

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
_____ Грегірчак Н.М. _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ____ » _____ 2021р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Пирог Т.П. _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ____ » _____ 2021р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: Культивування *Bacillus licheniformis* для одержання кератинази

Виконала: здобувач 3 курсу, групи 1ск

_____ Барановська Юлія Володимирівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ Красінко Вікторія Олегівна _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ Годовський О.В. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) _____ біотехнології та екологічного контролю _____

Кафедра _____ біотехнології і мікробіології _____

Освітній ступінь _____ **бакалавр** _____

Спеціальність _____ **162 «Біотехнології та біоінженерія»** _____

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“28” жовтня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Барановської Юлії Володимирівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus licheniformis*
для одержання кератинази

керівник роботи Красінько Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27” жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем роботи 31.01.2021 року

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера – 1м³

коефіцієнт заповнення ферментера при культивуванні – 0,6

цільовий продукт біосинтезу - кератиназа

біологічний агент - *Bacillus licheniformis*

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

Характеристика кератинази, як кінцевої продукції виробництва,

характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування,

обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис

технологічної схеми, контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема виробництва кератинази формату А1 – 1 аркуш

Технологічна схема виробництва кератинази формату А1 – 1 аркуш

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання «28» жовтня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика кератинази, як кінцевої продукції виробництва	28.10.20 – 05.11.20	
2	Характеристика біологічного агента	04.11.20 – 11.11.20	
3	Техніко-економічне обґрунтування	10.11.20 – 16.11.20	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	17.11.20 – 26.11.20	
5	Специфікація обладнання	27.11.20 – 05.12.20	
6	Опис технологічної схеми	05.12.20 – 20.12.20	
7	Контроль виробництва	20.12.20 – 05.01.21	
8	Підготовка реферату та вступу	05.01.21 – 10.01.21	
9	Оформлення кваліфікаційної роботи	10.01.21 – 30.01.21	
10	Оформлення графічної частини	10.01.21 – 30.01.21	

Здобувач

(підпис)

Барановська Ю.В.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

Красінсько В.О.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено дипломний проект виробництва ферменту кератинази культивуванням штаму *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД. Продуктивність штаму продуцента становить 96 ОД/мл. Річна потреба - 400000000 ОД/рік.

Технологічна схема біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовка приміщення і персоналу, а також підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту, виробничого біосинтезу) та технологічного процесу – виробничого біосинтезу.

Дипломний проект складається зі вступу, сімох розділів, графічної частини, в якій представлено технологічна схема апаратурна схема, списку використаної літератури. Загальний обсяг роботи — 58 сторінок, 7 таблиць та 6 рисунків.

Ключові слова: *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД, фермент, бактерії, виробниче культивування.

Зміст

ЗМІСТ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика кератинази, як кінцевої продукції виробництва.....	9
РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента.....	12
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	16
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту.....	18
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	19
3.1. Потреба у цільовому продукті та розрахунок потужності виробництва.....	19
3.2. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	22
3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	23
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	25
4.1. Обґрунтування вибору умов культивування.....	25
4.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря..	26
4.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів.....	27
4.4. Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу.....	30
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	32
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	38
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	52
7.1. Мікробіологічний контроль	52
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	53
7.2.1. Концентрація біомаси.....	53
7.2.2. Концентрація джерела вуглецю.....	53
7.2.3. Концентрація цільового продукту.....	54
7.3. Карта постадійного контролю.....	54
ЛІТЕРАТУРА.....	60

ВСТУП

Важливим завданням сучасної біотехнології є розробка наукових основ та інженерних рішень для одержання продуктів, що мають широкі перспективи практичного використання. Одне з провідних місць серед них належить ферментам мікробного походження, які застосовують у різних галузях промисловості та господарства.

Внесок птахівничої галузі в виробництво м'яса в Україні становить 400 тис. т в рік. При цьому утворюється близько 120 тис. т. відходів патрання птиці, що створює значну проблему для переробної галузі і потребує вирішення наступних завдань: забезпечення біологічної безпеки; забезпечення екологічної безпеки; виробництво корисних для людини продуктів (білків, жиру, біологічно активних речовин і т.д.); виробництво енергії.

Серед усіх відходів патрання птиці найбільший інтерес представляє перопухова сировина, в якій міститься близько 65% кормового білка. Рішення проблеми переведення основного білка пера в засвоювану форму має першочергове значення як з позиції мобілізації резервів тваринного білка, так і з точки зору охорони навколишнього середовища.

Слід визнати, що технологічні рішення з переробки органічних відходів біологічним способом в промисловому птахівництві не мають достатньої наукової бази. Без знання особливостей процесу біотермічної переробки органічних сумішей процес ферментації може привести до невідомих і навіть негативних результатів. Замість цінних нових видів продукції можна отримати в кращому випадку баластовий матеріал, в гіршому - великі обсяги додаткового екологічно небезпечного відходу з великою кількістю патогенної мікрофлори.

Кератиноподібні білки нерозчинні і стійкі до деградації звичайними протеолітичними ферментами через велику кількість дисульфідних і водневих зв'язків, гідрофобних взаємодій. Від інших білків вони відрізняються високим вмістом цистеїну, кількість якого може досягати

більше 8% від ваги білка [1]. Кератин входить до складу волосся, вовни, шовку, пір'я, рогів, нігтів і копит.

Отримані за допомогою кератіназ гідролізати пір'я використовуються в птахівництві і тваринництві, частково замінюючи рибне та м'ясне борошно в кормах. Причому за поживністю і засвоюваності ферментативні гідролізати значно перевершують борошно з пір'я і продукти їх обробки хімічними і механічними способами [2].

Мікробні кератінази використовуються для пом'якшення м'яса і риби, при отриманні клею, створенні косметичних продуктів (поживних кремів, лосьйонів); у виробництві харчового і кормового білка. Вельми ефективним є застосування кератіназ в медицині для приготування діагностичних середовищ, лікувальних сироваток і вакцин, а також при виробництві чистячих засобів для видалення білкових забруднень з натуральних тканин [3, 4].

Найбільш широко кератінази застосовуються в шкіряній промисловості, перш за все на стадії видалення шерстяного покриву. Для цього руйнують дисульфідні зв'язки в молекулах структурних білків за допомогою лугу, сульфідів та інших хімічних агентів. Застосування кератіназ значно скорочує час і вартість.

Серед мікроорганізмів тільки патогенні гриби (дерматофіти) і окремі види бактерій і актиноміцетів мають здатність виробляти позаклітинні ферменти, що руйнують кератин [5].

Відомо, що кератинрозщиплюючі мікроорганізми можуть бути виділені з природних субстратів (грунту, водойм) і з тіла тварин. Такі організми були знайдені серед різних штамів *Streptomyces rimosus*, *S. griseus*, *S. roseochromogenes*, *S. praecox*, *S. parvus*, *S. scabies*, *S. griseoluteus*, *Nocardia rubra*, *S. microflavus*, *S. globisporus vulgaris* [6].

Новизною даної роботи є використання в якості продуценту штаму *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД, що має підвищену здатність до біосинтезу кератіназ в 10 разів в порівнянні з *Bacillus licheniformis* PWD-1

(що до цього часу найчастіше використовували в якості продуцента кератинази) і продукує не менше шести позаклітинних ферментів, в тому числі лужну протеазу і α -амілазу, які підсилюють гідролізуючий ефект кератиназного препарату [1].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КЕРАТИНАЗИ, ЯК КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Кератиназа - специфічний вид протеолітичних ферментів, для гідролізу (розщеплення) нерозчинного кератину з виділенням вільної амінокислоти оксипроліну. Фермент кератиназу отримують біотехнологічним шляхом використовуючи різноманітні продуценти.

Очищена кератиназа гідролізує широкий спектр субстратів: казеїн, порошок із пір'я, еластин, коллаген. Фермент стабільний при рН від 5 до 12 з оптимальними діями на порошок з пір'я та казеїну - 8,5 і від 10,5 до 11,5 відповідно; оптимальна температура дії - 50-55°C.

Фермент кератиназа ефективно застосовується в різних областях, де є потреба у гідролізі кератинів: шкіряні, при переробці відходів птахівництва, біомедичній, фармацевтичній та косметології для приготування (виробництва) косметологічних засобів і проведення косметологічних процедур.

Мікробні кератинази є переважно метало-, сериновими або метало-сериновими протеазами. Вони зазвичай позаклітинні, і їх синтез індукується кератиновмісними субстратами.

Згідно з міжнародною класифікацією ферментів кератиназа належить до класу (КФ 3) Гідролази, підклас (КФ 3.4) Протеази. (КФ 3.4.21) Кератолітичні ферменти.

Класифікація кератиназ. Протеази широко поширені, беруть участь у багатьох біологічних реакціях, що відбуваються як у клітині, так і в організмі в цілому, і вони відіграють важливу роль у циркуляції азоту в природі. Їх загальний механізм дії полягає в тому, що гідролітичні ферменти відщеплюють пептидні зв'язки з кінців поліпептидної ланцюга (екзопротеаза) або всередині ланцюга (ендопротеази)[5]. Відповідно до

					НУХТ БТЕК			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Барановська Ю.В.						
Перевірів		Красін'юк В.О.						
Реценз.								
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
					Літ.		Арк.	Акрушів
								60
					ВСТУП		Кафедра БТМ	
							9	

послідовності амінокислот в активних центрах ферментів та пов'язаному з ним механізму каталітичної дії ці ферменти групуються в аспарагін, цистеїн, глютамін, аспартат, метал, серин, треонін, змішані протеази та ті, що мають невідому каталітичну дію механізм. У номенклатурі ферментів (1979) кератинази *Streptomyces* і *Trichophyton* були названі Е.С. 3.4.99.11 та 3.4.99.12 відповідно до типу каталізованої реакції [9, 10].

Однак інтенсивний розвиток молекулярної біології спричинив вдосконалення системи класифікації. Виходячи з подібності послідовностей амінокислот, що також відображає еволюційні взаємодії між протеолітичними ферментами, база даних MEROPS об'єднала протеази в 62 роди та 264 родини. Залежно від характеру активного центру мікробними кератиназами можуть бути серинові протеази, металеві протеази та протеїни серинових металів. Виняток становлять дріжджові кератинази, які є аспарагіновими протеазами [9].

Пептидази металу та серину - це ендопротеази, які розщеплюють пептидні зв'язки всередині поліпептидного ланцюга. Серинові протеази - це функціонально багата і різноманітна група протеолітичних ферментів з нуклеофільними залишками серину (Ser) в активному центрі. Останній атакує карбонільну частину пептидного зв'язку, утворюючи проміжне з'єднання (ацил-ферментний проміжний продукт). На сьогодні існує понад 333000 серинових протеаз, які класифіковані у 53 роди та 16 родин. Виходячи з структури, серинові протеази поділяються на дві категорії: трипсиноподібні та субтилізиноподібні. Ферменти субтилізинового підсімейства повністю інгібуються фенілметилсульфонілфторидом (PMSF) та хімостатином. У металевих протеазах нуклеофільна атака на пептидний зв'язок може передаватися через молекули води, координовані двовалентним іоном металу (зазвичай Zn (II), іноді Co (II), Mn (II)) або біметалічним центром ферменту (два іони Zn (II) або один іон Zn (II) та один іон Co (II) або Mn (II)). Залежно від кількості іонів металу, необхідної для каталізу, металопротеази поділяються на дві групи: перша група потребує двох іонів

металів, а друга потрібна лише одна. На сьогодні існує близько 294000 металопротез, об'єднаних у 73 сім'ї та 15 підсімейств. Каталітична активність металопротеаз пригнічується хелатуючими агентами та важкими металами [10].

Кератиназу випускають в вигляді порошку. Ферментна активність 1000 од/г.

Упаковка

- Пакет Zip-Lock: 1 кг;
- Пластикові банки 100 г;
- Скляні флакони 10 г.

Умови зберігання: при температурі від -25°C до $+20^{\circ}\text{C}$ в сухому місці, захищаючи від перших сонячних променів.

Термін придатності: 12 місяців.

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА *Bacillus licheniformis*

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента

Кератинофільні гриби продукують протеолітичні ферменти, здатні розкладати кератинові відходи [6]. Кілька кератинофільних грибів, які живуть як паразити на кератинових матеріалах, використовують кератин як джерело вуглецю та азоту, розмножуються безстатевим шляхом та виробляють конідії. Ці кератинофільні гриби включають гіфоміцети та декілька інших таксонів [8]; гіфоміцети включають як дерматофітні (наприклад, види *Microsporum*), так і недерматофітні (наприклад, види *Chrysosporium* та інших родів) кератинофільні гриби [7]. Дерматофіти в основному з родів *Microsporum*, *епідермофітон* і *трихофітон*.

Кератинофільні види зазвичай ідентифікуються за морфологічними особливостями їх макро- та мікроконідій, молекулярними методами та використанням аналізу послідовностей ДНК [5]. Кератинофільні гриби продукують сульфітоліз для сульфітолізу, і під час цього процесу руйнуються дисульфідні зв'язки цистеїну, основної амінокислоти в кератинових матеріалах, після чого протеолітичні ферменти, що виділяються грибами, можуть легко розщеплювати кератин. Під час процесу деградації виділяються продукти - цистеїн, S-сульфоцистеїн, цистеїнова кислота, цистеїн та неорганічний сульфат, а наявність цих продуктів у культуральному середовищі свідчить про появу справжніх кератинофільних грибів. Гриби, які не проявляють такої поведінки під час деградації, вважаються некератинофільними грибами. Кератинофільні гриби переважно антропофільні (люблячі люди) або зоофільні (люблячі тварин). Багато кератинофільних грибів були виділені з ґрунтових проб за рахунок

					НУХТ БТЕК			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив		Барановська Ю.В.						60
Перевірів		Красінко В.О.						12
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

накопичення в ґрунтах кератинових відходів (геофільних) [8].

Описані кератинофільні гриби, виділені в країнах світу, включаючи Єгипет, Іспанію, Австралію, Палестину, Кувейт, Індію, Іран та Малайзію [6].

До поширених ізолятів кератинофільних грибів із ґрунтів відносяться *Microsporum gypseum*, *M. canis*, *M. fulvum*, *M. nanum*, *Trichophyton terrestre*, *T. ajelloi*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. verrucosum*, *T. equinum*, *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. schoenleinii*, *T. simii*, *Chrysosporium keratinophilum*, *C. pannicola*, *C. tropicum*, *C. indicum*, *C. anum*, *C. lobatum*, *C. evolceanui* та *C. indicum*. Шадзі та ін. [9] зібрали 330 зразків із тринадцяти початкових шкіл та семи громадських парків та виділили 214 видів, серед яких *Chrysosporium keratinophilum* був домінуючим організмом, присутній із частотою 54,2%. Anbu та ін. зібрано 10 та 12 зразків ґрунтів із птахівницьких господарств та місць скидання пір'я та відновлено 34 види грибів, що належать до 19 родів. Серед них шість видів - дерматофіти, що належать до п'яти родів [10].

Дослідники проаналізували 800 зразків ґрунту з провінції Ісфахан Ірану та встановили, що 588 належать до кератинофільних грибів, що становить 73,5% від загальної кількості ізолятів. Крім того, вони відновили 16 видів, що належать до 11 родів. Аналогічно, було показано, що 108 проб ґрунту Сент-Кітса та 55 проб з Невіса склалися з 49 та 38 проб відповідно до позитивних для кератинофільних грибів.

Подібно до ізолятів грибів, повідомлялося про списки бактеріальних штамів, здатних руйнувати кератини. Бактерії можуть рости швидше, ніж грибні види, і тому мають потенціал у промисловому застосуванні. До переваг грибів можна віднести легшу колонізацію гіфів грибів у більш твердих кератинових субстратах відносно бактерій. Ізольовані бактеріальні штами, які, як відомо, руйнують кератин або виробляють кератиназу, в основному складаються з *Bacillus*; вона включає в себе *B. subtilis* і *B. licheniformis* [9], хоча інші бактерії, включаючи грампозитивні *Lysobacter*, *Nesterenkonia*, *Kocuria*, і *Microbacterium* і грамнегативних *Vibrio*,

Xanthomonas, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter*, і *Nesterenkonia* також мають здатність до синтезу кератинзи [10].

Кілька інших досліджень досліджували кератиназу, вироблену бактеріями. При дослідженні потенційної деградації кератину бактеріальними штамами, вилученими з ґрунтових проб. Чотири ізоляти з пір'яних відходів були відновлені на молочних агарових пластинах, а три були ідентифіковані як грамнегативні бактерії (*Burkholderia*, *Chryseobacterium* та *Pseudomonas*), а один був визначений як грампозитивний штам (*Microbacterium vrste*).

Крім того, актиноміцети, група *Streptomyces*, а саме: *S. fradiae*, *Streptomyces* види A11, *S. pactum*, *S. albidoflavus*, *S. thermoviolaceus* SD8 та *S. graminofaciens*, а також *Thermoactinomyces candidus*, здатні виробляти кератиназу.

Бактерії мають великий потенціал для широкого використання, оскільки вони швидко ростуть, а їх ферменти підтримують активність в різних умовах. Деякі ферменти все ще активні при високій температурі та при різному рН. *Bacillus licheniformis* - це найефективніша бактерія, що деградує кератин, з бактеріальних представників продуцентів кератинази.

Інші бактерії, включаючи *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Fusarium*, *Geobacillus*, *Chryseobacterium*, *Xanthomonas*, *Nesterenkonia* і *Serratia* здатні виробляти кератиназу в значно меншій кількості. Кератинази, що виробляються бактеріями, демонстрували широкий діапазон оптимальної температури (28–90°C) та рН (5,8–11). Молекулярні маси бактеріальної кератинази різні у різних видів. Крім того, додавання кератину або пір'я в культуральне середовище зазвичай полегшує вироблення кератинази [11].

Штам *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД має підвищену здатність до біосинтезу кератиназ і продукує не менше шести позаклітинних ферментів, в

тому числі лужну протеазу і α -амілазу, які підсилюють гідролізуючий ефект кератиназного препарату [12]

Обґрунтування вибору умов культивування

Проведення біосинтезу відноситься до найбільш важливої та відповідальної ділянки виробництва біотехнологічної продукції. Спосіб проведення біосинтезу необхідно проводити так, щоб максимально зменшити затрати та отримати максимальну кількість цільової продукції, враховуючи усі особливості біологічного агенту, його потреби для надсинтезу цільової продукції.

Проведення біосинтезу можна реалізовувати різними шляхами, як технічними так і технологічними. Особливості обраних способів впливатимуть на хід усього процесу. Технологічна схема, яка обирається повинна забезпечувати оптимізацію усіх виробничих заходів з точним дотриманням оптимальних умов на кожній стадії, необхідних для синтезу кінцевої продукції.

Згідно викладеній в розділі 3 інформації стосовно продуцента *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД оптимальним значенням температури є 40°C протягом 48-72 годин, рН середовища 7,5-7,8, отже процес біосинтезу потрібно проводити з дотриманням правил асептики організації виробничого процесу.

Бактерії *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД являються аеробним мікроорганізмом, тому в ферментері повинна бути аерація середовища шляхом подачі стерильного повітря в ферментер через барботер та перемішування зі швидкістю 150 об/хв, для забезпечення ефективних масообмінних процесів [12].

Так як накопичення значних концентрацій цільового продукту негативно впливає на процес ферментації, сповільнюючи ріст продуцента тому культивування *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД для отримання кератинази доцільно проводити періодичним способом.

2.2 Морфолого-культуральні ознаки *Bacillus licheniformis*

Клітини являють собою грампозитивні, поодинокі рухливі палички розміром 0,6-0,8 і 0,2-0,3 мкм, спороутворюючі. У логарифмічній фазі росту утворюються ланцюжки з 2-3-х клітин більш витягнутої форми, на 56 годинах зростання (стаціонарна фаза) ланцюжки розпадаються, клітини товщають, з'являються спори, що мають центральне положення і овальну форму (рис. 2.1).

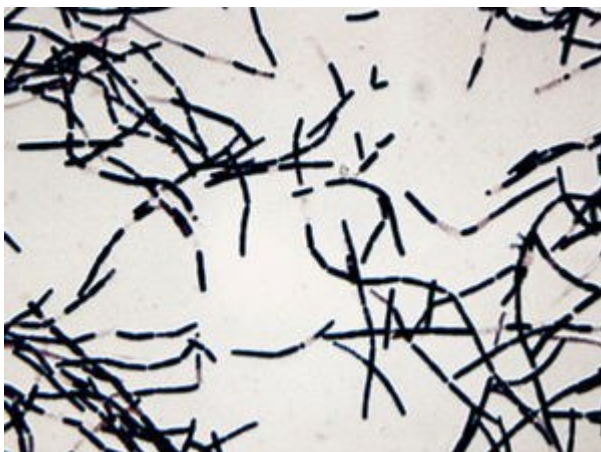


Рис. 2.1. *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2220

На мясопептонному агарі при $t\ 40^{\circ}\text{C}$ протягом 24 години) штам дає нормальний середній ріст, колонії неправильної форми з піднятим центром, слизові, гладкі, непрозорі, 2-5 мм в діаметрі, в процесі росту поступово набувають світло-коричневий пігмент.

На мясопептонному бульйоні ($t\ 40^{\circ}\text{C}$, 24 години)

Середнє зростання клітин, в процесі зростання середовище мутніє, до 24 години росту з'являється світло-коричневий відтінок.

Нормальний ріст і утворення зон гідролізу навколо колоній.

Колонії неправильної форми, слизові, гладкі, непрозорі з піднятим центром, 2-4 мм в діаметрі, з рівними краями. До 72 годинах зростання виникають спори на всій поверхні колонії, колір спор - світло-коричневий, що переходить в темно-коричневий після 120-144 годин росту (рис. 2.2.).



Рис. 2.2 Вигляд колоній *Bacillus licheniformis* на кров'яному агарі.

Фізіолого-біохімічні ознаки *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis аеробний мікроорганізм.

Температурний діапазон росту - 10-55°C. Оптимальна температура росту - 40°C. Зростає при значеннях рН середовища - 5,0-10,0.

Оптимум рН росту - 7,3-7,8

Желатин розріджує. Крохмаль, казеїн і пудруз пір'я швидко гідролізує. Відновлює лакмусовое молоко.

Нітрати відновлює до нітритів. Утворює тирозиназу (каталазоположительний), утворює сірководень. Викликає гемоліз.

Зброжує з утворенням кислоти арабінозу, ксилозу, фруктозу, манозу, маніт, сорбіт, гліцерин, декстрин, глікоген без виділення газу, глюкозу ферментує анаеробно, утилізує лимонну кислоту.

Штам здатний рости на середовищах з амонійними солями як єдине джерело азоту, а також на середовищі, що містить дріжджові клітини (пресовані пекарські дріжджі, кормові дріжджі або білково-вітамінний комплекс БВК), як джерело вуглецевого і азотного живлення.

Культивування штаму здійснюють в аеробних умовах при температурі 40°C протягом 48-72 годин, рН середовища 7,5-7,8. Для росту культури і біосинтезу кератіназ джерелом вуглецю та азоту можуть служити крохмаль, гідролізований крохмаль, кукурудзяна, соєва або інша зернова мука, або їх екстракти, дріжджові клітини, пептони, дріжджовий екстракт, казеїн, пір'яна борошно, сечовина, амонійний азот [12].

2.3 Таксономічний статус *Bacillus licheniformis*

Наукова класифікація	
Царство:	Bacteria
Відділ:	Firmicutes
Клас:	Bacilli;
Підклас:	Bacillales;
Родина:	Bacillaceae
Рід:	<i>Bacillus</i>
Вид:	<i>B. licheniformis</i>
Біноміальна назва	
<i>Bacillus licheniformis</i>	

Штамм *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2220 отримують за допомогою генетичних селекцій із застосуванням методів ефективного мутагенезу - ультрафіолетового впливу з одночасною дією хімічних мутагенів з штаму *Bacillus licheniformis* 78 ВКМ В-2184.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.

3.1. Потреба у цільовому продукті.

Важливим завданням сучасної біотехнології є розробка наукових основ та інженерних рішень для одержання продуктів, що мають широкі перспективи практичного використання. Одне з провідних місць серед них належить ферментам мікробного походження, які застосовують у різних галузях промисловості та господарства.

Внесок птахівничої галузі в виробництво м'яса в Україні становить 400 тис. т в рік. При цьому утворюється близько 120 тис. т. відходів патрання птиці, що створює значну проблему для переробної галузі і потребує вирішення наступних завдань: забезпечення біологічної безпеки; забезпечення екологічної безпеки; виробництво корисних для людини продуктів (білків, жиру, біологічно активних речовин і т.д.); виробництво енергії.

Серед усіх відходів патрання птиці найбільший інтерес представляє перопухова сировина, в якій міститься близько 65% кормового білка. Рішення проблеми переведення основного білка пера в засвоювану форму має першочергове значення як з позиції мобілізації резервів тваринного білка, так і з точки зору охорони навколишнього середовища.

Кератиноподібні білки нерозчинні і стійкі до деградації звичайними протеолітичними ферментами через велику кількість дисульфідних і водневих зв'язків, гідрофобних взаємодій. Від інших білків вони відрізняються високим вмістом цистеїну, кількість якого може досягати більше 8% від ваги білка [1].

На даний час існує декілька методів утилізації пір'я. Одним з них є лужний гідроліз, з подальшою виваркою та сушкою. Але при цьому методи кератини пера розщеплюються не повністю, що значно знижує харчову

					НУХТ БТЕК			
					виробництва продукту, а великі витрати енергії для підтримання			
Змн.	Лист	Стр.	Одержано	Додаток	Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив	Барановська Ю.В.					вартість		продукту.
Перевіряв	Красінко В.О.	температур						
Реценз.								
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.					Кафедра БТМ		
						19		

Альтернативним методом може слугувати гідроліз заснований на використанні ферменту кератинази.

Кератиназа - специфічний вид протеолітичних ферментів, для гідролізу (розщеплення) нерозчинного кератину з виділенням вільної амінокислоти оксипроліну. Фермент кератиназу отримують біотехнологічним шляхом використовуючи різноманітні продуценти.

Кератиназа гідролізує широкий спектр субстратів: казеїн, порошок із пір'я, еластин, коллаген. Фермент стабільний при рН від 5 до 12 з оптимальними діями на порошок з пір'я та казеїну - 8,5 і від 10,5 до 11,5 відповідно; оптимальна температура дії - 50-55°C.

Фермент кератиназа ефективно застосовується в різних областях, де є потреба у гідролізі кератинів: шкіряні, при переробці відходів птахівництва, біомедичній, фармацевтичній та косметології для приготування (виробництва) косметологічних засобів і проведення косметологічних процедур.

Отримані за допомогою кератіназ гідролізати пір'я використовуються в птахівництві і тваринництві, частково замінюючи рибне та м'ясне борошно в кормах. Причому за поживністю і засвоюваності ферментативні гідролізати значно перевершують борошно з пір'я і продукти їх обробки хімічними і механічними способами [2,3].

Перевагами продуценту штаму *Bacillus licheniformis* BKM B-222 ОД, є те що він має підвищену здатність до біосинтезу кератіназ в 10 разів в порівнянні з *Bacillus licheniformis* PWD-1 (що до цього часу найчастіше використовували в якості продуцента кератинази) і додатково продукує ще інші позаклітинні ферменти, в тому числі лужну протеазу і α -амілазу, які підсилюють гідролізуючий ефект кератиназного препарату. [3]

Одним з крупніших виробників пташиного м'яса в Львівській області є фермерське господарство Улар. До складу компанії входять 4 птахокомплекса та два комплекси виробництва кормів, розташовані в

Львівській області. Загальна потужність складає 7 млн. голів курей на рік, а об'єм виробництва м'яса птиці – 16 тис. т на рік [4].

Згідно з літературних даних [5] кількість пір'я, що утворюється в наслідок розділу туш птиці складає від 4,0-5,7 % живої маси. Отже приймаємо середнє значення 5% від загальної маси. Для подальших обчислень потрібно розрахувати загальну кількість пір'я, що утворюються на підприємстві.

$$16000 \text{ т} * 0,5 = 800 \text{ т пір'я на рік.}$$

Для переробки пір'я необхідно знайти норми витрат ферментного препарату на одиницю маси. Згідно з патентом [5] для обробки 1 т сировини потрібно 1 кг суміші ферментів кератинази та ліпази, зі співвідношенням 1:1. Тоді для переробки 1 т потрібно 500 г ферментного препарату кератинази ГЗХ . Отже необхідно розрахувати загальну кількість ферменту, необхідну для переробки 800 т пір'я. Отже

$$800 * 0,5 = 400 \text{ кг або } 400000 \text{ г ферментного препарату.}$$

Відомо, що стандартний ферментний препарат кератинази ГЗХ містить 1000 ОД активності на 1 гр препарату. Отже у 400 кг ферментного препарату буде міститися:

$$400000 \text{ г} * 1000 \text{ ОД/г} = 400000000 \text{ ОД}$$

Необхідно розрахувати кількість культуральної рідини, як потрібна для виробництва 400000000 ОД активності кератинази. Згідно літератури відомо, що в 1 мл культуральної рідини знаходиться 96 ОД активності. Тоді для отримання 400000000 ОД потрібно отримати:

$400\,000\,000 / 96 = 4166000$ мл або 4166 л культуральної рідини.

Враховуючи втрати при виділенні приблизно 50%, отримуємо

$4166 * 2 = 8332$ л культуральної рідини.

річний об'єм культуральної рідини дорівнюватиме:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 8,332 \text{ м}^3.$$

3.2. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту

1.1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 50. В інші дні обладнання буде використовуватися для синтезу других ферментних препаратів, які використовуються при вирощуванні птахів (наприклад целюлозолітичні).

Ефективний фонд робочого часу $N_{\text{еф.}} = 50 \times 24 = 1200$ год.

1.2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 72 + 10 = 82 \text{ (год)}, \text{ де}$$

$T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничого біосинтезу;

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

1.3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$N_{\text{ц}} = \frac{N_{\text{еф}}}{T_{\text{цф}}} = \frac{1200}{82} = 14$$

1.4. Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{\text{кр}}^{\text{н}} = V_{\text{кр}}^{\text{річ}} / N_{\text{ц}} = 8,332 / 14 = 595 \text{ л} = 0,6 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,6$.
Об'єм культуральної рідини становить $V_{к.р} = 0,6 \text{ м}^3$.

3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Загальний об'єм ферментера, в якому здійснюється культивування *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222 становить 1 м^3 . Коефіцієнт заповнення $K_{зап.} = 0,6$. Робочий об'єм ферментера:

$$V_{роб.} = V_{заг.} \times K_{зап.} = 1 \times 0,6 = 0,6 \text{ м}^3 = 600 \text{ л.}$$

Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу для приготування 470 л культуральної рідини.

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища.

- 1) Для одержання 600 л культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 600 \times 0,1 = 60 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

- 2) Для засіву посівного апарату (одержання 60 л культуральної рідини) необхідно:

$$V_{роб.2} = 60 \times 0,1 = 6,0 \text{ л інокуляту.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у інокуляторі об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

- 3) Для засіву інокулятора (одержання 6 л культуральної рідини) необхідно:

$$V_{роб.3} = 6 \times 0,1 = 0,6 \text{ л} = 600 \text{ мл інокуляту}$$

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

Отже, процес одержання посівного матеріалу бактерій *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД для забезпечення виробничого біосинтезу ферменту кератинази у ферментері об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 4 етапи.

На першому етапі для отримання інокуляту штам *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД, який підтримували при 4°C на скошеному агарі висівають на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром, після чого культуру переносять петлею в пробірки з середовищем (інкубація при 40°C протягом 24 год), на наступному етапі до 750 мл колби Ерленмейера, що містять 200 мл поживного середовища вносять по 1мл посівного матеріалу, кількість колб 3 шт. Колби інкубують на шейкері орбітальному при швидкості перемішування 150 об/хв, 40°C протягом 24 год. Після закінчення цього часу інокулят переносили до наступного етапу приготування посівного матеріалу – інокулятор з об'ємом 10 л де також культивували при 40°C протягом 24 год, після чого отриманий посівний матеріал переносили в інокулятор об'ємом 100л. І останнім етапом біосинтезу є ферментація в 1м³ ферментері. Для спрощення процедури миття ферментер повинен бути оснащений СІР мийкою.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Обґрунтування вибору умов культивування

Проведення біосинтезу відноситься до найбільш важливої та відповідальної ділянки виробництва біотехнологічної продукції. Спосіб проведення біосинтезу необхідно проводити так, щоб максимально зменшити затрати та отримати максимальну кількість цільової продукції, враховуючи усі особливості біологічного агенту, його потреби для надсинтезу цільової продукції.

Проведення біосинтезу можна реалізовувати різними шляхами, як технічними так і технологічними. Особливості обраних способів впливатимуть на хід усього процесу. Технологічна схема, яка обирається повинна забезпечувати оптимізацію усіх виробничих заходів з точним дотриманням оптимальних умов на кожній стадії, необхідних для синтезу кінцевої продукції.

Згідно викладеній в розділі 3 інформації стосовно продуцента *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД оптимальним значенням температури є 40°C протягом 48-72 годин, рН середовища 7,5-7,8, отже процес біосинтезу потрібно проводити з дотриманням правил асептики організації виробничого процесу.

Бактерії *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД являються аеробним мікроорганізмом, тому в ферментері повинна бути аерація середовища шляхом подачі стерильного повітря в ферментер через барботер та перемішування зі швидкістю 150 об/хв, для забезпечення ефективних масообмінних процесів [7].

Так як накопичення значних концентрацій цільового продукту негативно впливає на процес ферментації, сповільнюючи ріст продуцента

					НУХТ БТЕК			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Обґрунтування вибору технологічної схеми	Лім.	Арк.	Акрушів
Розробив	Барановська Ю.В.							60
Перевірів	Красінько В.О.							25
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

тому культивування *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД для отримання кератинази доцільно проводити періодичним способом.

Отже для проведення культивування *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД обираємо ферментер оснащений лопатевою мішалкою, барботером, рН та рО метрами, датчиком температури. Таким вимогам задовольняє ферментер ASBiotehniskaiscentrs (Латвія, Рига) об'ємом 1 м³ [8].

4.2. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря

Забір повітря для фільтрів грубої очистки здійснюється на висоті 3 метри над вищою точкою будівлі, враховуючи габарити нашого ферментера будівля буде приблизно 10 м, тоді забірник повітря буде на висоті 13 м.

Отримання стисненого, очищеного від мікроорганізмів повітря певної температури і вологості - складна технологічна задача, яка здійснюється в спеціальній системі. Система складається з трьох частин, з'єднаних послідовно: в першій частині відбуваються очищення атмосферного повітря від пилу і його стиснення (температура може сягати 250 °С), в другій - підготовка і підтримання повітря в оптимальному термодинамічному стані по вологості і температурі, в третій - остаточна очищення повітря (у індивідуальних фільтрах тонкого очищення) перед подачею в ферментатори. Підтримка певної температури стисненого повітря обумовлюється не тільки самої культурою мікроорганізму, а й високим змістом вологи атмосферного повітря. При охолодженні стисненого повітря випадає 50-70% вихідної вологи, яка зволожує волокна аерозольних фільтрів, і ефективність їх дії різко знижується. Щоб насадки аерозольних фільтрів не зволожувалися, повітря після компресора охолоджують до 25-30 °С. Після відділення вологи повітря нагрівається до температури культивування. Остаточне підсушування повітря може проводитися в сушарці між головним і індивідуальними фільтрами.

На підприємствах мікробіологічної промисловості очищення і стерилізація повітря здійснюється за допомогою системи різних фільтрів:

попереднього очищення періодичного або безперервної дії, грубої і тонкої очистки[9].

4.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів.

Для миття обладнання, інвентарю, комунікацій можна використовувати такі миючі засоби: каустична сода, миючі засоби «Лойран про 13» та «Вімол». Для остаточного вибору розглянемо їх більш детально.

Каустична сода (NaOH) безбарвна кристалічна речовина, має високу гігроскопічність. 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.

Засіб належить до високонебезпечних речовин (II клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів.

Рекомендується використовувати 5% розчини каустичної соди для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій [9].

Лойран-про-13 – лужний миючий засіб з антибактеріальною дією для видалення органічних і неорганічних забруднень для мийки технологічного обладнання. Добре емульгує жири, видаляє в'їдаються забруднення органічної (жир, білок) і неорганічної (солі, молочний камінь) природи, що утворюються на внутрішніх поверхнях технологічного обладнання.

Склад: натрій гідроксид, ПАР, гліцерин, пом'якшувач води, інгібітор корозії, антибактеріальні добавки.

Рекомендації щодо застосування

Машинна мийка: робочий розчин концентрацією 1,0-2,0% ($t = 30-40^{\circ}\text{C}$) розпорошується насадкою для низького тиску. Час витримки – 15-30 хвилин.

Ручна мийка: поверхні попередньо обполоснути водою ($t = 30-40^{\circ}\text{C}$). Робочим розчином концентрацією 2,0-4,0% обробляють вручну, або

апаратом високого тиску. Час витримки - 15-20 хвилин. Не допускати висихання препарату. Миття можна доповнити обробкою щіткою.

Мийка вистоюванням: робочий розчин концентрацією 0,8-1,0% ($t = 30^{\circ}\text{C}$) нанести вручну на оброблювану поверхню. Час витримки - 30-60 хвилин. Після закінчення миття будь-яким із запропонованих способів обладнання промити водопровідною водою ($t = 30-40^{\circ}\text{C}$) протягом 15 хвилин.

Концентрація робочого розчину і час обробки залежить від ступеня забруднення і частоти миття. Концентрат і робочі розчини - їдкі (IV клас небезпеки – малонебезпечні речовина по ГОСТ 12.1.007-76)[10].

Засоби для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей

Для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей порівнюємо такі засоби, як «Новохлор Екстра», «Бджілка», «Гембар» .

Новохлор-Екстра – рідкий універсальний концентрований лужний дезінфекційний засіб.

Склад: хлор-активний агент (початкова концентрація активного хлору 7-9%), миючі компоненти, ароматизатори, антикорозійні компоненти, стабілізатор вмісту активного хлору.

Опис продукту: дезінфікуючий засіб Новохлор-Екстра і його робочі розчини мають лужну реакцію, емульгуючі, виражені миючі і високу змочувальну дію; не фіксують на поверхнях обробки органічні забруднення, добре змиваються водою з оброблених поверхонь, не залишають патьоків і нальоту; видаляють білкові, жирові, механічні забруднення, залишки крові і лікарських препаратів; гомогенізують мокроту і інші виділення. Засіб і його розчини не ушкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, деревини, кераміки, лакофарбове, гальванічне і полімерне покриття.

Засіб діє проти широкого спектру мікроорганізмів: грам+ і грам-бактерій, вірусів, грибів роду *Candida*, пліснявих грибів, спор мікроорганізмів, а також збудників особливо небезпечних інфекцій, зокрема сибірської виразки, чуми, холери, псевдотуберкульозу, бруцельозу, лептоспірозу. Не має сенсibilізуючої і мутагенного дії.

Екологічна оцінка: ПАР – належить до III класу небезпеки [11].

Бджілка – Ефективне рідкий миючий засіб для миття і знежирення посуду, підлог, стін, кахлю, водостійких поверхонь, кухонних меблів, плит, холодильників на підприємствах харчової промисловості, громадського харчування, в комунальному господарстві, в тому числі в дитячих установах.

Засіб являє собою в'язку прозору рідину з РН = 6,0-9,0;

Склад: ПАР, активні добавки, пом'якшувач води, регулятор РН, консервант.

Спеціальні добавки, що входять до складу засобу, пом'якшують воду, забезпечують легке видалення жирових забруднень, як в теплій, так і в холодній воді. Концентрація робочого розчину 1-2%.

Засіб рекомендований Міністерством охорони здоров'я[12].

Дані щодо вартості, концентрації та витрат різних миючих та дезінфікуючих засобів наведено в *табл.4.1*

Таблиця 4.1.

Узагальнена характеристика мийних та дезінфікуювальних засобів для виробництва

Назва миючого/дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або стерилізації	Вартість 1 л/(кг) миючого та/або дезінфікуючого засобу, грн.	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л робочого розчину, грн
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунальні кації	32	5	0,9
Лойран-про-13		29,70	2	0,6
Новохлор-Екстра	Стіни, підлога, вікна, двері, тара	50	0,5	2,50
Бджілка		25	2	0,5

Проаналізувавши дані, наведені у *табл. 4.1* можна зробити висновок, що для мийки обладнання найбільш економічно вигідним є Лойран-про-13, а для миття підлоги та стін – Бджілка.

4.4. Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

Спираючись на склад поживного середовища, наведений у попередньому підрозділі, готувати поживне середовище потрібно, розділивши його на декілька композицій, в зв'язку з тим що до складу середовища входять компоненти, що потрібно стерилізувати при різній температурі. Також до складу середовища входять дві солі, які при стерилізації в одному розчині можуть утворювати осад.

Тому, в нашому випадку середовище потрібно розділити на три композиції:

Композиція	Компонент поживного середовища	Режим стерилізації
Композиція А	Екструдат борошна кукурудзяного – 100 г/л,	112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 20–30 хв
	Порошок з пир'я птахів – 10 г / л	
Композиція Б	CaCO ₃ – 2,5 г / л;	131 °С (0,15 Мпа) впродовж 40–60 хв
Композиція В	MgSO ₄ •7H ₂ O - 2,5 г / л.	131 °С (0,15 Мпа) впродовж 40–60 хв

Висновок. Для культивування аеробного мікроорганізму *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД обрано періодичне глибинне культивування за таких умов: температура – 40 °С, інтенсивність аерації 1 л/л·хв, інтенсивність перемішування – 150 об/хв, рН 7,5-7,8.

Розраховано, що для виробничого культивування продуцента у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 процес одержання посівного матеріалу буде проходити у 4 етапи.

Для вирощування *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД обрано поживне середовище складу (г/л): Екструдат борошна кукурудзяного - 100 г / л, Порошок з пир'я птахів - 10 г / л, CaCO₃ - 2,5 г / л; MgSO₄•7H₂O - 2,5 г / л.

А для одержання посівного матеріалу для колб використовують поживне середовище наступного складу: казеїн 1%, мясопептонний бульйон та солодове сусло у співвідношенні 1:1.

Для приготування його необхідно розділити на дві композиції (залежно від режиму стерилізації та можливого взаємного впливу певних компонентів):

Композиція А: Екструдат борошна кукурудзяного, порошок з пір'я птахів (ці компоненти попередньо розварюють) (режим стерилізації: 112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 20–30 хв).

Композиція Б: CaCO_3 (режим стерилізації: 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв).

Композиція В: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв).

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

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

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування, коротка технічна характеристика	Кількість
ПЗ-1	Повітрозабірник	1
Ф-2	Фільтр вісциновий. Фільтр сітчастий, фільтруючий матеріал – кільця рашига змочені вісциновим маслом. Товщина шару фільтруючого елементу – 350 мм. Продуктивність фільтру – 800 м ³ /хв.	1
ТП-3	Турбоповітродувка. Потужність 400 м ³ /хв., кінцевий тиск – 0,26 МПа. Електродвигун – А102-2, потужність – 320 кВт, частота обертання – 3960 об/хв..	1
-	Манометр – ГОСТ 2405-80. Діапазон вимірювання від 0 до 0,3 МПа. Ціна найменшої поділки 0,001 МПа. Клас точності 2,5.	1
Т-4	Одноходовий кожухотрубчатий теплообмінник з нерухомими трубними решітками. Робочий тиск – 0,6 МПа. Поверхня теплообміну – 100 м ² . Кількість теплообмінних труб – 221. Діаметр та довжина теплообмінних труб – 25/21 і 3500. Діаметр корпусу – 426/400 мм.	1

-	Манометр – ГОСТ 2405-80. Діапазон вимірювання від 0 до 0,3 МПа. Ціна найменшої поділки 0,001 МПа. Клас точності 2,5.	1
Ф-6	Фільтр головний для очистки повітря. Циліндричний апарат з сферичним дном та з'ємною кришкою. В середині фільтру встановлено дві решітки, між якими закладено фільтруючий матеріал – базальтове волокно. Робочий тиск – 0,16-0,25 МПа, Площа фільтруючої поверхні – 3,0 м ² . Потужність по повітрю – 200 м ³ /хв.	1
Ф-7	Фільтр головний для очистки повітря. Циліндричний апарат з сферичним дном та з'ємною кришкою. В середині фільтру встановлено дві решітки, між якими закладено фільтруючий матеріал – базальтове волокно. Робочий тиск – 0,16-0,25 МПа, Площа фільтруючої поверхні – 3,0 м ² . Потужність по повітрю – 200 м ³ /хв.	1
ЗБ- 8	Збірник приготування. «Бджілки» Циліндричний апарат об'єм з з'ємною кришкою.	1
-	Автоматичні дозуючі ваги для сипких матеріалів. Ваги стаціонарні нерівно плечові шестикомпонентні. Обладнані 6 електровібраційними живлювачами, циферблатним показчиком та датчиками для дистанційного зйому показників. Керування вагами електропневматичне. Обладнані відкриваючим ся дном з конусним переходом на патрубок.	1
ЗБ- 9	Збірник приготування. Лойрану-про-13. Циліндричний апарат об'ємом 0,5 м ³ з з'ємною кришкою.	1

-	Автоматичні дозуючі ваги для сипких матеріалів. Ваги стаціонарні нерівно плечові шестикомпонентні. Обладнані 6 електровібраційними живлювачами, циферблатним показчиком та датчиками для дистанційного зйому показників. Керування вагами електропневматичне. Обладнані відкриваючим ся дном з конусним переходом на патрубок.	1
ЗМ-11	Змішувач. Вертикальна циліндрична ємкість – 0,1 м ³	1
Н-12	Насос відцентровий одноступеневий горизонтальний консольного типу. Потужність 1,1-5 м ³ /год. Натиск – 35 м вод.ст. Потужність електродвигуна – 2,8 кВт, частота обертання – 46,6 с ⁻¹ .	1
ЗМ-13	Змішувач. Вертикальна циліндрична ємкість – 0,1 м ³	1
Н-14	Насос відцентровий одноступеневий горизонтальний консольного типу. Потужність 1,1-5 м ³ /год. Натиск – 35 м вод.ст. Потужність електродвигуна – 2,8 кВт, частота обертання – 46,6 с ⁻¹ .	1
ЗМ-15	Змішувач. Вертикальна циліндрична ємкість – 0,01 м ³	1
-	Автоматичні дозуючі ваги для сипких матеріалів. Ваги стаціонарні нерівно плечові шестикомпонентні. Обладнані 6 електровібраційними живлювачами, циферблатним показчиком та датчиками для дистанційного зйому показників. Керування вагами електропневматичне. Обладнані відкриваючим ся дном з конусним переходом на патрубок.	1
-	Автоматичні дозуючі ваги для сипких матеріалів. Ваги стаціонарні нерівно плечові шестикомпонентні. Обладнані 6 електровібраційними живлювачами, циферблатним показчиком та датчиками для дистанційного зйому показників. Керування вагами електропневматичне.	3

	Обладнані відкриваючим ся дном з конусним переходом на патрубок.	
Н-17	Насос відцентровий одноступеневий горизонтальний консольного типу. Потужність 1,1-5 м ³ /год. Натиск – 35 м вод.ст. Потужність електродвигуна – 2,8 кВт, частота обертання – 46,6 с ⁻¹ .	1
ЗМ-16	Змішувач. Вертикальна циліндрична ємкість – 10м ³ .	1
-	Автоматичні дозуючі ваги для сипких матеріалів. Ваги стаціонарні нерівно плечові шестикомпонентні. Обладнані 6 електровібраційними живлювачами, циферблатним показчиком та датчиками для дистанційного зйому показників. Керування вагами електропневматичне. Обладнані відкриваючим ся дном з конусним переходом на патрубок.	2
ЗМ-18	Реактор поживного середовища. Вертикально-циліндрична ємкість. Об'єм – 0,01 м ³ .. Діаметр –20 мм, висота –30 мм .	1
Н-20	Насос відцентровий одноступеневий горизонтальний консольного типу. Потужність 0,1 м ³ /год. Натиск – 35 м вод.ст. Потужність електродвигуна – 2,8 кВт, частота обертання – 46,6 с ⁻¹ .	1
ЗМ-19	Реактор поживного середовища. Вертикально-циліндрична ємкість. Об'єм – 0,1 м ³ .. Діаметр –40 мм, висота –80 мм .	1
-	Автоматичні дозуючі ваги для сипких матеріалів. Ваги стаціонарні нерівно плечові шестикомпонентні. Обладнані 6 електровібраційними живлювачами, циферблатним показчиком та датчиками для дистанційного зйому показників. Керування вагами електропневматичне. Обладнані відкриваючим ся дном з конусним переходом на патрубок.	1

Н-14	Насос відцентровий одноступеневий горизонтальний консольного типу. Потужність 1,1-5 м ³ /год. Натиск – 35 м вод.ст. Потужність електродвигуна – 2,8 кВт, частота обертання – 46,6 с ⁻¹ .	1
-	Колонка швидкісного нагріву Циліндричний апарат з еліптичною кришкою. Робочий тиск 0,6 МПа, вміщення – 100 л,. Матеріал корпусу – Ст Х18Н9Т.	1
-	Термометр – ГОСТ 215-73Е. Діапазон вимірювання від 0 до 150°С. Ціна поділки 1°С. Довжина частини, що занурюється – 200 мм.	1
Ф-21 Ф-23 Ф-25	Фільтр повітряний індивідуальний до посівного апарату. Сталева циліндрична ємкість з кришкою та конічним дном. Фільтруючий матеріал – фторопластовий диск..	3
Р-22	Інокулятор. Вертикальна циліндрична ємкість з еліптичним дном та з'ємною кришкою. Об'єм – 10 л. Робочий тиск – 0,3 МПа. Апарат обладнано паровою сорочкою (поверхня теплообміну – 8 м ²) та барботером. Апарат обладнано мішалкою (N двигуна =10 кВт, швидкість обертання мішалки – 170 об/хв..).	1
Р-24	Посівний апарат. Об'єм – 100 л. Вертикальний апарат циліндричної форми з сферичним дном. Обладнаний: перемішувачами пристроями (турбінні мішалки), барботером, штуцерами завантаження поживного середовища, посівного матеріалу, подачі та відводу повітря. Нагрів і охолодження через поверхню . Робочий тиск в апараті – 0,3 МПа. Відведення – відкачування насосом. Для огляду – спуск в апарат через люк. Матеріал корпусу – сталь Х18Н10Т.	1

P-26	Виробничий ферментер. Об'єм – 1000 л. Вертикальний апарат циліндричної форми з сферичним дном. Обладнаний: перемішуючими пристроями (турбінні мішалки), барботером, штуцерами завантаження поживного середовища, посівного матеріалу, подачі та відводу повітря. Нагрів і охолодження через поверхню . Робочий тиск в апараті – 0,3 МПа. Відведення – відкачування насосом. Для огляду – спуск в апарат через люк. Матеріал корпусу – сталь X18H10T.	1
H-27	Насос відцентровий одноступеневий горизонтальний консольного типу. Потужність 2 м ³ /год. Натиск 0.285-0.2 МПа. Частота обертання –2500, потужність 13 кВт.	7

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема виробництва ферменту кератинази складається з допоміжних робіт (підготовка виробничих приміщень, підготовка обладнання та приготування поживного середовища) та технологічного процесу (підготовка посівного матеріалу, біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу кератинази з відходів птахівництва наведено в графічній частині цього проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Підготовка робочого розчину «Бджілки»

Для одноразового миття підлоги загальною площею 72 м² (див. розділ 2) необхідно приготувати 7,2 л робочого розчину «Бджілки» (2%). Для цього у переносну емальовану ємність об'ємом 10 л наливають 144 мл 100% «Бджілки» та 7 л питної води.

ДР 1.1.2. Підготовка робочого розчину Лойран-про-13

Для миття ємнісного обладнання готуємо 2% робочий розчин Лойран-про-13. Для цього у реактор-змішувач (ЗМ-9) об'ємом 700 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 490 л питної води. Подають пару у сорочку для нагріву води до 60 – 70 °С. Вмикають перемішуючий пристрій (40 об/хв) і за допомогою об'ємно-вагового дозатора подають 10 л Лойран-про-13. Після гомогенізації, готовий розчин подають на миття обладнання.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Щоденно проводять прибирання виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщень. При проведенні вологого прибирання використовують 2 % робочий розчин «Бджілки» (від ДР 1.1.1). Періодичність зміни ємності з миючим засобом кожні 30 м². Відпрацьований розчин передають на стадію

					НУХТ БТЕК			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив		Барановська Ю.В.						60
Перевірів		Красінюк В.О.						38
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

знешкодження відходів (до ЗВ 7.2).

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Генеральне прибирання проводять раз на місяць 5 %-м робочим розчином «Бджілки» (від ДР 1.1.1). Під час генерального прибирання миють підлогу та стіни. Періодичність зміни ємності з миючим засобом кожні 30 м². Для перевірки мікробіологічної чистоти проводять мікробіологічний контроль (КУО < 800). Відпрацьований розчин передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.2).

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання

Ємнісне обладнання заповняють на 50 % 2%-им розчином Лойран-про-13 з реактора-змішувача (Р-1) через комунікації за допомогою відцентрового насосу (Н-2) (від ДР 1.1.1) та вмикають перемішуючий пристрій (10 – 150 об/хв). Миття триває 1 – 2 год. Відпрацьований розчин передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.2).

Після миття проводять ополіскування апарата технічною водою. Для цього в апарати по комунікаціях подається питна вода до заповнення 50 % об'єму апарата, вмикають перемішуючий пристрій і подають пару в сорочку для нагріву води до 25 – 30 °С. Процес триває 1 – 2 год. Відпрацьовану воду передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 7.2).

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання з метою виявлення можливих порушень щільності в комунікаціях та запірній апаратурі проводять технічний огляд. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Після проведення миття, ополіскування та ремонтних робіт перевіряють обладнання на герметичність, для цього на ємнісному обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і

фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогеновихтечієпошукачів. В апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини, знову закривають усю запірну арматуру. Апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції – 1,5 – 2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають пару і нагрівають його до 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають пару безпосередньо в апарат (через нижній спуск для реакторів або через барботер для ферментерів), при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130 – 135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 год. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску $P = 0,003 - 0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забір повітря здійснюють на висоті 13 м (див. розділ 2) через пристрій для забору повітря (ПЗ-1).

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через набивний фільтр (Ф-2), де відбувається затримка пилу та інших крупних часточок бруду до ступеня очищення $E = 90$ %. Фільтруючий матеріал – плетена сітка з вуглецевої сталі.

ДР 2.3. Компресування повітря

Повітря стискають у компресорі до 0,35 – 0,5 МПа (К-3). Стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 220 – 250 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Подають воду технічну у теплообмінник (Т-4) для зниження температури повітря до 25 – 40 °С.

ДР 2.5. Видалення зайвої вологи

Охолоджене повітря подають на ресивер (Р-5) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи до вмісту $W = 60$ %.

ДР 2.6. Нагрівання повітря

У теплообміннику (Т-6) охолоджене повітря підігрівують до 40 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів.

ДР 2.7. Головне тонке очищення повітря

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), в якому ступінь очищення досягається до 99 %.

ДР 2.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-21, Ф-23, Ф-25) для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,99 %.

ДР 3. Приготування допоміжних розчинів.

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину соляної кислоти

У колбу об'ємом 1 л вносять 375 мл дистильованої води і 125 мл 36 % соляної кислоти, отримують 500 мл 6 % хлорної кислоти.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію

На технічних вагах зважують 25 г гідроксиду натрію, переносять у колбу об'ємом 1 л та додають 500 мл дистильованої води. Стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

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

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

Розрахунок компонентів для приготування 600 мл середовища представлено в таблиці 4.1. На технічних вагах зважують 60 г кукурудзяного борошна лабораторних вагах зважують 6 г порошку з пір'я птахів. Наважки поміщають в колбу об'ємом 1000 мл та додають 250 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища протягом 20 хв. Доводять об'єм приготованого розчину до 300 мл водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 7,5-7,8. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH (від ДР1.1, ДР 1.2). Готову композицію закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хвилин.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На аналітичних вагах зважують 1,5 г CaCO_3 наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл та додають 200 мл води питної та ретельно перемішують. Закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На аналітичних вагах зважують 1,5г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ наважки поміщають в колбу об'ємом 250 мл та додають 100 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

Розрахунок компонентів для приготування 600 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Екструдат кукурудзяного борошна	100	60	А	300
Порошок пір'я птахів	10	6		
CaCO ₃	2,5	1,5	Б	200
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2,5	1,5	В	100

По закінченню стерилізації проводять контроль середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при (38±1)°С протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для I етапу отримання посівного матеріалу.

Для першого етапу отримання посівного матеріалу, як раніше було розраховано необхідно приготувати 6 л поживного середовища (10% від об'єму середовища для другого етапу біосинтезу). Основним джерелом поживних речовин в середовищі являється кукурудзяне борошно.

Враховуючи, що для засіву ферментеру використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого складає 600 мл, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 5,4 л.

Вміст компонентів для приготування 6 л поживного середовища наведено в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2.

Розрахунок компонентів для приготування 6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Екструдат кукурудзяного борошна	100	600	А	3,00
Порошок пір'я птахів	10	60		
CaCO ₃	2,5	15	Б	2,00
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2,5	15	В	0,4

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 600 г борошна кукурудзяного та вагах зважують 50 г порошку пір'я птахів. Наважки поміщають у збірникта додають 2,5 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 3,5 л водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 7,5-7,8. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH. Проводять розварювання нерозчинних компонентів розчину отриманого на ДР 3.2.1 шляхом подачі пару в рубашку реактора та нагріваючи розчин до 80°C. Після чого стерилізують композицію А при температурі 112-115°C упродовж 30 хвилин

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 15 г CaCO₃ наважку поміщають в колбу об'ємом 2 л та додають 0,5 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення.

Доводять об'єм приготованого розчину до 1 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хвилин.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 15г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ наважку поміщають в колбу об'ємом 1 л та додають 0,2л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 0,4 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хвилин.

По закінченню стерилізації проводять контроль компонентів середовища на стерильність. У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для II етапу одержання посівного матеріалу

Для другого етапу отримання посівного матеріалу, як раніше було розраховано необхідно приготувати 60 л поживного середовища. Основним джерелом поживних речовин в середовищі являється екструдат кукурудзяного борошна. Враховуючи, що для засіву ферментеру використовують рідкий посівний матеріал, отриманий на I етапі біосинтезу, об'єм якого складає 6л, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 54 л.

Вміст компонентів для приготування 60 л поживного середовища наведено в таблиці 6.3.

Розрахунок компонентів для приготування 60 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Екструдат кукурудзяного борошна	100	6000	А	30,00
Порошок пір'я птахів	10	600		
CaCO ₃	2,5	150	Б	20,00
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2,5	150	В	4,0

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6000 г кукурудзяного борошна та 600г порошку пір'я птахів. Наважки поміщають в реактор та додають 20 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 30 л водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 7,5-7,8. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH. Проводять розварювання нерозчинних компонентів розчину шляхом подачі пару в рубашку реактора та нагріваючи розчин до 80°C. Після чого стерилізують композицію А при температурі 112-115°C упродовж 30 хвилин

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 150 г CaCO₃ наважку поміщають в реактор об'ємом 25 л та додають 10л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 20 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хвилин.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 150г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ наважку поміщають в реактор об'ємом 5 л та додають 3л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 4 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хвилин.

По закінченню стерилізації проводять контроль компонентів середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для етапу біосинтезу кератинази.

Для основного етапу біосинтезу в ферментері, як раніше було розраховано необхідно приготувати 600,0 л поживного середовища. Основним джерелом поживних речовин в середовищі являється борошно кукурудзяне екструдоване.

Враховуючи, що для засіву ферментеру використовують рідкий посівний матеріал, отриманий на II етапі біосинтезу, об'єм якого складає 60 л, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 540 л.

Вміст компонентів для приготування 600,0 л поживного середовища наведено в таблиці 6.4.

Розрахунок компонентів для приготування 600,0 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Екструдат кукурудзяного борошна	100	60	А	300,00
Порошок пір'я птахів	10	6		
CaCO ₃	2,5	1,5	Б	200,00
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2,5	1,5	В	40,0

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у реактор подають 60 кг екструдованого кукурудзяного борошна та 6 кг порошку пір'я птахів та додають 200 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення всіх компонентів поживного середовища. Доводять об'єм приготованого розчину до 300 л водою питною та контролюють рН отриманого поживного середовища. рН повинен бути 7,5-7,8. У разі невідповідності значення рН, його корегують додаванням 0,1 М розчину соляної кислоти або 0,1 М розчином NaOH. Проводять розварювання нерозчинних компонентів розчину шляхом подачі пару в рубашку реактора та нагріваючи розчин до 80°C. Після чого стерилізують композицію А при температурі 112-115°C упродовж 30 хвилин.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 1,5 кг CaCO₃ наважку поміщають в реактор об'ємом 250 л та додають 150 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 200 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хвилин.

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції Б.

На вагах зважують 1,5 кг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ наважку поміщають в реактор об'ємом 50 л та додають 30 л води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Доводять об'єм приготованого розчину до 40 л водою питною. Готовий розчин стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хвилин.

По закінченню стерилізації проводять контроль компонентів середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 24 годин.

У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури.

Колекційну культуру *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД зберігають у пробірках з скошеним МПА в холодильнику при температурі 2-8°C. Пересіви здійснюють кожні 2-3 місяці. Всі роботи з культурою проводять в строго асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД, що зберігається у пробірках з скошеним сусло-агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з МПА і вирощують в термостаті при 40°C протягом 24 годин.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах.

Отримані ізольовані колонії *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД за допомогою петлі (від ТП 3.2.) висівають на пробірки з скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки) і вирощують в термостаті при 40°C протягом 24 годин.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах з рідким поживним середовищем на качалках.

Для вирощування інокуляту отримані стерильні композиції для приготування поживного середовища (від ДР2.1.) в стерильних умовах

об'єднують, перемішують та розливають по 200 мл в 3 стерильних качалочних колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus licheniformis* ВКМ В-222ОД, вирощену на скошеному м'ясо-пептонному агарі, вносять 5 мл фізіологічного розчину та суспендують клітини в розчині, піпеткою відбирають одержану клітинну суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем (від ДР2.1.). Для засіву однієї колби використовують клітинну суспензію отриману з однієї пробірки.

Інокулянт вирощують протягом 24 годин при температурі 40°C та швидкості перемішування 38 об/хв. Через 20-22 год виконують мікробіологічний контроль, а також визначають біомаса за оптичною густиною.

ТП 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10л.

Перший етапу біосинтезу здійснюють в інокуляторі об'ємом 10 л, що містить 5,4 л стерильного поживного середовища (від ДР 2.2.). В інокулятор вносять посівний матеріал з колб (від ТП 4.3.) Проводять процес культивування при швидкості перемішування 38 об/хв. та витратах повітря 2л/л. Тривалість культивування складає 24 годин. Через кожні 8 год виконують мікробіологічний контроль, а також визначають оптичну густина біомаси.

ТП 5.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л.

Для другого етапу біосинтезу, що здійснюють в інокуляторі об'ємом 100 л, що містить 54 л стерильного поживного середовища (від ДР 2.3.). В інокулятор вносять інокулятору з першого етапу отримання посівного матеріалу (від ТП 3.5) Проводять процес культивування при швидкості перемішування 38 об/хв. та витратах повітря 2л/л. Тривалість культивування складає 24 годин. Періодично (кожні 8 годин) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування

Для основного етапу біосинтезу, що здійснюють в ферментері об'ємом 1 м³, що містить 540 л стерильного поживного середовища (від ДР 2.4). В ферментер вносять посівний матеріал з інокулятору з другого етапу отримання інокуляту (від ТП 3.6.) Проводять процес культивування при швидкості перемішування 38 об/хв. та витратах повітря 2л/л×год. Тривалість культивування складає 72 годин. Періодично (кожні 8 годин) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси та цільового продукту. Максимальна кератинолітична активність у культуральній рідині на 72 годині становить 96 од / мл.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

ЗВ 7.1. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря, що надходить від ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1, відправляють у системи знешкодження повітряних відходів.

ЗВ 7.2. Знешкодження рідких відходів

Розчини миючих та дезінфікуючих засобів від ДР 1.2.1, ДР 1.2.2, ДР 1.3.1, ДР 1.3.2.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж усіх стадій отримання посівного матеріалу та під час основного етапу біосинтезу проводять контроль за технологічними показниками процесу та періодично (кожні 8 годин) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси та кератолітичну активність, а також вмісту глюкози.

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль поживних середовищ та якість посівного матеріалу проводиться двома методами. Перший метод – метод прямого мікроскопіювання (метод «роздавленої краплі»). Другий метод – метод висівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем.

Для аналізу стерильності поживного середовища відібрані проби мікроскопують методом «роздавленої краплі». Результатом мікроскопіювання поживного середовища має бути відсутність мікробіоти в полі зору препарату. Крім того, проби поживного середовища розсівають на чашки Петрі із агаризованими середовищами Сабуро та МПА. Результатом має бути відсутність на чашках Петрі мікробних контамінацій. При наявності мікробіоти в поживному середовищі його не використовують для засіву.

Якість посівного матеріалу визначають як методом прямого мікроскопіювання, так і висівом на чашки Петрі.

Посівну культуру розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів і грибів.

Результатом мікроскопіювання посівного матеріалу має бути відсутність сторонньої мікробіоти в полі зору препарату. А також відсутність на чашках Петрі сторонніх мікробних контамінацій.

					НУХТ БТЕК			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Барановська Ю.В.						
Перевірів		Красінко В.О.						
Реценз.								
Н.Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
					Лім.		Арк.	Акрушів
								145
							52	
					Контроль виробництва		Кафедра БТМ	

Клітини *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2220 являють собою грампозитивні, поодинокі рухливі палички розміром 0,6-0,8 і 0,2-0,3 мкм, спороутворюючі. У логарифмічній фазі росту утворюються ланцюжки з 2-3-х клітин більш витягнутої форми, на 56 годинах зростання (стаціонарна фаза) ланцюжки розпадаються, клітини товщають, з'являються спори, що мають центральне положення і овальну форму.

На мясопептонному агарі при t 40°C протягом 24 години) штам дає нормальний середній ріст, колонії неправильної форми з піднятим центром, слизові, гладкі, непрозорі, 2-5 мм в діаметрі, в процесі росту поступово набувають світло-коричневий пігмент. До 72 годинах зростання виникають спори на всій поверхні колонії, колір спор - світло-коричневий, що переходить в темно-коричневий після 120-144 годин росту.

При наявності сторонньої мікробіоти в посівному матеріалі його не використовують для засіву.

7.2. Визначення показників росту біомаси та концентрації джерела вуглецю

7.2.1. Визначення концентрації біомаси.

Концентрацію біомаси визначають непрямим методом за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

Для контролю відбирають 0,5 мл культуральної рідини та вимірюють в кюветі товщиною 2,5 см на спектрофотометрі при світлофільтрі з довжиною хвилі $\lambda=590$ нм. Як розчин порівняння використовують поживне середовище. Концентрацію біомаси визначають за калібрувальним графіком

7.2.2. Визначення глюкози в культуральному середовищі

Визначення глюкози проводять глюкозооксидазним методом. Для цього культуральну рідину центрифугують 20 хв при 3000 об/хв. Отриманий супернатант розбавляють дистильованою водою в 100 разів, далі змішують в пробірці 0,3 мл супернатанту 15 мл трихлороцтової кислоти. В іншу

пробірку наливають 15 мл трихлороцтової кислоти (контроль). В обидві пробірки додають 2 мл розчину фосфату натрію та 0,1 мл розчину глюкозооксидази. Перемішують. Залишають при кімнатній температурі на 1 год, потім аналізують на ФЕК при довжині хвилі 530 нм. Розрахунок проводять за калібрувальним графіком [13]

7.2.3. Визначення концентрації кератинази

Активність кератинази визначають із застосуванням субстрату Азо-Кератина. Кількісне визначення активності кератинази проводили фотометрично за збільшенням інтенсивності кольоровості супернатанту, в який вивільняється синій барвник [21]. Гідроліз проводили при 50°C і pH 7,5 протягом 30 хв. Реакцію припиняли додаванням 10%-ної ТХУ. У відфільтрованих супернатантах вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 450 нм.

Для одиниці активності кератинази виконують збільшення оптичної густини на 0,01 за 30 хв при 50°C, pH 7,5[7].

7.3. Карта контролю

Таблиця 7.1

Карта контрольних точок виробництва ферменту кератинази

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
Кх Кт 1.1.1 <i>Приготування розчину Лойран 13</i>	Розчин Лойран 13 Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчинів	C = 2% t = ± 5°C
Кх 1.1.2 <i>Приготування робочого розчину «Бджілка»</i>	«Бджілка» Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчинів	C = 0,25%
Км Кх 1.2.1 <i>Щоденне прибирання</i>	Підлога, стіни Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль згідно пункту 1.1 цього розділу	Після прибирання	KУО < 300/см ² C = 2%
Км Кх 1.2.2 <i>Генеральне</i>	Підлога, стіни Мікробіологічний	Мікробіологічний контроль згідно	Після прибирання	KУО < 800/см ²

<i>прибирання</i>	контроль	пункту 1.1 цього розділу		C = 2%
Кт 1.3.1 <i>Миття обладнання</i>	Обладнання та комунікації Температура мийного розчину	Термометр	Під час миття	t = 70-80°C
Кт 1.3.2 <i>Ополіскування обладнання</i>	Обладнання та комунікації Час ополіскування	Годинник	Після миття	T = 30 хв
Кт 1.3.4 <i>Перевірка на герметичність</i>	Обладнання та комунікації Тиск, час перевірки, герметичність обладнання	Годинник, манометр	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,2 МПа, t = 60 хв
Кт Км 1.3.5 <i>Стерилізація обладнання</i>	Обладнання та комунікації Температура та час стерилізації, мікробіологічний контроль	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 1.1 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації	t = 130-135°C, T = 60 хв відсутність мікробіоти
Кт 2.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	Повітря на виході з фільтра грубого очищення Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 80%
Кт 2.3 <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря Температура, тиск	Термометр, манометр	Вимірюється після стиснення	t = 125-130°C, P = 0,35 МПа
Кт 2.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охолоджене повітря Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після охолодження та видалення зайвої вологи	t = 25-30°C, w = 60-70%
Кт 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після нагрівання	t = 50°C, w = 50%
Кт 2.6 <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 95%
Кт, Км 2.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Після проходження через фільтр	E = 99,99%, відсутність мікробіоти

Кт 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1 <i>Заварювання композиції А</i>	Композиція А Температура, час	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час заварювання	$t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 15\text{ хв}$
Кт, Км 3.1.2, 4.2.2, 3.3.2 <i>Стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.1 <i>Заварювання композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час заварювання	$t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 15\text{ хв}$
Кт, Км, Кх 4.4.2 <i>Стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Bacillus licheniformis</i> ВКМ В-2220 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти,	Мікробіологічний контроль, термометр	Температура контролюється під час зберігання в холодильнику, мікробіологічний контроль та пересіви проводять кожні 3 місяці	Відсутність сторонньої мікробіоти, підтримання температури $t = 4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3\text{ місяці}$

	відсутність неконтрольованих мутацій, температура, час			
Кт, Км 5.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Колекційна культура <i>Bacillus licheniformis</i> ВКМ В-2220 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій, температура, час	Мікробіологічний контроль, термометр, годинник	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	Відсутність сторонньої мікробіоти, $t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год
Кт, Км 5.3 <i>Вирощування культури на агаризованих тьсередовищах</i>	Ізольовані колонії <i>Bacillus licheniformis</i> ВКМ В-2220 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, час	Мікробіологічний контроль, годинник	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	Відсутність сторонньої мікробіоти, $\tau = 24$ год
Кт, Км 5.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин	$t = 28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\omega = 240\text{-}250$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 8 годин;	$t = 28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\omega = 240\text{-}250$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.1	Посівний матеріал ,	Годинник,	Температура і	$t = 28 \pm 2^{\circ}\text{C}$,

<i>Виробниче культивування у посівному апараті об'ємом 100 л</i>	тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічн а чистота культури	термометр технічний, тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль рН датчик	швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання – кожні 8 годин; рН доводять після додання всіх композицій	$\tau = 120$ год, $\omega = 240-250$ об/хв, $pH = 6,2-6,4$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 1000 л</i>	Культуральна рідина , тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічн а чистота культури	Годинник, термометр технічний, тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль рН датчик	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання – кожні 8 годин; рН доводять після додання всіх композицій	$t = 28 \pm 2$ °C, $\tau = 120$ год, $\omega = 240-250$ об/хв, $pH = 6,2-6,4$ відсутність сторонньої мікробіоти

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гауровиц Ф. Химия и функции белков. / Под ред. Шпикитера В. О. М. : Мир, 1968. С. 252-257.
2. Dhar SC. , Sreenivasulu. // Шкіряна наука, вип. 31 (10), 1984. С. 261–267.
3. Nayaka S. Occurrence and extracellular enzyme potential of Actinomycetes of a thermotolerant, northern region of Karnataka, India / S. Nayaka, G.M. Vidyasagar // International Multidisciplinary Research Journal.- 2012.- №2(12).- P. 40-44.
4. Cai C.-G. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain / C.-G. Cai, J.-S. Chen, J.-J. Qi, Y. Yin, X.-D. Zheng // J Zhejiang Univ Sci B.- 2008.- №9(9).- P. 713–720.
5. Subash C. B. Gopinath, Periasamy Anbu, Thangavel Lakshmipriya, Thean-Hock Tang, Yeng Chen, Uda Hashim, A. Rahim Ruslinda, and M. K. Md. Arshad Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. - 2015, Article ID 140726, 10 pages
6. Ghaffar I, Imtiaz A, Hussain A, et al. Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview. Int Microbiol. – 2018. – 21(4):163-174. doi:10.1007/s10123-018-0022-1
7. Verma A, Singh H, Anwar S, et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. Crit Rev Biotechnol. 2017;37(4):476-491. doi:10.1080/07388551.2016.1185388
8. Daroit DJ, Brandelli A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. Crit Rev Biotechnol. 2014;34(4):372-384. doi:10.3109/07388551.2013.794768
9. Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl Microbiol Biotechnol. 2006;70(1):21-33. doi:10.1007/s00253-005-0239-8

10. *Gupta R, Sharma R, Beg QK*. Перегляд мікробних кератиназ: протеази нового покоління для стійкої біотехнології. *Біотехнол Крит Рев*. 2013; 33 (2): 216–228. doi: 10.3109 / 07388551.2012.685051
11. *Gupta R, Rajput R, Sharma R, Gupta N*. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(23):9931- 9940. doi:10.1007/s00253-013-5292-0
12. Патент. RU2177994C2 Н.В. Цурикова, Л.І., Нефедова, О.Н., Окунев, А.П. Синицин, В.М. Черноглазов, Т.А. Воекова, Є.В. Костилева Штамм бактерій *Bacillus licheniformis* - продуцент кератинази - 2000р
13. *Лукомская И.С., Городецкий В.К.* Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы крови в норме и при диабете // Биохимия. – 1996. – Т. 26, № 3. – С. 477-482.
14. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://app.agro-online.com/64466/details/>
15. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/RU2251886C2/ru>
16. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.bioreactors.net/industrial-bioreactors>
17. *Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б.* Общая технология микробиологических производств/ Москва: «Легкая и пищевая промышленность», 1982
18. Моющее средство для жировых и белковых загрязнений, Лойран-про-13 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://velvis.uaprom.net/p606636-moyuschee-sredstvo-antimikrobnym.html>
19. Новохлор-Екстра[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>
20. Бджілка[Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/p111364404-moyuschee-sredstvo-dlya.html>
21. *Vilcinskas A, Schwabe M, Brinkrolf K, Plarre R, Wielsch N, Vogel H*. Larvae of the Clothing Moth *Tineola bisselliella* Maintain Gut Bacteria that

Secrete Enzyme Cocktails to Facilitate the Digestion of Keratin.//Microorganisms.
- 2020;8(9):1415. Published 2020 Sep 14. doi:10.3390/microorganisms8091415