Фасувально-пакувальний автомат ЛЮКС ПАК. Продуктивність, уп/хв: 40. Автомат для виготовлення етикеток та маркування продукції GLM-Emaxx 50/70 Продуктивність: 60 етикеток на хвилину	

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

8.1.1. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Контроль чистоти проводиться шляхом висіву зразка на чашку Петрі методом виснажувального штриха або мікроскопіюванням. Для перевірки мікробіологічної чистоти культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій (інкубують 36 год за температури 37 ± 2 °С), і на чашки з сусло–агаром (СА) для виявлення дріжджів і грибів (інкубують 7 діб за температури 30 ± 2 °С) [31].

Мікроскопіюють зразок з імерсією, використовуючи препарат «роздавлена крапля», використовуючи об'єктив 90×. Клітини *Bacillus megaterium* NCT-2 – рухливі, прямі або злегка зігнуті палички з квадратними кінцями, що забарвлюються за Грамом позитивно (рис. 7.1) з діаметром клітин $1,2-1,5 \times 2,0-5,0$ мкм. Утворюють спори, мають перитрихіально розміщені джгутики, капсулу не утворюють, розташовуються попарно або ланцюжками [32].

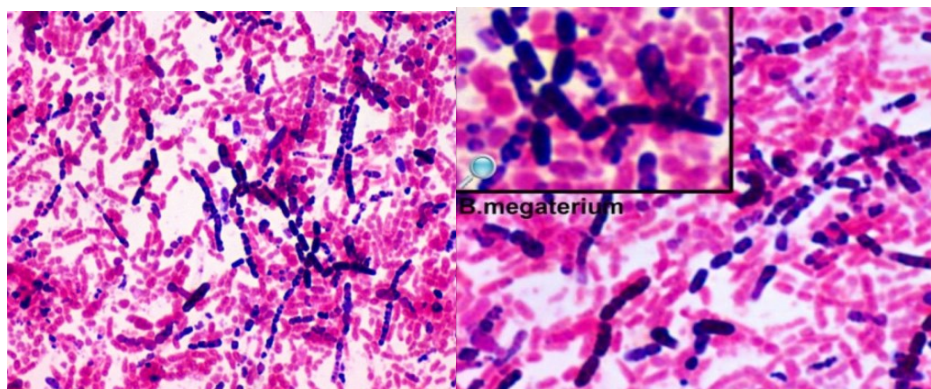


Рис. 8.1. Вигляд пофарбованих за Грамом клітин *B. megaterium* під мікроскопом Джерело інформації?

НУХТ БТЕК 04.02.13 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
		Середінський А.А.			КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Лім.	Арк.	Акрушіє
		Буценко Л.М.						75
						Кафедра БТМ		
		Стабніков В.П.						

8.1.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Відбирають пробу простерилізованого поживного середовища (50 мл), висівають 0,1 мл з цієї кількості на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром – для виявлення бактерій і сусло-агаром – для виявлення грибів та дріжджів. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають у термостат для інкубації за температури 32-34 °С протягом 1-2 діб (бактерії) та за 24-26 °С протягом 3-5 діб (гриби, дріжджі). На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [31].

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Визначення кількості життєздатних клітин

Кількісний підрахунок живих клітин проводиться методом Коха: в асептичних умовах відбирають 1 мл культуральної рідини і поміщають у 9 мл фізіологічного розчину, потім послідовно новою піпеткою переносять по 1 мл у ряд пробірок з 9 мл фізіологічного розчину. З одержаних (попередньо ретельно перемішаних) розведень здійснюють висів 0,1 мл рідини на поверхню м'ясо-пептонного агару в чашки Петрі, рівномірно розподіляючи вміст чашки по всьому її об'єму. Засіяні чашки ставлять у термостат за температури 37±1°С і через 3 доби здійснюють підрахунок колоній за формулою:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

де a – середнє число колоній, V - об'єм суспензії, 10^n – коефіцієнт розведення.

Концентрація живих клітин має бути мінімум 8×10^9 КУО/мл.

8.2.2. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси *B.megaterium* NCT-2 визначають ваговим методом [34]. Спочатку здійснюють висушування алюмінієвого бюкса до постійної маси, зважують їх і поміщають в ексікатор з безводним кальцію сульфатом. Пробу культуральної рідини центрифугують (10000 g, 5 хв), супернатант

зливають, а вологий осад поміщають у бюкс і зважують. Далі бюкс висушують у вакуумній печі за температури 100 °С до постійної маси, після чого знову зважують. Обчислюють різницю мас до і після висушування та переводять у г/л за формулою:

$$M = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

де М – суха біомаса, г/л;

А - маса бюкса з осадом до висушування, г;

В – маса бюкса з осадом після висушування, г;

V – об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування, мл.

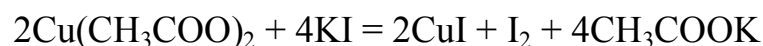
8.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в поживному середовищі є сахароза, концентрацію якої будемо визначати в супернатанті, отриманому після відділення біомаси, методом ВЕРХ [34] за таких умов: колонка Alltima Amino (4.6×250 мм, 5 мкм), рухлива фаза – суміш ацетонітрил:вода (75:25 об/об), швидкість подачі елюента – 1 мл/хв, температура – 35 °С, детектор – рефрактометричний.

8.2.4. Визначення концентрації джерела азоту

Основним джерелом азоту в даному середовищі є дріжджовий екстракт, тому будемо визначати кількість амінного азоту, мідним способом. Суть даного методу полягає в тому, що до супернатанту (отриманого після відділення біомаси та підлужнення 0,1 М розчином натрію гідроксиду) додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні сполуки, які відділяють від нерозчинного ортофосфату міді фільтруванням. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [35].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентному кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію, після чого обчислюють кількість амінного азоту в мг/л, врахувавши, що 1 мл 0,01 М розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту [36].

8.3. Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
ДР 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i> К _Т	<i>повітрозабірник</i> висота повітрозабірника	–	під час купівлі та встановлення	H = 15 м
ДР 1.2 <i>Очистка від грубих домішок</i> К _Т	<i>повітря після</i> <i>проходження фільтра</i> <i>грубої очистки</i> ступінь очистки	згідно з паспортом фільтра	після проходження через фільтр	E = 90 %
ДР 1.3 <i>Компресіювання повітря</i> К _Т	<i>стиснене повітря після</i> <i>проходження компресора</i> тиск, температура	манометр, термометр	після проходження через компресор	P = 1,0 МПа t° = 120 – 200 °C
ДР 1.4 <i>Охолодження повітря та</i> <i>видалення вологи</i> К _Т	<i>охоложене повітря</i> температура, вологість	термометр, психрометр	після охолодження	t° = 25–30 °C W = 60–70 %

Продовження таблиці 7.1

<p>ДР 1.5 <i>Нагрівання повітря</i> K_T</p>	<p><i>нагріте повітря</i> температура, вологість</p>	<p>термометр, психрометр</p>	<p>після нагрівання</p>	<p>t° = 45–50 °C W = 50 %</p>
<p>ДР 1.6 <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i> K_T</p>	<p><i>повітря після проходження головного фільтра</i> ступінь очищення</p>	<p>згідно з паспортом фільтра</p>	<p>після проходження через фільтр</p>	<p>E = 95 %</p>
<p>ДР 1.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i> K_T</p>	<p><i>повітря після проходження індивідуального фільтра</i> ступінь очищення</p>	<p>згідно з паспортом фільтра</p>	<p>після проходження через фільтр</p>	<p>E = 99,995 %</p>
<p>ДР 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 <i>Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища</i> K_T</p>	<p><i>розчин хлоридної кислоти</i> концентрація</p>	<p>за густиною розчину</p>	<p>після приготування розчину</p>	<p>ρ(6 % HCl) = 1,0279 г/мл</p>

Продовження таблиці 7.1

<p>ДР 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 <i>Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища</i> K_T, K_M</p>	<p><i>розчин натрію гідроксиду</i> концентрація, тиск, час, стерильність</p>	<p>визначення концентрації за густиною розчину, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Концентрація – після приготування розчину, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>$\rho(6\% \text{ NaOH}) =$ $1,0648 \text{ г/мл}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 40 \text{ хв}$ стерильність</p>
<p>ДР 3.1.1, 3.2.1 <i>Приготування та стерилізація композиції А</i> K_T, K_M</p>	<p><i>композиція А</i> тиск, час, стерильність</p>	<p>манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>$P = 0,05 \text{ МПа}$ $t = 30 \text{ хв}$ стерильність</p>
<p>ДР 3.1.2 <i>Приготування та стерилізація композиції Б</i> K_T, K_M</p>	<p><i>композиція Б</i> тиск, час, стерильність</p>	<p>манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15 \text{ МПа}$ $t = 40 \text{ хв}$ стерильність</p>

<p>ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В K_T, K_M</p>	<p>композиція В тиск, час, стерильність</p>	<p>манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа t = 40 хв стерильність</p>
<p>ДР 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б K_T, K_M</p>	<p>композиція Б рН, температура, тиск, час, стерильність</p>	<p>датчик рН, датчик температури, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>рН – перед стерилізацією, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>рН = 4,5 P = 0,15 МПа t° = 131 °С t = 40 хв стерильність</p>
<p>ДР 3.3.1, 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А K_T, K_M</p>	<p>композиція А температура розчинення, частота обертання мішалки, час і температура стерилізації, тиск, стерильність</p>	<p>манометр, датчик температури, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура розчинення та швидкість перемішування підтримуються автоматично, тиск, час – безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль – після стерилізації</p>	<p>t° (розчинення) = 40 °С n = 50 об/хв P = 0,05 МПа t° = 112 °С t = 30 хв стерильність</p>

<p>ТП 4.1 Підтримання колекційної культури K_T, K_M</p>	<p>колекційна культура <i>Bacillus megaterium</i> NCT-2 температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці</p>	<p>t° = 4 °C мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 4.2 Одержання робочої культури K_T, K_M</p>	<p>робоча культура <i>Bacillus megaterium</i> NCT-2 на чашках Петрі температура, час, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування</p>	<p>t° = 35 °C t = 24 год мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 4.3 Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах K_T, K_M</p>	<p>робоча культура <i>Bacillus megaterium</i> NCT-2 у пробірках температура, час, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається під час вирощування в термостаті, мікробіологічний контроль – після вирощування</p>	<p>t° = 35 °C t = 24 год мікробіологічна чистота</p>

<p>ТП 4.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках K_T, K_M</p>	<p>посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота</p>	<p>термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура контролюється під час культивування, мікробіологічний контроль – після культивування</p>	<p>$t^\circ = 35\text{ }^\circ\text{C}$ $t = 24\text{ год}$ $n = 250\text{ хв}^{-1}$ мікробіологічна чистота</p>
<p>ТП 4.5, 4.6 Вирощування культури в інокуляторах об'ємом 20 і 200 л K_T, K_M</p>	<p>посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, витрата аераційного повітря, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, датчик рН, годинник, тахометр, ротаметр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси та мікробіологічний контроль – кожні 8 год і після культивування</p>	<p>$pH = 7,2$ $t^\circ = 35\text{ }^\circ\text{C}$ $t = 24\text{ год}$ $v = 1,5\text{ л}/(\text{л} \cdot \text{хв})$ $n = 200\text{ хв}^{-1}$ $X = 2\text{ г}/\text{л}$ на кінець культивування; мікробіологічна чистота</p>

<p>ТП 5.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 2 м³</i> K_T, K_M</p>	<p><i>культуральна рідина</i> температура, час, швидкість перемішування, витрата вуглекислого газу, рН, концентрація біомаси, концентрація живих клітин, мікробіологічна чистота</p>	<p>датчик температури, рН, годинник, тахометр, ротаметр, мікробіологічний контроль</p>	<p>t°, рН, швидкість перемішування та витрата аераційного повітря підтримуються автоматично, визначення концентрації біомаси, концентрації живих клітин, мікробіологічний контроль – кожні 8 год</p>	<p>$pH = 7,2$ $t^\circ = 35^\circ C$ $t = 24$ год $n = 200$ хв⁻¹ $v = 1,5$ л/(л*хв) $X = 3$ г/л на кінець культивування $N = 8 \cdot 10^9$ КУО/мл мікробіологічна чистота</p>
---	--	--	--	--

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Компанія «Біоінвест-Агро» біопрепарат «Фосфобактерин»
<https://bioinvest.com.ua/biopreparaty/mikrobnnye-preparaty/203-fosfobakterin>
2. Microencapsulation of *Bacillus megaterium* NCT-2 and its Effect on Remediation of Secondary Salinization Soil [Електронний ресурс] / Yaowei Chi, Daxin Wang, Miao Jiang та ін.] // Journal of Microencapsulation. – 2019. – Режим доступу до ресурсу: [DOI:10.1080/02652048.2019.1705409](https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1705409)
3. Фосфатмобілізуючі бактерії як компоненти гранульованих мікробних препарат комплексної дії [Електронний ресурс] / [І. К. Курдиш, Рой А.О, Булавенко Л.В та ін.] // Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України вул. академіка Заболотного, 154, м. Київ, Україна, 03143 – Режим доступу до ресурсу: УДК 631.847.21:812.12.
4. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kreatorlab.ru>
5. Мікробіологія харчових продуктів. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051701 "Харчові технології та інженерія" ден. та заоч. форм навчання / Уклад.: С.М. Тетеріна, Н.М.Грегірчак. – К.: НУХТ, 2013. – 97 с.
6. P. J. White / The Nutrition of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus* Journal of General Microbiology (1972) 28 February 1972
7. Компанія «Біоінвест-Агро» біопрепарат «Фосфобактерин» [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://bioinvest.com.ua/biopreparaty/mikrobnnye-preparaty/203-fosfobakterin>
8. Посевная 2021: структура посевов, затраты, прогнозы и ожидания агрохолдингов [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://latifundist.com/spetsproekt/788-posevnaya-2021-struktura-posevov-zatraty-prognozy-i-ozhidaniya-agroholdingov>
9. . A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation [Електронний ресурс] / J.Kuhn, H. Müller, D. Salzig, P. Czermak //

Electronic Journal of Biotechnology – Режим доступу до ресурсу:
[DOI:10.1016/j.ejbt.2015.01.005](https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.005) .

10. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.

11. Regnum Prokaryotae, Abis Encyclopedia, *Bacillus licheniformis*, Electronic resource [access mode]:
<https://www.tgw1916.net/Bacillus/licheniformis.html>

12. G.D. Gojgic-Cvijovic, D.M. Jakovljevic, B.D. Loncarevic, N.Mic, K. Loos, V.P. Beskoski. Todorovic,, M.M. Vrvic, Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium 2018, 175 (6): 3068-83. doi: 10.1007/s12010-015-1475-8.

13. Лысак В.В., Желдакова Р.А., Фомина О.В. Микробиология. Практикум: пособие – Минск: БГУ, 2015. – 115 с.

14. [Електронний ресурс] // Режим доступу:
<https://kalinovkakiiev.flagma.ua/povitrozborniki-o1931156.html>

15. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/p985243888-filtr-gruboj-ochistki.html>

16.[Електронний ресурс] // Режим доступу:
<http://intertool.ua/product/kompressor-50l-4hp-3kvt-220v-8atm-420lmin-2-tsilindr>.

17. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://vent-market.com.ua/shop/product/vents-okf-400h200-3>

18. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/p22678337-resivery-szhatogo-vozduha.html?&primelead=MS4x>

19. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/p861987679-teploobmennik-roen-est.html?&primelead=My4y>

20. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://fresh-air.moscow/statja-1/>

21. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/hepa-filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html>
22. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://kreatorlab.ru>
23. [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.vicaqua.com.ua/chemical_pumps/peristaltic_pumps/mp-3/
24. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratoryj-reaktor-15-1>
25. [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_gomo.php
26. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.merckmillipore.com/NL/en/product>
27. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://polytechnic.com.ua/uk/products-ukr/dvsv-f-ukr/>
28. [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.el-vent.ru/ventilyaciya-i-kondicionirovanie/filtry-dlya-ventilyacii/gruboy-ochistki/klass-g4-eu4/filtr-vozdushnyj-panelnyj-fvp-fyap-vp-klass-ochistki-g2-g5-iz-him-volokna/#tabs-tehnicheskie_harakteristiki
29. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.kolossal.com.ua/index.php?page=production&id=17&sid=46>
30. [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ru.php
31. Прунтова, О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно ; Владим. гос. ун-т. - Владимир : Издво ВлГУ, 2005. - 76 с. - ISBN 5-89368-586-5.
32. Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition [Электронный ресурс] / James Versalovic, Karen S. Carroll, Guido Funke та ін.] // ASM Press, 1752 N St. NW, Washington, DC 20036-2904, USA. – 2011. – Режим доступа до ресурсу: [DOI: 10.1128/9781555816728](https://doi.org/10.1128/9781555816728)

33. Красінько В.О. Основи екобіотехнології: Конспект лекцій для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 143 с.
34. Cell dry weight measurement [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://user.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab9c.htm>.
35. Lin L., Zhang Z., Tang H., Guo Y., Zhou B., Liu Y., Huang R., Du L., Pang H. Enhanced sucrose fermentation by introduction of heterologous sucrose transporter and invertase into *Clostridium beijerinckii* for acetone–butanol–ethanol production. *R. Soc. Open Sci.* 2021, 8: 201858. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.201858>.
36. Визначення вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>.
37. Рамні фільтр-преси. ENCE GmbH, 2021. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://oil-filters.ru/frame_filters/
38. Centrifugation: its advantages and its limitations, 2021. Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://www.suezwaterhandbook.com/processes-and-technologies/liquid-sludge-treatment/centrifugation/centrifugation-its-advantages-and-its-limitations>
39. **Bacillus Megaterium** або **B. Megaterium**. Fengchen Group Co., 2020. Електронний ресурс [Режим доступу]: <http://ua.fengchengroup.net/enzymes-and-bio-products/probiotics/bacillus-megaterium-or-b-megaterium.html>
40. CEPA High Speed Centrifuges for Laboratory & Industrial Processing, 2007. Електронний ресурс [Режим доступу]: http://www.knbs.co.kr/product_cepa.htm
41. Кондуктивне сушіння. 2020. Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://mppnik.ru/publ/672-konduktivnaya-kontaktnaya-sushka.html>
42. Вивчення класифікації, конструкції та принципу дії сушарок. Методичні вказівки для студентів спеціальність 181 «Харчові технології, - Таврійський державний агротехнологічний університет, 2017 – 17с.

43. Конспект лекцій з дисципліни «Сучасні технології сушіння та випалювання матеріалів» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня зі спеціальності 144 Теплоенергетика / Укл. доцент А.П. Рижов, доцент І.С. Долгополов. - Кам'янське, ДДТУ, 2016. - 75с.

44. Розпилювальна сушарка Niro потужністю до 35 кг/год. PerryVidex LLC, 2020. Електронний ресурс [Режим доступу]:

<https://perryvidex.prom.ua/p1417310274-raspylitelnaya-sushilka-niro.html>

45. Сушильна установка. ПрАТ "Калинівський машинобудівний завод", 2021. Електронний ресурс [Режим доступу]:

<https://kmbp.com.ua/produksiya/rishennia-dlia-molochnoi-promyslovosti/sushilni-ustanovki/sushylna-ustanovka-a1-or2ch>

46. Значення бактеріальних добрив, 2022. Електронний ресурс [Режим доступу]: <https://stom.tilimen.org/lekciya-1-vstup-istoriya-rozvitku-mikrobiologiyi-plan.html?page=11>

47. Данилов І.П. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник.- Харків: НТУ, 2008. – 272 .

48. Обладнання для виробництва високодисперсних матеріалів. НПП ДИСПОД, 2022. Електронний ресурс [Режим доступу]:

<https://docplayer.com/79041355-Katalog-produkcii-npp-dispod.html>

49. Фасувально-пакувальний автомат ЛЮКС ПАК з об'ємним дозатором. ЛЮКС ТЕРМ, 2022.Електронний ресурс [Режим доступу]:

<https://lux-term.com.ua/p1126294377-fasualno-pakuvalnij-avtomat.html>

50. Етикетувальний автомат GLM-Emaxx 50/70. ТОВ «БІЦЕРБА УКРАЇНА», 2020. Електронний ресурс [Режим доступу]:

https://www.bizerba.com/uk_ua/%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%82%D0%B8/%D1%81%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%B8-%D0%BC%D0%B0%D1%80%D0%BA%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F/%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B5%D1%82%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B8%D0%B9-

[%D0%B0%D0%B2%D1%82%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82-glm-
emaxx/glm-emaxx-5070/glm-emaxx-5070.html](http://www.gnu.org/licenses/licenses.html#gnulibre)