

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)

« ____ » _____ 2020 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« ____ » _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Культивування *Bacillus licheniformis* для одержання комплексного протеолітичного препарату

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

Закрасняний Андрій Олексійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник Пенчук Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент Клімчук В. О.

(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Закрасняного Андрія Олександровича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus Licheniformis* для комплексного протеолітичного препарату

керівник роботи Пенчук Ю.М. доцент, к.т.н

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи Об'єм ферментера – 5 м³, коефіцієнт заповнення – 05, *Bacillus Licheniformis*.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту, обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, біосинтез цільового продукту, обґрунтування вибору технологічної схеми, матеріальний баланс і розрахунок обладнання, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва, автоматизація ділянки виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)

Апаратурна та технологічна схема «Культивування *Bacillus Licheniformis* для одержання комплексного протеолітичного препарату», схема автоматизованої ділянки виробництва.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.04.2020	31.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	20.03.2020-25.03.2020	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	25.03.2020-01.04.2020	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування,	01.04.2020-10.04.2020	
4	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту,	10.04.2020-20.04.2020	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	20.04.2020-01.05.2020	
6	РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	01.05.2020-05.05.2020	
7	РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	05.05.2020-10.05.2020	
8	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми,	10.05.2020-15.05.2020	
9	РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	15.05.2020-23.05.2020	
10	РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.	23.05.2020-31.05.2020	

Здобувач _____

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____

(підпис)

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології (біосинтезу, виділення та очищення) протеази штамом *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д, який на середовищі з кукурудзяним борошном, соєвим борошном, CaCO_3 та $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ за 60 годин синтезує 320 од/мл протеази в культуральній рідині та 1600 од/г сухого препарату.

Даний фермент використовують для виробництва кормових добавок в сільськогосподарстві (птиці, свиней, риби).

У даному дипломному проекті розраховано техніко-економічне обґрунтування річної потреби протеази для птахофабрики «ОрілЛідер». Розрахована потужність виробництва протеази становить 7500 кг за рік.

Технологічний процес складається з допоміжних (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, підготовка повітря для розпилюючої сушарки, приготування та стерилізація поживного середовища) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторах об'ємом 5 л 50 л, посівний апарат 500 л, виробничого біосинтезу ферментер об'ємом 5 м³, відділення культуральної рідини від біомаси на центрифугі, концентрування на вакуум випарному апараті, процес сушіння на розпилюючій сушарці.).

Дипломний проект викладений на 150 стор. друкованого тексту, містить 23 таблиці, 2 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (39 джерел), додатків та графічної частини (4 креслення формату А1 та 2 креслення формату А3).

Ключові слова: фермент, протеаза, сільське господарство, біосинтез, виділення, очищення, *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	13
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	18
2.2. Морфолого-культуральні ознаки	18
2.3 Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.	19
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	20
РОЗДІЛ 3. ТЕО	21
3.2 Потреба у цільовому продукті.	21
3.3 Розрахунок потужності виробництва.	22
3.4 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.	22
3.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.	24
3.6 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 50 л.....	24
3.7 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці (5 л).....	25
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	26
4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату	26
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	28
РОЗДІЛ 5 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	30
5.1 Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	30
5.2. Обґрунтування вибору типу ферментера та ферментного обладнання.....	31
5.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	33
5.4. Обґрунтування особливостей приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу	35

5.5 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору миючих та дезінфікуючих засобів.....	38
5.6 Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів.	40
5.7 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій, повітря	45
5.8 Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря.....	47
5.9 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	50
5.10 Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту.....	51
5.10.1 Обґрунтування способу збереження культуральної рідини.	53
5.10.2 Обґрунтування розділення культуральної рідини.	54
5.10.3 Обґрунтування способу концентрування.	60
5.10.4 Обґрунтування способу сушіння ферментного препарату	64
5.10.5 Обґрунтування стадії пакування цільового продукту	67
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНЕННЯ	69
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	92
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	96
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	111
9.1. Мікробіологічний контроль.	111
9.2. Визначення концентрації біомаси.....	112
9.3. Визначення активності протеази.....	114
9.4. Визначення концентрації амінного азоту.....	115
9.5. Визначення джерела вуглецю	117
9.6. Визначення протеолітичної активності протеази (модифікований метод Ансона).....	119
9.7. Визначення білку за методом Лоурі	121
9.8. Просіювання протосубтіліну.....	123
9.9. Визначення вологи.....	125
9.10. Визначення зовнішнього вигляду і кольору протосубтіліну	128
РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОЇ ДІЛЯНКИ З ФОРМУВАННЯМ ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ	

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	148
ДОДАТКИ	152

ВСТУП

Підвищення ефективності використання поживних речовин корму є одним із важливих завдань птахівництва. Досягнення в галузі генетики, селекції прогнозують воістину фантастичні показники конверсії корму. Максимальна реалізація «планового» генетичного потенціалу, закладеного постачальниками кормів птиці, буде неможлива без нових технологій в годівлі. Сьогодні загальноприйнятою практикою є використання ферментів для підвищення поживної цінності раціону та пом'якшення варіабельності поживного складу компонентів корму, таких як протеаза[1].

Протеаза — фермент із класу гідролаз, розщеплює пептидний зв'язок між амінокислотами в білках. Протеаза є одними з найбільш важливих промислових ферментів. Варто відзначити, що курчата-бройлери, які додатково до раціону отримували ферментний препарат достовірно переважали за живою масою птицю контрольної групи на 13% [1, 2].

Так, протеази виробляються власним організмом птиці у вигляді пепсину, трипсину, хілотрипсину, еластази. Однак добре відомий у птахівничій науці й практиці факт, що перші 10 днів у птиці, у стартовій фазі, інтенсивно відбувається розвиток ферментативної системи, й активність власних травних ферментів (амілази, ліпази, протеази) невелика. Тому застосування екзогенних кормових протеаз може бути виправдано в цей період вирощування[1, 2].

Додавання до складу раціону курчат бройлерів кормового ферменту «Протеази» покращує конверсію корму в організмі птиці на 3,6%. Встановлено підвищення індексу продуктивності у дослідних групах на 25% супроти контрольних показників, а це своєю чергою підтверджує ефективність використання кормового ферменту «Протеази» в комбікормах курчат-бройлерів у кількості 0,025%[1].

Актуальність роботи. Використання протеази в різних галузях промисловості та великого попиту в сільському господарстві зріс великий

побут. Тому розробка технологічного високоефективного ферментного препарату на основі протеази для різних галузей є своєчасною і актуальною задачею[1].

Новизна роботи. Технологічний процес біосинтезу та виділення ферменту протеази з активністю (320 од/мл, 1600 од/г) для розчеплення пептидних зв'язків між амінокислотами білків, з використанням високоефективного штаму *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366 Д[3].

РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Протосубтілін відноситься до групи ферментних кормових добавок і є продуктом діяльності бактерій штаму *Bacillus* [3].

Розщеплюючи високомолекулярні білки, Протосубтілін збільшує в кормі вміст доступних пептидів і амінокислот. Протосубтілін знижує рівень негативного впливу інгібіторів сої та інших бобових культур на пепсин і трипсин ШКТ тварин і птахів. При цьому Протосубтілін не пригнічує і не підміняє власні протеолітичні ферменти, а діє на додаток до травних протеаз організму[3].



Рис. 1 Упаковка протосубтіліну.

Переваги:

- дозволяє замінювати дорогі компоненти корму (соевий шрот, рибне борошно) на більш дешеві (горох, соняшниковий шрот, макуха);
- дозволяє використовувати комбікорми з пониженим на 4% рівнем сирого протеїну і незамінних амінокислот при збереженні поживності раціону і продуктивності тварин і птахів;

НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Закрасняний А.О			РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант							9	151
Керівник		Пенчук Ю. М.			Кафедра БТМ			
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

- дозволяє використовувати в раціонах тварин комбікорми з підвищеним рівнем зернобобових культур (до 30-35%);
- знижує негативний ефект антиживильних речовин та інгібіторів протеаз бобових культур (сої, гороху, ріпаку та ін., а також продуктів їх переробки);
- доповнює ензиматичний фон шлунково-кишкового тракту, компенсує дефіцит травних ферментів на ранніх стадіях розвитку тварин і при стресах.

До складу препарату входять декілька ферментів:

- протеаза,
- ксілоназа,
- альфа-амілаза,
- целюлаза.

Протеолітична активність протосубтиліна становить 1600 од / г. На замовлення споживачів, активність препарату може бути збільшена[2, 3].

При додаванні препарату в кормовий раціон, засвоюваність білків, жирів і інших поживних речовин істотно зростає, завдяки їх ефективному розщепленню[3].

Максимальна активність препарату проявляється в температурному діапазоні від 30 ° С до 45 ° С, і кислотнo-лужним показником в межах рН 5,5 - 6,5[2].

Протосубтілін використовується для поліпшення якості перетравлення їжі та, як наслідок, підвищення засвоюваності поживних речовин. Найбільш ефективний у поєднанні з кормами, що містять пшеницю і ячмінь.

Препарат компенсує недостатню кількість ферментів в шлунках молодняка.

Дозування на 1 тонну кормової суміші становить:

Для поросят у віці до 2 місяців - 0,03 кг;

Норма введення протосубтіліна на 1 тону комбікорму:

дорослих свиней - 0,05 кг;

великої рогатої худоби і коней - 0,03 кг;

курчат бройлера, курей несучок та іншої птиці - 0,07 кг.

Ефективність використання протосубтіліна:

- збільшення живої маси курчати бройлера до 4% з одночасним зниженням кормових витрат до 3-5%[1, 2];

- поліпшення несучості до 5% зі зниженням витрачається на 10 яєць корми до 6%;

- підвищення середньодобового приросту живої маси свиней на етапі відгодівлі до 9% зі зниженням кормових витрат на 11%[1, 2].

Зберігання препарату Протосубтілін.

Термін зберігання препарату 12 місяців від дня його виготовлення при температурі від мінус 25 до +25 ° С. У процесі зберігання понад вказаного терміну препарат придатний до вживання, але допускається зниження ферментативної активності, що необхідно враховувати при розрахунку дозування при його застосуванні[2].

РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

У сучасній промисловості використання ферментів дозволяє підвищити ефективність сільського господарства, що різняться своїми фізичними властивостями, субстратною специфічністю та оптимумом рН[3].

При виборі біологічного агента, було обрано такі штами: Штам *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2366Д, *Bacillus macerans* BS-04 та *Bacillus subtilis* P-1.

•Штам *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2366Д - отриманий з штаму *B. licheniformis* ВКМ В-2184Д з використанням багатоступінчастої генетичної селекції із застосуванням ультрафіолетового опромінення з одночасним впливом хімічних мутагенів. Культивування штаму *B. licheniformis*-60 ВКМ У-2366 Д здійснюють в аеробних умовах глибинного культивування при температурі 37 ° С протягом 48-72 годин, рН середовища 7,5-7,8. [3]

•*Bacillus macerans* BS-04 - продуцент пектінази, протеази, ксиланаз і амілази. Даний штам дозволяє отримати широкий комплекс ферментів і характеризується коротким циклом розвитку з підвищеним накопиченням біомаси. [4]

•*Bacillus subtilis* P-1- продуцент протеази з високою загальною і питомою активністю в культуральній рідині. Штам *B. subtilis* P-1 отриманий селекцією з штаму *Bacillus subtilis* 534 шляхом багаторазового пересіву. Вирощується на різних поживних середовищах. Аероб, грампозитивний, володіє рухливістю, оптимальні умови росту при температурі 37°C і рН 6,0-7,5. [5]

					НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Закрасняний А.О			<i>РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант							12	151
Керівник		Пенчук Ю. М.				13		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

На першому етапі вибору різні штами продуцентів порівнюються за показниками утворення протеази: активність ферменту в середовищі та час,

за який вона утворена. Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання протеази з використанням протеаз наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Особливості одержання протеази

Біологічний агент	Склад поживного середовища	Ферментативна активність, од/мл	Тривалість культивування, год	Умови культивування	Література
<i>Bacillus macerans</i> BS-04	Буряковий жом мелений - 20,0 CaCl ₂ – 0.9 Сода – 2.0 (NH ₄) ₂ HPO ₄ = 2.6 NaH ₂ PO ₄ – 2.2 Кукурудзяний екстракт - 7,4 H ₂ O	0.12 од / мл	24	42°C pH - 7,8	[4] Пат. № 2272838 РФ С12N9/14, С12N1/20. Штамм бактерії <i>bacillus macerans bs-04</i> - продуцент пектинази, протеази, ксиланазы и амилазы./Полетаева О. А. Шишкова Э. А. Бравова Г. Б. Нестеренко Е. А. Бурмистрова В. В.
<i>Bacillus subtilis</i> P1	картопляний крохмаль - 10,0 Кукурудзяний екстракт - 1,5 (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 2,0 K ₂ HPO ₄ - 2,0 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 2,0 CaCO ₃ - 5,0 CaCO ₃ - 2,5, MgSO ₄ - 2,5;	28-32 од / мл	24	37°C, pH 7,5-7,8	[5] Пат. №2208633 РФ С12R1/125, С12N1/20, С12C-С12Q. Штамм <i>bacillus subtilis p-1</i> - продуцент протеази./Т.Н. Кузнецова, Р.С. Нафиков, М.М. Алсынбаев, В.Ф. Кулагин. – Оубл. 19.10.1998

<i>Bacillus licheniformis-60</i> ВКМ В-2366Д	Кукурудзяне борошно - 100, Соеве борошно - 10, CaCO ₃ -2,5, MgSO ₄ ×7H ₂ O - 2,5	320 од/мл	60	37°C, рН - 7,5-7,8	[3] Пат. № 2303066, С12N9/56, С12N1/20. Штамм бактерий bacillus licheniformis- продуцент щелочной протеазы/ Цурикова Н. В., Нефедова Л. И. , Окунев О.Н., Сеницын А. П. , Черноглазов В. М., Воейкова Т. А., Костылева Е. В. – Опубл. 20.07.2007.
---	--	-----------	----	-----------------------	--

Bacillus macerans BS-04 - даний штам дозволяє отримати широкий комплекс ферментів і характеризується коротким циклом зростання з підвищеним накопиченням біомаси. За 24 години культивування дав результат у - 0.12 од/мл, є низьким результатом активності порівняно зі штамми - *Bacillus subtilis* P1 – 28 од/мл, період культивування 24 години та *Bacillus licheniformis-60* ВКМ В-2366Д -320 од/мл за 60 годин[3,4].

Практично за однакових умов культивування активність у штамів різна.

Така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою для вибору біологічного агента. Тому на другому етапі порівнювали вартість поживних середовищ, на яких ростуть продуценти (табл. 2.2).

Вартість компонентів поживного середовища для культивування штамів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Ціна компонента поживного середовища, грн/кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus macerans</i> BS-04	Буряковий жом мелений - 20,0	8	0.16	[40]
	CaCl ₂ – 0.9	27	0.0243	[40]
	NaHCO ₃ – 2.0	3.5	0.007	[40]
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ = 2,6	15	0.039	[40]
	Кукурудзяний екстракт - 7,4	55	0.407	[40]
Вартість 1 л середовища – 0,63 грн.				
<i>Bacillus subtilis</i> P1	картопляний крохмаль - 10,0	17	0.17	[40]
	K ₂ HPO ₄ - 2,0	15	0.03	[40]
	CaCO ₃ – 5.0	3	0.015	[40]
	Кукурудзяний екстракт - 1,5	55	0.0825	[40]
	MgSO ₄ - 2,5;	7,50	0,01875	[40]
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ - 2,0	15	0.034	[40]
Вартість 1 л середовища – 0,35 грн.				
<i>Bacillus licheniformis</i> -60 ВКМ В-2366Д	Кукурудзяне борошно - 100,	7,7	0,77	[40]
	соєве борошно - 10	17	0,17	[7]
	CaCO ₃ -2,5,	3	0,0075	[7]
	MgSO ₄ ×7H ₂ O - 2,5	7.50	0.01875	[7]
Вартість 1 л середовища – 0,96625 грн.				

Примітка.* Ціни наведено станом на січень 2020 р.

Отже, за даними наведеними у таблиці 2.2 можна зробити висновок, що ціна середовища *B. macerans* BS-04 для культивування становить 0,6373 грн., за 1 літр, вартість 1 літру *B. subtilis* P1 становить 0,35025 грн., та вартість останнього штаму *B. licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д - 0,96625 грн. *B. licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д є доволі дорогим для використання його у виробництві, порівняно з іншими двома штамами. Але для того, щоб остаточно обрати біологічний агент на третьому етапі розрахували умовну вартість одиниці активності протосубтіліну (табл.2.3) [7].

Таблиця 2.3

Умовна вартість одиниці активності протеази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Ферментативна активність, од/мл	Умовна вартість одиниці активності, грн./од	Тривалість культивування, год	Активність ферменту, одержана за год, од/год
<i>Bacillus macerans</i> BS-04	0,35	0.12	0,3426	24	0,005
<i>Bacillus subtilis</i> P1	0,63	32	0,02	24	1,333
<i>Bacillus licheniformis</i> -60 ВКМ В-2366Д	0,96625	320	0,01	60	5,3

Узагальнивши усі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання протеази *B. licheniformis*-60 ВКМ В-

2366Д, незважаючи на те, що він має більший час культивування та дорожче середовище, проте має більшу ферментативну активність за годину ніж інші штами.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки

Клітини являють собою грампозитивні, поодинокі рухливі палички розміром 0,6-0,8 і 0,2-0,3 мк, спороутворюючі. У логарифмічній фазі росту утворюються ланцюжки з 2-3-х клітин більш витягнутої форми, до 56 годинах зростання (стаціонарна фаза) ланцюжка розпадаються, клітини товщають, з'являються суперечки, мають центральне положення і овальну форму[7].

2.3 Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.

Аероб. Температурний діапазон зростання - 10-55 ° С. Оптимальна температура зростання - 37 ° С. Зростає при значеннях рН середовища - 5-10. Оптимум рН зростання - 7,3-7,8[3].

Желатин розріджує. Казеїн швидко гідролізує. Нітрати відновлює до нітритів. 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 [3].

Вид *Bacillus licheniformis*, до якого належить штам *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ У-2366 Д, не числиться в якості патогенного в «Положенні про порядок обліку, зберігання, обігу, відпуску і пересилки культур бактерій, вірусів, рикетсій, грибів, найпростіших, мікоплазм, бактеріальних токсинів, отрут біологічного походження». Відсутня в списках патогенних бактерій за Положенням МОЗ і в списках патогенних

бактерій в Official Journal of the European Communities NC 217/3237, 24.08.92.

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Класифікація для *Bacillus Licheniformis* наведена згідно літератури [6].

- Царство
 - *Bacteria*
- Тип / Відділ
 - *Firmicutes*
- Клас
 - *Bacilli*
- Загін / Порядок
 - *Bacillales*
- Сімейство
 - *Bacillaceae*
- Рід
 - *Bacillus*
- Вид
 - *Bacillus licheniformis* (Weigmann, 1898) Chester, 1901

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Ферменти на відміну від гормонів і біостимуляторів мають інший механізм впливу на організм тварин, при цьому вони не накопичуються в організмі й продуктах тваринництва і не входять до складу кінцевих продуктів . У травному каналі тварин і птиці виробляються власні ферменти, за допомогою яких і відбувається перетравлення поживних речовин кормів. Дорослі тварини можуть перетравлювати до 60-70 % поживних речовин корму, хоча травні залози виробляють достатню кількість пепсину, трипсину, амілази, ліпази та інших травних ферментів. Відомо, що молодняк тварин народжується із недорозвиненою ферментною системою травлення [1,7].

Підвищення перетравності поживних речовин дало б можливість отримати додаткову продукцію за тих самих витрат кормів. Питання про підвищення ефективності використання кормів у тваринництві є досить актуальним, сьогодні ведеться постійний пошук шляхів вирішення проблеми, при цьому використовують ряд препаратів та кормових добавок, серед яких вагоме місце відводиться ферментним препаратам [1,7].

3.2 Потреба у цільовому продукті.

Розрахунок потреби у протосубтіліні буде проводитися для однієї птахоферми – ПрАТ «Оріль-Лідер»[8].

На фабриці вирощують 42 928 221 курчат-бройлерів.

В період вирощування (42 дні) на одну птицю витрачається приблизно 4 кг корму.

Відповідно за один період вирощування на фабриці використовують корму:

					НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Закрасняний А.О			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ		
Консультант							
Керівник		Пенчук Ю. М.				19	151
Зав.кафедри		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ20		

$$4 \cdot 42\,928\,221 = 171\,712\,800 \text{ кг, або } (171\,712.8 \text{ т})$$

Середня добова доза ферментного препарату приблизно становить 600 г/т корму[1].

Кількість препарату за період годівлі буде становити:

$$0.06 \cdot 171\,712.8 = 1030 \text{ т}$$

На ринку України, крім препарату що буде вироблятися, представлено ще 4 ферментні препарати схожої дії (табл. 3.1):

Таблиця 3.1

Ферментні препарати

Назва препарату	Ферментний склад препарату	Країна виробник
Проторізін(Ензим)	протеаза (кисла, нейтральна і лужна)	Україна
Альфалад	ксиланаза, кислих амілаз і протеази	Україна
Поторізін(Віват)	Нейтральні та лужні протеази, альфа-амілазу, бета-глюканазу, ксиланазу і целлюлазу	Україна
Проторізін(Укр-Агро Трейд)	ксиланаза, кислих амілаз і протеази	Україна

Оскільки є ще 4 препарати, то потреба в препараті, який проектується, становитиме:

$$1030 = 206 \text{ т на один період годівлі.}$$

3.3 Розрахунок потужності виробництва.

За основу, для розрахунку кількості поживного середовища, взято вже існуючий препарат «Протосубтілін А -250» з активністю протеази не менше 250 од/г.

$$206 \cdot 250 = 51500 \text{ од.}$$

Активність ферменту, що продукує *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д становить 1600 од / г [3].

Необхідно розрахувати кількість сухого препарату за активності 1600 од/г, при додаванні його в наповнювач, щоб отримати стандартний препарат з активністю 250 од/г [2].

Рузрахунок:

$$\begin{array}{r} 206 \quad \text{—} \quad 51500 \\ x \quad \text{—} \quad 1600; \end{array}$$

$$x = 6,4 \text{ т. сухого препарату.}$$

Враховуючи всі сумарні витрати цільового продукту при виділенні (15%), необхідно отримати таку кількість препарату :

$$M_{\text{суб}} = 6,4 / 0,85 = 7,5 \text{ т. препарату/рік.}$$

3.4 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.

Розрахуємо, скільки продукту потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 60, тоді маса субстрату на добу ($G_{\text{нд}}$) становитиме:

1.1. Кількість продукту на добу:

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нд}} / T_{\text{рд}} = 7.500 / 60 = 125 \text{ кг/добу.}$$

1.2. Кількість готового продукту за цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нд}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 125 \cdot 70 / 24 = 365 \text{ кг/цикл.}$$

1.3. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{\text{св}}$):

$$V_{кр} = K_1 \cdot A_{цк}/A_{кр} \cdot 1000(1-E_{св}) = 1,1 \cdot 554 \cdot 10^{-6} / (320 \cdot 1000(1-0,2)) = 2,3 \text{ м}^3$$

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі $E_{\phi} = 0,1$ становить:

$$V_{\phi} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 2,3 / (1 - 0,1) = 2,5 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{з\phi} = 0,5$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{г\phi} = V_{\phi} / K_{з\phi} = 2,5 / 0,5 = 5 \text{ м}^3$. Найближчий ферментер 5 м^3 .

Перевіряємо коеф заповнення

$$K_3 = 2,5 / 5 = 0,5.$$

1.4. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нд} / G_{цк} = 7500 / 365 = 21$$

3.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.

За виробничий цикл необхідно отримати $V_{кр} = 2,3 \text{ м}^3$ культуральної рідини, але слід врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10 % (E_{ϕ}).

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1 - E_{\phi}} = \frac{2,3}{1 - 0,1} = 2,5 \text{ м}^3$$

де E_{ϕ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Для культивування необхідний ферментер, геометричний об'єм якого становить:

$$V_{\phi.1} = \frac{2,5}{0,5} = 5 \text{ м}^3$$

Знаходимо найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{с\phi} = 5 \text{ м}^3$.

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{с\phi}} = \frac{2,5}{5} = 0,5$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у межах норми та не перевищує обраного значення, отже, він обраний вірно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{2,5}{1 + 0,1} = 2,27 \text{ м}^3$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 2,5 - 2,27 = 0,23 \text{ м}^3$$

3.6 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в посівному апараті об'ємом 500 л

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{0,23}{1 - 0,1} = 0,25 \text{ м}^3$$

Посівний матеріал (0,23 м³) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$V_{\text{ін1}} = 0,23/0,5 = 0,46 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{ін1}} = 0,5 \text{ м}^3$

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{ін1}}} = \frac{0,23}{0,5} = 0,46$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{0,23}{1 + 0,1} = 0,21 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,23 - 0,21 = 0,02 \text{ м}^3 \text{ (21 л)}$$

3.7 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 50 л

Для одержання 136 л посівного матеріалу розрахунки проводяться аналогічно.

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{21}{1 - 0,1} = 24 \text{ л}$$

Посівний матеріалу (24 л) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$V_{in.2} = 24/0,5 = 27$. Найближчим за номінальним об'ємом інокулятор $V_{сф2} = 50$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.3} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сф2}} = \frac{24}{50} = 0,5$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1 + X_{in}} = \frac{24}{1 + 0,1} = 22 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 24 - 22 = 2 \text{ л}$$

3.8 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці (5 л)

Для одержання 2 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{колб} = \frac{V_{пм3}}{V_{колб} \times K_{зк}} = \frac{2000}{750 \times 0,2} = 14 \text{ колб}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 14 качалочних колб.

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у 5 м^3 ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,5 складається з 3 стадій.

Для отримання протеази необхідно забезпечити виробництво ферментером об'ємом 5 м^3 , інокуляторами об'ємами 500 л, 50 л та качалочними колбами.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату

Ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу протеази є кукурудзяне борошно. Згідно KEGG, катаболізм кукурудзяного борошна відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфофруктокінази 1 (КФ.2.7.1.11). Наводимо схему перетворення даного вуглеводу (рис. 1).

Гліколізу у *B. licheniformis* притаманні певні особливості, пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху. Так, перетворення α -D-глюкозо-1-фосфат на α -D-глюкозо-6-фосфат відбувається під дією ферменту фосфоглюкомутази (КФ.5.4.2.2).

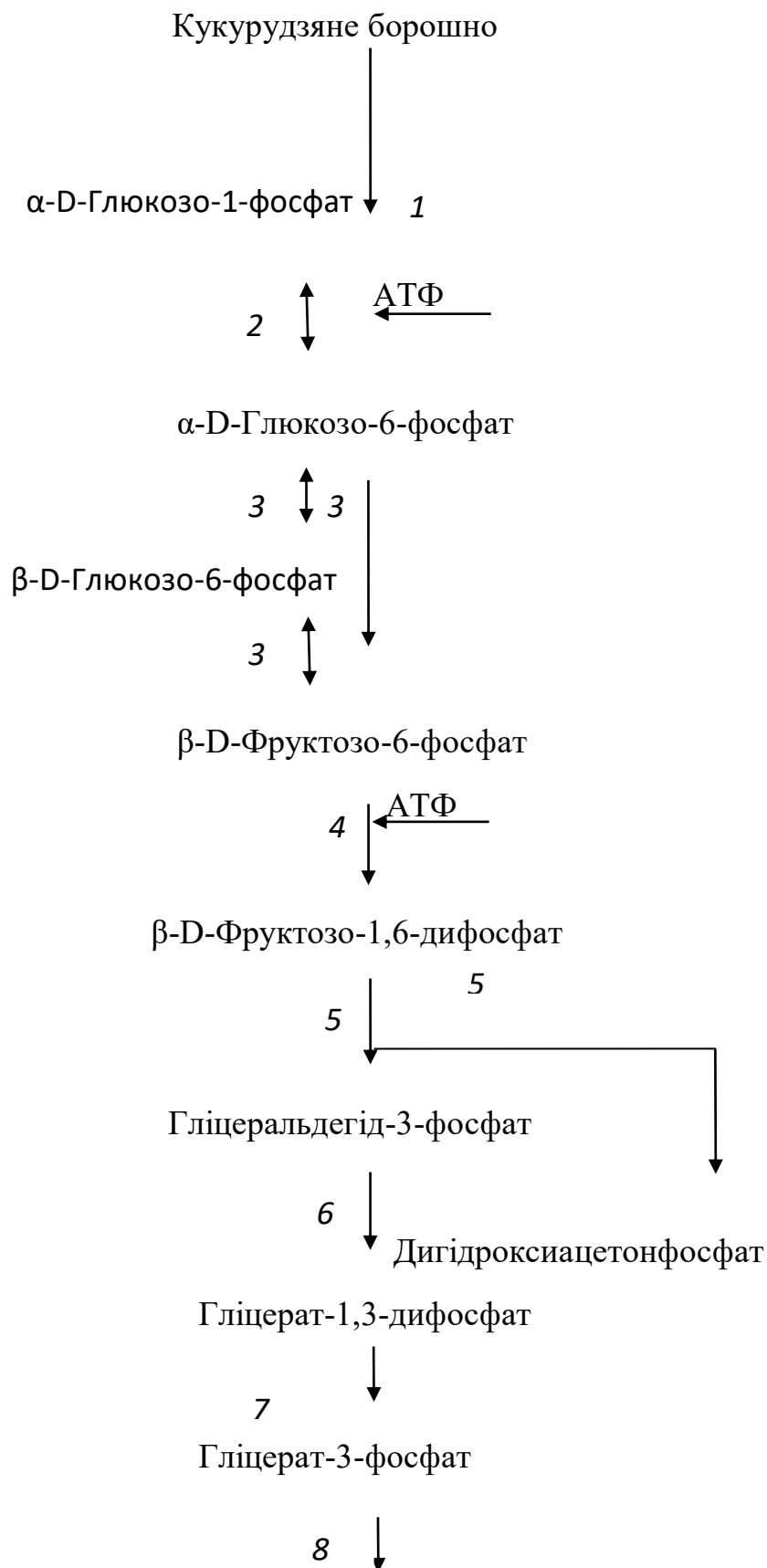
Фермент глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.) каталізує взаємне перетворення α -D-глюкозо-6-фосфату, β -D-фруктозо-6-фосфату і β -D-глюкозо-6-фосфату. Потім 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ.2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктозо-6-фосфату на β -D-фруктозо-1,6-дифосфат частина якого за допомогою фруктозо-1,6-біфосфатази I (КФ.3.1.3.11) зворотно перетворюється на β -D-фруктозо-6-фосфат.

На наступному етапі, під дією ферменту фруктозодифосфатальдолази, клас II (КФ.4.1.2.13) здійснюється перетворення β -D-фруктозо-1,6-дифосфату на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат.

Далі фермент гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12) залучається до перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат.

					НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Закрасняний А.О			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант								
Керівник		Пенчук Ю. М.				Кафедра БТМ 26		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

Фермент фосфогліцератмутаза каталізує перетворення 3-фосфогліцерату до 2-фосфогліцерату, який за допомогою енолази (КФ.4.2.1.11) перетворюється на фосфоенолпіруват.



Гліцерат-2-фосфат

10
9 ↓

Фосфоенолпіруват

10 ↓

Піруват

Рис4.1. Катаболізм кукурудзяного борошна у V. Licheniformis.

ферменти: 1 – Пулуланаза (КФ.3.2.1.41); 2 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 3 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.); 4 – 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ.2.7.1.11); 5 – фруктозодифосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12);

7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-дифосфогліцерат мутаза (КФ.5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

Заключним етапом гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват за допомогою піруваткінази (КФ.2.7.1.40). Далі піруват залучається до метаболізму за участю специфічної піруватдегідрогенази E1 (КФ.1.2.4.1) та піруватдегідрогенази E2 (КФ.2.3.1.12) [16].

Усі реакції гліколізу, за винятком трьох (гексокіназної, фосфоруктокіназної та піруваткіназної), повністю оборотні.

4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Більшість мікроорганізмів можуть синтезувати всі 20 амінокислот.

Утворення глутаміну з глутамату каталізується глутамінсинтетазою. За допомогою глутаматсинтетази аміногрупа глутаміну може бути перенесена на 2-оксоглутарат з утворенням глутамату.

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників.

Вихідними сполуками для амінокислот є – піруват, оксалоацетат, фосфоенол піруват. Оксалоацетат – це початкова точка для синтезу 6 амінокислот, 2-оксалоглутарат - попередником синтезу 4, а піруват – трьох амінокислот.

Аланін та аспартат синтезуються з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Аспаргін синтезується глутамінсинтетазою. Відновлення аспартату дає напівальдегід аспаргінової кислоти – попередник лізину, треоніну та метіоніну. Дезамінування треоніну проводиться до утворення 2-оксобутирату, який в результаті послідовної дії 4 попередніх ферментів перетворюється на ізолейцин. Під дією 4 ферментів піруват перетворюється на валін; проміжний продукт синтезу валіну є попередником в утворенні лейцину. Серин, гліцин та цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, пролін – аргінін – із глутамату. Біосинтез ароматичних амінокислот з утворенням 1) триптофану через антранілат, 2) утворення тирозину і феніл аланіну через префенат.

РОЗДІЛ 5

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Спосіб культивування *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д обираємо на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. Тому важливим є визначення таких умов:

1. Для культивування *B. licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д необхідно створити аеробні умови, так як продуцент є факультативним аеробом. Для забезпечення таких умов використовують барботер для подачі кисню та перемішуючий пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів[3].

2. Обираємо глибинний спосіб культивування, так як цей спосіб має ряд очевидних переваг, дозволяє значно скоротити виробничі площі; виключити тяжку ручну роботу; поліпшити гігієну праці; спростити механізацію та автоматизацію виробництва; робить можливість переходу на безперервний спосіб культивування[3,9].

Глибинне культивування може здійснюватися в різного роду ферментерах. В сучасних ферментерах численні параметри культивування (рН, температура, швидкість аерація тощо) контролюються автоматично.

При глибинному способі культивування більш раціонально використовуються поживні речовини середовищ, що дає можливість значно скоротити відходи виробництва та отримувати препарати ферментів з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю.

3. Виробництво протеази може здійснюватись періодичним способом культивування.

					НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Закрасяний А.О			РОЗДІЛ 5.		
Консультант					Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Пенчук Ю. М.			ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ ³⁰		

При періодичному режимі культивування культура постійно перебуває в стаціонарній фазі, що дає змоги одержати максимальну ферментативну активність протеази[9, 10].

Необхідно забезпечити асептичні умови під час отримання протеази. Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання та компонентів поживних середовищ для культивування.

Отже, культивування продуцента протеази *B. licheniformis* ВКМ В-2184Д здійснюється в аеробних умовах, глибинним способом у безперервному режимі протягом 60-70 годин при дотриманні усіх правил асептики[3].

5.2. Обґрунтування вибору типу ферментера та ферментного обладнання.

Основним апаратним елементом біотехнологічного процесу є біореактор – ферментер. Біореактори призначені для культивування мікроорганізмів, накопичення біомаси, синтезу цільового продукту. Основні вимоги до ферментера – можливість проведення процесу культивування продуцента в стерильних умовах при інтенсивній аерації поживного середовища. У біореакторах повинні бути забезпечені оптимальні гідродинамічні і масообмінні умови[9,10].

Використовуємо механічну мішалку на прикладі пропелерної мішалки, гвинт (пропелер), насадженого на вертикальний вал, при обертанні гвинта зі швидкістю 300 об/хв, що підходить для штаму бацил[12].

Враховуючи фізіолого-біохімічні ознаки продуцента обираємо ферментер і необхідне оснащення для нього.

По відношенню до кисню *B. licheniformis* ВКМ В-2184Д – аероб, тому важливу роль при культивуванні відіграє аерація та режим перемішування. Для культивування штаму-продуцента потрібно обрати ферментер з механічним перемішуванням, який забезпечить найбільш інтенсивний масообмін, і відповідними датчиками контролю[3].

Біореактори з механічним перемішуванням використовують найчастіше, оскільки вони дають змогу легко змінювати технологічні умови й ефективно постачати клітинам повітря, що визначає характер розвитку мікроорганізмів та їх біосинтетичну здатність [12].

Порівняльна характеристика аерліфтної мішалки та турбінної мішалки закритого типу

Аерліфтне перемішування застосовують для рідин з невеликим коефіцієнтом динамічної в'язкості (до 0,2 Па·с). Внаслідок різниці між густинами виникає циркуляційний рух усєї маси[12].

Основний недолік цієї мішалки в тому, що через подачу циркуляційного повітря виникає набагато більше піни ніж з турбінної мішалки закритого типу, що потребуватиме збільшенню кількості піногасника, тому встановлення аерліфтної мішалки буде більш затратнішим в порівнянні з турбіною мішалкою закритого типу.

Отже, обираємо турбінну мішалку закритого типу. Так як об'єм ферментера становить 5 м³, то мішалка повинна бути двохярусною і забезпечить ефективне перемішування поживного середовища під час культивування [9,10].

В процесі біосинтезу виділяється велика кількість тепла за рахунок життєдіяльності мікроорганізмів і в результаті роботи мішалки. Тепло, яке виділяється в період росту мікроорганізмів, регулюється теплообмінними пристроями різної конструкції. Використання зовнішньої рубашки технологічно найбільш вигідно, так як введення в середину ферментера додаткових конструкцій типу змійовика ускладнює мийку і стерилізацію ферментера. Тому для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком для контролю температури [9].

5.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Робочий об'єм ферментера ($V_{\text{роб.}}$) визначають за формулою:

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

де: $V_{\text{г.ф.}}$ – геометричний об'єм ферментера;

$K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення, 0,5.

$$V_{\text{роб.}} = 5 \times 0,5 = 2,5 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 6 м³ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 2,5 \times 0,1 = 0,25 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати під час культивування *B. licheniformis* у посівному апараті об'ємом 0,5 м³ (500 л.).

Для одержання 0,5 м³ культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.2}} = 0,5 \times 0,1 = 0,05 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу (50 л) можна одержати у процесі вирощування штаму *B. licheniformis* ВКМ В-2184Д у інокуляторі об'ємом 0,1 м³ (100 л.).

50 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 50 \times 0,1 = 5 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в ферментері об'ємом 10 л.

5 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.4}} = 5 \times 0,1 = 0,5 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в 4 колбах на качалках по 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,2.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу протеази у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у чотири етапи: 1 – вирощування в лабораторії в колбах на качалці 2 – 0,005 м³; 3 – 0,05 м³. 4 – 5 м³

5.4. Обґрунтування особливостей приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

Для культивування *B. licheniformis* ВКМ В-2184Д і отримання цільового продукту використовують середовище даного складу (г/л):

Кукурудзяне борошно - 100

Соєве борошно – 10

CaCO₃ -2,5

MgSO₄×7H₂O - 2,5

Соєве борошно попередньо суспендують у холодній воді, потім заварюють при температурі 60°C та стерилізують в реакторі змішувачі при $t = 112^\circ\text{C}$ (30 хв), і перемішують, для уникнення утворення великих грудок.

Проаналізувавши склад поживного середовища для *B. licheniformis* ВКМ В-2184Д культивування можна поділити його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

Композиція А: Кукурудзяне борошно, соєве борошно (режим стерилізації: 112 °C, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃, MgSO₄×7H₂O (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв, 0,15 МПа)

5.5 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийючих та дезінфікуючих засобів

Прибирання приміщень проводять вологим способом з подальшою обробкою дезінфекційними розчинами. Для санітарної обробки необхідно застосовувати мийні, дезінфекційні та мийно-дезінфекційні розчини, зареєстровані в Україні та дозволені до застосування. Мийні, дезінфекційні та мийно-дезінфекційні розчини мають забезпечувати знешкодження об'єктів від патогенних мікроорганізмів, що призводять до контамінації і

спричинювати псування сировини, напівпродуктів та готової продукції [11].

Санітарна обробка поверхонь обладнання, комунікацій, внутрішньоцехової тари та інвентаря складається з послідовного проведення таких операцій:

- механічне очищення і миття теплою (30 ± 5 °C) водопровідною водою з мийними засобами. При цьому видаляють з робочих поверхонь залишки сировини, напівпродуктів і готової продукції;

- промивання водопровідною водою з метою видалення з робочих поверхонь залишків мийних засобів;

- дезінфекційну обробку робочим розчином з метою знезараження від патогенних і сапрофітних мікроорганізмів;

- промивання гарячою (60 ± 5 °C) водопровідною водою з метою видалення з робочих поверхонь залишків дезінфекційних засобів. За необхідності проводять наступне промивання водою очищеною. У разі використання для дезінфекційної обробки етанолом 76% промивання водою не проводять;

- при застосуванні мийно-дезінфекційних засобів об'єднують стадії миття і дезінфекції об'єктів водну операцію;

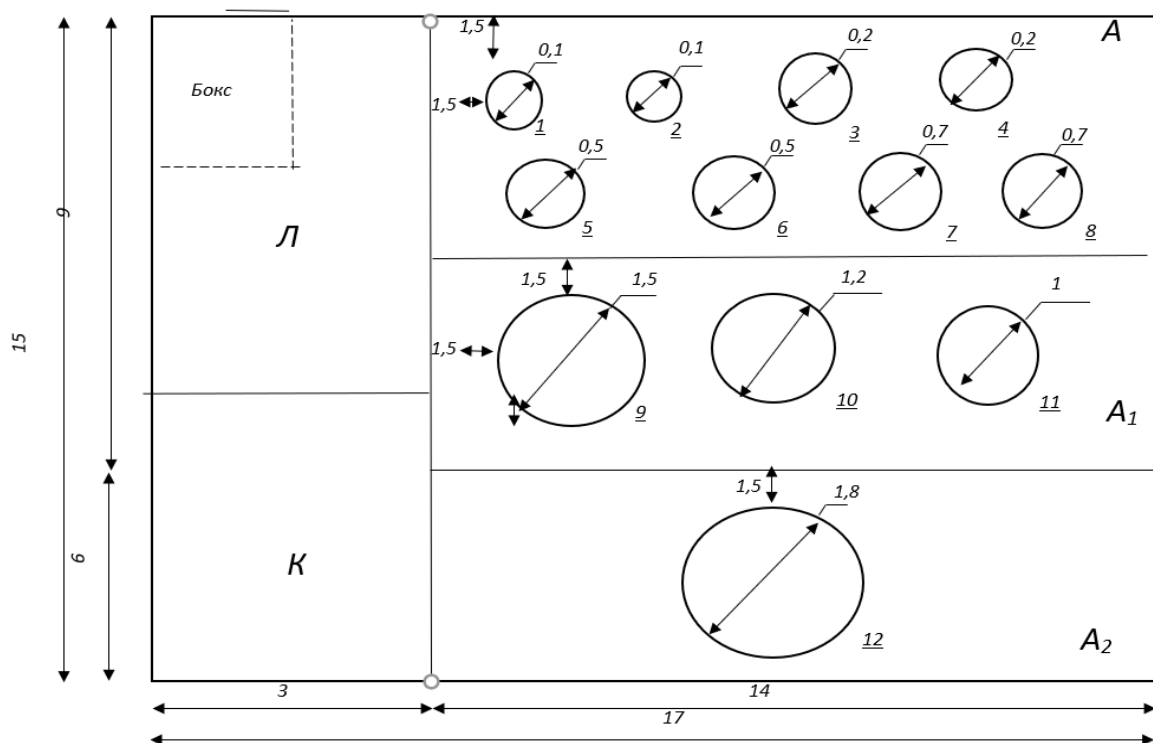
- розчини мийних, дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів для санітарної обробки використовують лише один раз. Дезінфекційний антисептичний засоби необхідно міняти кожні 1-3 міс. з метою недопущення резистентності мікроорганізмів до мийних засобів. Відпрацьовані розчини після санітарної обробки зливають у каналізацію, враховуючи ГДК-компоненти мийних, дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів у воді водних об'єктів господарсько-питного і культурно-побутового водокористування [11].

Виробництво ферментного препарату протосубтіліну здійснюється упродовж 60 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 5 м³, інокулятори об'ємами 500 л, 50 л, 5 л, реактори-змішувачі та збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування.

Виробництво включає наступні цехи: цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту, качалочна кімната та лабораторне приміщення, де знаходяться бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю (ваги, рН-метр тощо). Відстань між стінами та апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр. Габаритні розміри основного обладнання наведено у *риса 5.1*.

Рисунок 5.1

На рисинку наведено приблизний план приміщення для виробництва протосубтіліну.



План виробничого приміщення для виробництва протеази

А – цех приготування поживного середовища (1-8 - реактори-змішувачі для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу об'ємом 5 м³,

500 л, 50 л, 5 л.)

А₁ – цех вирощування інокуляту (9 - інокулятори об'ємом 500 л; 10 - інокулятор об'ємом 50 л, 11 - інокулятор об'ємом 5 л.)

А₂ – цех виробничого біосинтезу (8 - ферментер об'ємом 5 м³);

Л – мікробіологічна лабораторія;

К – приміщення з качалками.

Габаритні розміри основного обладнання наведено у *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2.

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва протосубтіліну

Обладнання	Геометричний розмір, м ³	Діаметр, мм	Висота, мм
Ферментер ¹	5	1800	4400
Реактор-змішувач для приготування композиції А ³	0,1	500	300
Інокулятор ¹	1,5	1200	3000
Реактор змішувач композиції А ³	0,1	500	300
Реактор змішувач композиції Б ³	0,2	700	350
Реактор змішувач композиції Б	0,2	700	350
Інокулятор ²	1,2	1000	2 100
Реактор змішувач композиції А ³	0,5	1000	3000
Реактор змішувач композиції А ³	0,5	800	450

Реактор змішувач композиції Б ³	0,7	1100	3000
Інокулятор ³	1	1200	3000
Реактор змішувач композиції Б ³	0,7	800	2800
Всього	13	-	

Згідно даним наведеним в *рис. 5.1.*, загальний об'єм ферментеру, інокуляторів та реакторів-змішувачів для вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу становить 13 м³. Приймаємо, що оброблення мийними та дезінфікуючими засобами стін буде проводитися на висоту 2,5 м.

Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 84 м², для вирощування інокуляту - 70 м², для приготування компонентів поживного середовища - 56 м², для качалочної кімнати – 18 м² та мікробіологічної лабораторії становить 27 м²; загальна площа стін – $((15 \times 2,5) + (17 \times 2,5)) \times 2 = 160$ м². Загальна площа поверхні обробки мийними засобами наведена у *табл.5.3.*

Таблиця 5.3.

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Довжина стін, м	Висота стін, м	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу	84	14×6	10	100
Цех вирощування інокуляту	70	14×5	10	95
Цех приготування поживного середовища	56	14×4	10	90
Мікробіологічна лабораторія	27	3×9	10	60
Качалочна	18	6×3	10	45
Загальна площа	255	-	-	390

Для проведення розрахунку витрат мийних та/або дезінфікуючих засобів приймаємо, що обладнання та комунікації підлягають очищенню перед кожним виробничим циклом (кількість циклів становить 21), тобто 21 рази (додаткове миття після останнього циклу). Підлога миється кожен робочий день, тобто 60 разів; стіни, вікна та двері – раз на місяць (2 рази). Чистота повітря в приміщеннях повинна відповідати встановленим нормам, отже, обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп – 1 годину після кожного генерального прибирання та 0,5 години кожного робочого дня [10,11, 12].

Таблиця 5.4.

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва протеази *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	54,6	53	3 180
Підлога	255	75	19 125
Стіни, двері, вікна	390	2,5	975

5.6 Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів.

Щоб обрати мийний та дезінфікувальний засіб, необхідно врахувати його вартість та витримати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу [16].

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.

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

Кальцинована сода у водних розчинах частково розкладається з утворенням їдкого луку та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі (55 ± 5) °С розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до (45 ± 5) °С їх мийна здатність різко падає. Розчини кальцинованої соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію [16]

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 [16].

“Дезактін” – дезінфекційний засіб з мийним ефектом виробництва ТОВ “ДЕЛАНА”. Не кородують об'єкти, котрі виготовлені із металу, скла, гуми, матеріалів полімерних, 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 [16].

Рекомендується використовувати: 0,2 % розчини дезактіну для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю, технологічного та санітарно-технічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари [5].

“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 [16].

Рекомендується використовувати 5,0 % розчини гембару для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю та санітарно-технічного обладнання [16].

Розчин етанолу 76% Розчин етанолу 76% використовують для дезінфекції устаткування та антисептичної обробки рук персоналу. Для виготовлення 1 кг етанолу 76% змішують 0,735 кг етанолу 96% і 0,264 мл води очищеної. Густина отриманого розчину має становити 870,2 кг/м³. На ємкість з дезінфекційним розчином наклеюють етикетку з зазначенням найменування розчину, дати виготовлення, попередження про небезпеку застосування, прізвища відповідальної особи [16].

Розчин «Сокрена», виробник — «Бодє», Німеччина Реєстраційний номер 6623 від 35.09.95 р. Склад: додецилдиметиламонію хлорид, ПАР, інгібітор корозії, комплексоутворювачі, піногасники, вода. Використовують для поточної та остаточної дезінфекції приміщень, устаткування, посуду. Виявляє бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Робочий розчин готують у промаркованій тарі шляхом розчинення у воді до концентрації 2.0% при періодичному перемішуванні протягом 1-2 хв. Розчин виготовляють у захисному одязі (халат, гумові рукавички, окуляри, респіратор). Розчин використовують для дезінфекції однократно [16].

Термін придатності робочого розчину — 30 днів, концентрату — 3 роки.

Таблиця 5.5.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва препарату протосубтіліну

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Кальценована сода	Обладнання	2,0	12 000	636 000	30	0,6*	381 600
Каустична сода	Обладнання	2,0	12 000	636 000	312	0,63	400 680
Дезактін	Обладнання	0,2	11 000	636 000	30	0,3	190 800
Гембар ⁴	Стіни, підлога, вікна, двері	0,5	20 100	2 000	150	0,75	15 075
Розчин «Сокрена»	Стіни, підлога, вікна, двері	2,0	20 100	2 000	60	0,18	3 618

Вартість концентратів мийних та дезинфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведено в табл. 2.4.

Засоби, що мають різну діючу речовину, варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів [16].

Проаналізувавши дані, наведені у табл. 2.4, можна зробити висновок, щодля миття та дезінфекції стн, пілоги, вікон та дверей доцільно використовувати чотири мийних засоби – Дезактін, Гембар, розчин «Сокрена» та хлорне вапно, а для миття та дезінфекції обладнання, інвентарю, комунікацій, тари, доцільно використовувати кальциновану або каустичну соду, оскільки вони є мийно-дезінфікувальними засобами, мають порівняно невисоку вартість, що дає змогу заощадити кошти.

Миття ферментера (5 м^3), посівного інокулятора (500 л) та інокуляторів (50 та 5л), збірників для приготування композицій для двох стадій культивування відбудуватиметься циркуляційним способом. Об'єм мийного засобу складатиме приблизно половину кожного з відповідних об'ємів обладнання.

Підлогу необхідно мити та дезинфікувати кожного дня (60 разів), стіни, двері та вікна не рідше одного разу на місяць, тобто 2 разів. Для знезараження повітря виробничих приміщень від мікроорганізмів використовують різні бактерицидні лампи — джерела ультрафіолетового випромінювання. Кількість і потужність бактерицидних ламп необхідно підбирати з таким розрахунком, щоб при прямому опромінюванні на 1 м^3 об'єму приміщення припадало не менше $2 \pm 0,5$ Вт потужності випромінювача, а для екранованих бактерицидних ламп — 1 Вт. Неекрановані бактерицидні випромінювачі вмикають на 1-2 год до початка роботи, коли у приміщенні немає людей [16].

Вхід до приміщення дозволяється лише через 15 хв після вимкнення бактерицидної лампи. Оскільки ультрафіолетові випромінювачі утворюють у

повітрі токсичні продукти (озон, окиси азоту), під час їх роботи необхідно вмикати вентиляцію. Отже, обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп – 1 год після кожного генерального прибирання та 0,5 год кожного робочого дня (під час обідньої перерви) [13].

5.7 Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій, повітря

Підготовка обладнання, як основна складова санітарної підготовки виробництва направлена на досягнення необхідного рівня чистоти та асептичності. Наприклад, підготовка інокуляторів, ферментерів включає такі операції [12, 15, 16].

Миття обладнання. Миття обладнання проводять наступним чином. Спочатку миють водою протягом двох хвилин з передачею води у збірник нейтралізації перед скидом рідини у систему каналізування рідких викидів. Миття продовжують розчином лугу 1%, протягом 10 хвилин при 40°C, з поверненням розчину в нейтралізаційний збірник. Проводиться ополіскування очищеною або пом'якшеною водою, з передачею води в збірник нейтралізації [12].

Якщо в обладнанні (на поверхні) присутні стійкі до видалення забруднення речовини, то миття проводять розчином кислоти 1% при 20°C, з повертанням розчину у збірник нейтралізації. Також проводять ополіскування очищеною або пом'якшеною водою з передачею води в збірник нейтралізації. Процес завершується ополіскуванням очищеною водою, протягом 5 хвилин з повертанням води в збірник рециркуляційної води [14].

Механізовані миючі установки фірми «Керхер» (Германія). Більш довершеною конструкцією є миючі пересувні установки «Керхер». Миючий пристрій представляє собою розбризкуючу голівка, укріплену за допомогою опорного пристосування опускається всередину апарату і під натиском гарячого струменя води в 3—5 МПа швидко та ефективно очищає його внутрішню поверхню. Залежно від конструкції апарату, предмета миття,

застосовуються різні опорні пристосування для миючого пристрою. Для миття апаратів малої місткості миючий пристрій кріпиться на короткій вертикальній трубі і занурюється через люк апарату, що знаходиться на кришці. Опора лягає на фланець кришки апарату, закріплюється, а глибина занурення регулюється [13,14].

Крім обертання навколо власної осі розбризкуючі сопла обертаються одночасно навколо поровжньої осі миючої головки апарату, завдяки чому струменя миючого розчину досягають всі точки внутрішньої поверхні апарату.

На всмоктуючій стороні насоса температура миючої рідини складає 50–60 °С, на нагнітальній стороні після нагріву в теплообміннику 90–95 °С.

Бак з миючим розчином і регулюючим вентилям для подачі розчину, насос, що створює тиск струменя, необхідний для миття і очищення бака з фільтром, куди стікає миюча рідина із зливного отвору апарату, змонтовані напересувному візку. Рідина для миття може бути використана багато разів завдяки циркуляційному контуру і фільтрації через вбудований фільтр [15].

Внутрішня миюча головка може працювати з двома або чотирма соплами. При двох соплах струмінь довший і сильніший, що необхідне при митті великих або сильно забруднених апаратів.

Установка фірми «Керхер» дозволяє отримати всі види струменя (парового, гарячого, теплого і холодного) з автоматичним дозуванням хімічних речовин. Частота обертання миючого пристрою вибирається залежно від ступеня забруднення апарату і його радіусу. Чим більше радіус і ступінь забруднення, тим менше швидкість обертання [12,14,16].

Головним елементом підготовки є обов'язкова перевірка якості проведених робіт, для цього проводять профілактичний огляд та перевірку на герметичність. Як правило, така перевірка проводиться після стерилізації, коли проявляються можливі нещільності у місцях з'єднання елементів обладнання та апаратури.

Перевірка на герметичність ємкісного обладнання, з'єднань, та комунікацій проводиться за допомогою найбільш простого і доступного метода – омилування розчином господарського мила. Саме по виділенню бульбашок виявляють нещільності. Сучасні технології використовують галоїдні течешукачі, що дозволяють фіксувати галогенопохідні алканів. Тетрахлорметан закачують в герметично закриті обладнання та комунікації до тиску 0,5 МПа та за допомогою датчика-течешукача галогенопохідних проводять огляд всіх з'єднань обладнання та комунікацій. Особливу увагу приділяють фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок мічткісного обладнання. У випадку виявлення нещільних з'єднань проводять розбору та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації. Для з'єднань проводять їх підтягування та перепаккування, а для обладнання підтягування кришок, або з'єднань і в випадку необхідності заміну ущільнюючих прокладок люків та кришок. В якості ущільнюючого матеріалу використовують термостійку гуму, пароніт, фторопласт [18].

Одним з факторів, що найістотніше впливає на біосинтез біологічно активних речовин, є забезпечення стерильності виробництва, зокрема стерильності комунікацій та обладнання, що безпосередньо контактує з культуральною рідиною. У біотехнології застосовують різні способи стерилізації, але при цьому контамінуюча мікрофлора повинна бути повністю зруйнована або видалена. Процес дії на контамінанти при якому вони руйнуються або повністю видалюються називають стерилізацією.

Основним визнаним стерилізаційним прийомом у біотехнології є обробка обладнання та комунікацій насиченою водяною парою при $t = 125-145^{\circ}\text{C}$, при цьому існує висока гарантія досягнення необхідного рівня асептики [18].

Після закінчення кожного циклу біосинтезу в посівному і основному ферментерах і видаленню з них культуральної рідини ферментери відкривають і миють гарячою водою з брандспойта, миючого пристрою (гідромонітору) очищаючи від залишків біомаси [18].

Послідовність носить стандартний характер і, як правило, включає такі роботи. Барботер продувають повітрям. Після огляду, а при необхідності і ремонту, ферментер знову миють водою, закривають люк і разом з іншою апаратурою стерилізують гострою та глухою насиченою парою.

Перед стерилізацією апаратуру і комунікації промивають водою температурою 100 °С з магістрального трубопроводу [18].

Стерилізація ферментера продовжується 2 – 3 год під надлишковим тиском 0,12 – 0,15 Мпа.

Одночасно стерилізують фільтри тонкого очищення повітря (стерилізуючи індивідуальні фільтри) і повітряні комунікації. Стерилізують фільтри 1 годину під надлишковим тиском 0,12–0,15 МПа. На кінець стерилізації пропарюють пробовідбірники, продуктивний штцер для засіву, зливну лінію від ферментера до трапа протягом 30 хвилин. Пара для стерилізації повинна бути насиченою тасухою. Вологість пари знижує приховану теплоту паротворення, а отже, ієфективність дії на мікроорганізми. Недоцільно застосовувати і перегріту пару, оскільки при температурі, однаковій з насиченою парою, при її охолодженні без конденсації виділяється набагато менше тепла. У присутності повітря температура пари нижча за загальний тиск, тому повітря потрібно повністю заздалегідь видаляти. Зазвичай це досягається гравітаційним способом – витісненням парою, що має вищу щільність, ніж повітря. Видалення повітряних пробок дозволяє прогріти всі деталі устаткування і усунути разом з ними можливе джерело інфекції [15, 17, 18].

Завдяки хорошій теплопровідності металу і обмиванню внутрішньої поверхні ферментера конденсатом пари цим способом досягається надійна стерилізація. Проте перед стерилізацією з ферментера необхідно видалити осаді вимити його, інакше в осаді може зберегтися стороння мікрофлора і надалі бути джерелом інфекції.

Тривалість стерилізації, як правило, дається без урахування часу, щовитрачається на видалення повітря і прогрів ферментера.

Потрібно приділяти більшу увагу частинам ферментеру та комунікацій, як важкодоступні: штуцерам, пробовідбірникам, датчикам, втрубопроводах – запорній арматурі, фланцям, фасонним деталям, тупиковиммісцям і відкритим закінченням труб.

Для забезпечення і підтримки асептичності після закінчення стерилізації ферментер через барботер подають стерильне повітря, підтримуючи надмірний тиск 0,02 – 0,03 МПа (щоб уникнути попадання сторонньої мікрофлори) [17, 18].

5.8 Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря

Вимогою, що пред'являється до аеруючого повітря при культивуванні, є стерильність, під якою розуміється повна відсутність мікрофлори [19].

При вирощуванні мікроорганізмів в глибинних умовах потрібна безперервна подача стерильного повітря в ферментери, на аерацію культуральної рідини. Повітря, що подається в ферментер, не тільки постачає зростаючу культуру киснем, а й відводить газоподібні продукти обміну і фізіологічне тепло, що виділяється мікроорганізмом в процесі розвитку [3, 10].

Використовуються методи газової очистки або застосування антисептиків, підвищені або знижені температури, ультрафіолетові випромінювання, іонізуюче випромінювання тощо. Використання цих методів свідчить про їх ненадійність, так як спори та конідії мають високу стійкість до високих температур та іонізуючого випромінювання [18].

У процесі мікробного синтезу повітря, що подається на аерацію, повинно бути очищений на 99,9999 % від домішок і мікробіоти розміром до 1 мкм [18].

Стадію підготовки аераційного повітря у разі великих його витрат здійснюють в окремих будівлях, у разі невеликих – в окремих приміщеннях. Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

Забір атмосферного повітря. Забір повітря потрібно здійснювати зовні приміщення, із затінених і найменш забруднених місць, на висоті не менше 4 м від поверхні землі. Повітряна частина складається з корпусу з шиббером, завихрювача, заслінки і корпусу примусової подачі повітря.

Важливе значення має вибір місця для забору атмосферного повітря. Слід враховувати, що чим нижча температура всмоктуваного повітря, тим менше міститься в ньому вологи і тим вища його щільність [16].

Всмоктуване повітря обов'язково має проходити через пристрої, які очищають його від механічних домішок і вологи. Відносна вологість повітря, що надходить у компресор, не повинна перевищувати 65 %. При більшому вологовмісті всмоктуваного повітря необхідно передбачати його осушення [16].

Очищення повітря від пилу на плоских тканинних фільтрах грубого очищення. Фільтри грубого очищення призначені для уловлювання основної маси забруднення, що потрапили в систему після проходження фільтрів попереднього очищення і компресора, а також для подовження терміну служби фільтрів тонкого очищення, що виконують основний процес стерилізації на стадії фільтрації.

Обираємо фільтр касетного типу продуктивність його становить 550 м³/хв. [18]. В якості фільтруючого матеріалу можна використовувати такі матеріали: скловату, скловолокно, бавовна, нетканий волокнистий шар із поліпропіленових або поліетиленових волокон тощо. Як фільтруючий матеріал обираємо скловату, а в верхніх шарах укладаємо ще чесану бавовну. Скловата служить попереднім фільтром і перешкоджає карамелізації бавовни при стерилізації. Такі фільтрувальні матеріали мають високу продуктивність і таким чином здійснюється двоступеневе очищення повітря в одному апараті. Фільтр грубої очистки стерилізуємо гострою парою протягом 2 годин при тиску 0,4 мПа. Після стерилізації проводиться просушування фільтра стерильним нагрітим повітрям [16,18].

Після проходження повітря через фільтри грубої очистки відбувається його стиснення. Стиснення повітря проходить в компресорі (при цьому повітря нагрівається до температури 120-200 °С) [17].

Після стиснення повітря відбувається його охолодження до температури 25-30 °С, за якої волога повітря конденсується. Для цього використовується водяний теплообмінник типу «труба в трубі» [17].

Далі відбувається видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора в ресивер. Ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Цей процес відбувається в ємності великого об'єму [17].

Після видалення вологи відбувається нагрівання повітря

Очищення повітря на фільтрах тонкого очищення. На підприємствах ферментної промисловості використовується фільтр типу ФТО, всередині якого викладається елемент із гофрованої тканини Петрянова. Така тканина характеризується термостійкістю та механічною міцністю. Ступінь очищення з використанням фільтрів ФТО становить 95 %. Обираємо фільтр ФТО-50, його продуктивність становить 500 м³/год, площа поверхні фільтрації 10 м² та витримує температуру 140 °С [19].

Очищення повітря на фільтрах індивідуального очищення. Для очищення повітря використовується мембранний фільтр (індивідуальний) Microfluor II. Фільтр виготовляються в вигляді фільтропатронів і капсул.

Фільтр встановлюють перед кожним інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером і забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99%.

Стерилізація фільтра проводиться гострою парою в технологічній обов'язці з ферментатором без вилучення фільтруючих елементів з корпусу фільтра [19].

5.9 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез протеази (320 од/мл за 60 год) досягається за умови росту штаму *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ - 2366Д на середовищі такого складу (г/л): Кукурудзяне борошно – 100, соєве борошно – 00, CaCO₃ -2,5, MgSO₄×7H₂O - 2,5[2].

Середовище для вирощування посівного матеріалу у колб.

При аналізі склад поживного середовища для *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ -2366Д для культивування можна поділити його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів):

Композиція А: Кукурудзяне борошно, соєве борошно (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція Б: CaCO₃, MgSO₄×7H₂O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Піногасник. У складі поживного середовища є соєве борошно, яке при перемішуванні у ферментері і інокуляторах буде пінитись. Для зменшення рівня піни використовуємо піногасник XIAMETER AFE - 1510. Піногасник буде вноситися автоматично (доза одного внесення – 0,04% від робочого об'єму ферментера або інокулятора) при спрацьовуванні датчика рівня піни. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

5.10 Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту

Одним з ферментів, що знаходить все більше застосування в сільському господарстві, є протосубтілін – фермент, застосовується в якості кормової добавки в раціонах моногастричних тварин з метою поліпшення доступності білкових компонентів, в першу чергу, рослинного походження. Протосубтілін може мати різні ступені очистки, це залежить від того в якій галузі промисловості буде використовуватись фермент [1].

В даний час ефективно застосування протеази знаходиться в сільському господарстві, а саме в годівлі свиней, кур та риби, щоб мінімізувати використання агресивних хімікатів на наступних етапах її обробки. Для такої галузі використовується низько очищений протосубтілін ГЗх [2, 3].

Протосубтілін дозволяє підвищити обмінну енергію корму на 5-7 %; підвищує засвоюваність амінокислот на 2-5 %; підвищує збереженість молодняку за рахунок зниження негативного впливу шкідливих речовин в кормах. Використовують протеазу зі ступенем очищення ГЗх [2, 3].

Відомо, що з підвищенням ступеня очищення ферменту чи іншого білка його стійкість зазвичай падає. Зайвий ступінь очищення майже завжди небажаний. У кожному окремому випадку необхідно чітко знати, якою мірою фермент повинен бути звільнений від домішок, чи не знизить це різко його стійкості як при виділенні, так і при зберіганні і використанні ферменту у виробництві. До речі, висока очистка зазвичай сильно підвищує собівартість препарату [1, 3].

Для виділення та очистки протеази з культуральної рідини застосовують декілька етапів очистки:

- 1) Відділення клітинної біомаси від культуральної рідини (фільтрування);
- 2) Очищення і концентрування розчинів, які містять вихідний фермент;
- 3) Висушування [15].

5.10.1 Обґрунтування способу збереження культуральної рідини.

Після біосинтезу цільового продукту культуральна рідина відправляється на стадію зберігання. Фермент може втрачати свою активність при дії високої температури внаслідок інактивації білкової частини ферменту або розщеплення ферменту власними протеолітичними ферментами продуцента. Для запобігання термічній інактивації та автогідролізу протеази необхідно підтримувати температуру зберігання культуральної рідини на рівні 15-18 °С, тому для зберігання обираємо збірник з сорочкою в яку буде подаватися охолоджуючий агент[19].

5.10.2 Обґрунтування розділення культуральної рідини.

Далі культуральна рідина подається на стадію відокремлення біомаси.

На початкових етапах необхідно відділити клітини продуцента від культуральної рідини та отримати супернатант, що містить протеазу. При отриманні ферментних препаратів нерозчинну частину середовища разом з біомасою продуцента відокремлюють на фільтрах, центрифугах або сепараторах [19].

Одним із найефективніших способів відокремлення біомаси є сепарація. Продуктивність сепаратора типу ВСМ може сягати 2000-5000 л/год. При виробництві ферментних препаратів використовуються різні типи і конструкції саморозвантажувальних сепараторів з відцентровим пульсуючим вивантаженням осаду, які мають продуктивність 500, 1500 і 2000 л/год, при діаметрі барабана 600 мм і між тарілочному зазорі 0,5 мм, суттєвим недоліком є те, що при дії відцентрових сил руйнуються клітини біологічного агента, тому є ризик забруднення цільового продукту фрагментами клітин та клітинами продуцента [19].

Також при виробництві ферментних препаратів використовуються соплові високошвидкісні сепаратори або так звані бактофуги продуктивністю 200 м³/год. Бактофуга дозволяє отримати фугат, майже повністю очищений від мікроорганізмів і найдрібніших домішок, що є дуже важливим. Цей вид сепаратора володіє рядом переваг: герметичність апарату, безперервність загрузки суспензії, проведення процесу при низьких температурах[5].

Найбільш широко в мікробіологічній промисловості використовують барабанний вакуум-фільтр безперервної дії з поверхневою зовнішньою поверхнею фільтрування. Барабанні вакуум-фільтри мають високу ступінь механізації і дозволяють здійснювати фільтрування різних суспензій з постійною швидкістю.

Барабанний вакуум-фільтр являє собою барабан, занурений в ємність, в яку безперервно подається культуральна рідина. Поверхність барабана перфорована та обтягнута фільтруючою тканиною. При кожному повороті

барабана разом з осадом видаляється частина намивного шару. Для ферментної промисловості бажано мати вакуум-фільтр, виготовлений із кислотостійкої сталі, щоб запобігти можливість інактивації ферменту в процесі фільтрації [18].

Барабанні фільтри зручні для відділення не лише біомаси продуцента, але і нерозчинних домішок, яких порівняно багато в середовищі (висівки, паростки, макуха і т.д.). Недоліком барабанного вакуум-фільтра є тривалість технологічного процесу, низька продуктивність та громіздкість (відношення питомої поверхні фільтрування до обсягу фільтрату невелика) і неможливість забезпечення асептичних умов, але не використовуються для бактерій.

В ферментній промисловості рідше використовують рамні фільтр-преси періодчної дії з ручним вивантаженням осаду. З їх допомогою можна отримати прозорі фільтрати, але ці фільтри працюють періодично без регенерації фільтруючої поверхні. Це пов'язано з тим, що шламовий простір обмежений, а шар осаду до кінця фільтрування досягає значної товщини, тому швидкість фільтрування падає, незважаючи на підвищення робочого тиску [19,20].

Продуктивність фільтр-преса на багато менше ніж барабанного вакуум-фільтра і це пов'язано з тим, що при заповненні шламового простору осадом фільтр-прес вимикають, розбирають і промивають або змінюють фільтруюче полотно зупиняючи при цьому технологічний процес.

Фільтр-преси з ручним вивантаженням осаду вимагають великих затрат ручної праці на розсування рам і плит, вивантаження осаду або фільтрату та інших робіт. Тому вони використовуються тільки у випадках, коли їх не можна замінити механізованими або автоматичними фільтрами. Тому враховуючи недоліки не обираємо даний спосіб фільтрування [19,20].

Відомий також стрічковий вакуум-фільтр. Фільтр являє собою працюючий під вакуумом апарат безперервної дії, в якому напрямом сили тяжіння і рух фільтрату збігаються.

Стрічковий фільтр складається з ряду нерухомо розташованих вакуумних камер, уздовж яких пересувається конвеєрна гумова стрічка з вирізами. На стрічку натягнута фільтрувальна тканина. По центру стрічки передбачені дренажні отвори. Пройшовши послідовно всі операції фільтрування, осад знімається з тканини у кінцевого ролика. Холостий пробіг тут становить понад 50 %, щоє економічно не вигідно, енергозатратно та досить довго. Також одним із недоліків даного апарату є те, що цей фільтр дорожчий інших горизонтальних фільтрів.

Недоліком відомого технічного рішення є низька ефективність процесу, яка обумовлена невеликою поверхнею фільтрування, наявністю невикористаних зон на фільтрувальній стрічці, досить швидкий знос фільтруючої стрічки, громіздкість апарату, складність герметизації та дороговартість, тому виключаємо використання даного апарату [8].

Найбільш доцільним у технології виробництва протеази є застосування фільтр-пресу ФПАКМ. Цикл роботи фільтр-преса складається з стиснення плит, фільтрування, промивання і зневоднення осаду, розсовування плит і розвантаження осаду одночасно з переміщенням тканини і її промиванням [8].

Фільтр-прес працює наступним чином. Культуральна рідина піддається по бічним цівкам колектора одночасно до всіх плит. Де відбувається фільтрування. Фільтрат поступає в збірник, а осад залишається на поверхні фільтрувальної тканини типу бельтинг Ф, кінці якої з'єднані між собою, так, що утворюється нескінченна стрічка.

Відділення культуральної рідини від біомаси відбувається достатньо добре, і фільтрат виходить прозорим при фільтрації і відтисненні осаду при тиску 0,4 МПа. При подальшому підвищенні тиску до 0,8 МПа і витримуванні протягом 5-6 хв залишкова вологість осаду досягає 65-70 %. За необхідності осад перед відтисненням можна промити чи обробити стисненим повітрям. Рідину для промивання осаду подають на фільтр-прес

спеціальним насосом, яка потім самоплином спускається в резервуар промивного фільтра [20].

Стрічка, на якій в робочих камерах утворюється осад, починає працювати після припинення подачі суспензії та розкриття фільтра, коли між плитами утворюється щілина до 45 мм для виходу стрічки з осадом. При русі стрічки осад виноситься з міжплиточного простору і вивантажується з двох сторін. Фільтрувальна тканина промивається холодною водою за допомогою форсунок під тиском 0,3 МПа і очищується скребками чи щітками. При русі стрічки між плитами чергується положення її сторін, що забезпечує її повне очищення. Після очищення стрічки фільтрувальні плити затискаються і цикл повторюється.

Фільтр-преси бувають:

За типом фільтрувальних плит: рамний фільтр-прес, камерний фільтр-прес, мембранний фільтр прес. Обираємо камерний фільтр прес. (ФПАКМ – фільтр-прес автоматичний камерний модернізований)

За типом приводу: з ручним, з електромеханічним, з гідравлічним приводом. Обираємо електромеханічний тип приводу.

За типом відведення фільтрату: з відкритим відведенням фільтрату, з закритим відведенням фільтрату. Обираємо з закритим відведенням фільтрату, щоб унеможливити потрапляння спор продуцента в повітря.

За розташуванням плит: горизонтальний фільтр-прес, вертикальний фільтр-прес. Обираємо вертикальний фільтр-прес так як він займає невелику площу на підприємстві [19, 20].

Робота ФПАКМ повністю автоматизована. Ці фільтри мають розвинену фільтруючу поверхню (на 8 м² площі, яку займає установка, приходится до 25 м² фільтруючої поверхні), осад віджимається під тиском 0,8-1,5 МПа і має вологість не більше 60-70 %, порівняно невеликі енергозатрати (0,8-1 кВт·год на 1 м² фільтруючої поверхні), питома виробництво установки в 6-8 разів вища порівняно з іншими фільтр-пресами. Установки ФПАКМ випускаються з площею фільтруючої поверхні від 2,5 до

50 м². Осад з фільтруючої поверхні може видалятися автоматично різними способами: стиснутим повітрям, парою, вібрацією, під дією відцентрових сил. Продуктивність, порівняно з іншими фільтр-пресами, досить висока. Забезпечується безперервність заправки суспензії та запобігання потрапляння у повітря спор продуцента[23].

Отже їх використання для очищення ферментних препаратів дуже перспективне і доказом цього є вище зазначені переваги [23]. Втрати ферменту на цьому етапі становлять 4%.

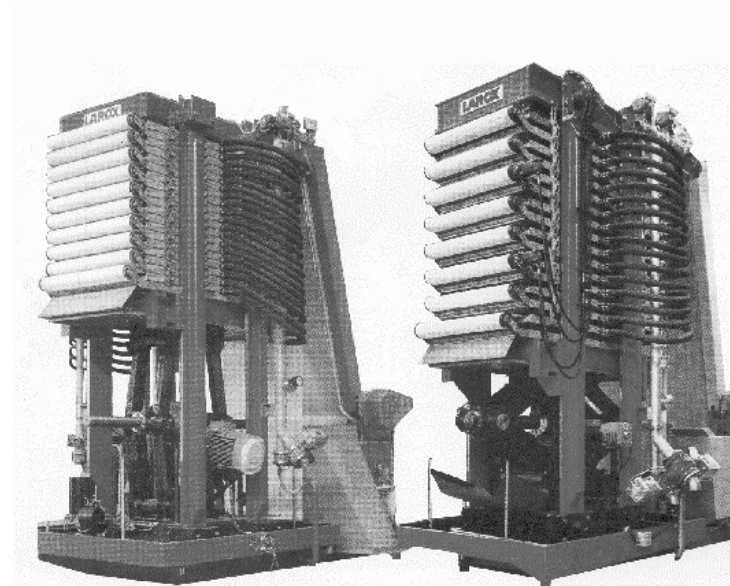


Рис 5.1 .Вертикальний фільтр-прес в зімкнутому (зліва) і розімкненому (справа) стані

Фільтрування – відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження через фільтр-матеріал або через полімерну сітку з певним діаметром отворів [24].

Недоліки фільтрування заключаються в великих витратах біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, що забиваються і потребують заміни чи регенерації.

Сепарація – процес відділення твердої фази від рідкої, оснований на віділенні частинок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила [27].

Ефективність сепарації дорівнює частоті обертів барабану, діаметру барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз. Недоліками є підвищена енергоємність процесу.

Флотація – виділення з рідких твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флотація заснована на прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу. Недоліком флотації являються великі втрати біомаси [19].

Центрифугування – процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Машина для здійснення таких операцій називається центрифугою, які підрозділяються на фільтруючі, осаджувальні і комбіновані (осаджувально-фільтруючі) [29].

В промислових установках розділення під дією відцентрових сил застосовують для розділення часточок розміром від 0,5 мкм до 25 мм. При розділенні суспензії у фільтруючих центрифугах в роторі під дією відцентрових сил відбувається фільтрація рідини через фільтрувальну тканину або через металеву сітку з одночасним затриманням твердої фази; рідка фаза проходить через сито і потім через отвори в роторі викидається в кожух центрифуги, а осад відвантажується або під час обертання ротору, або після його зупинки [29].

Переваги:

менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;

можливість автоматизувати процес;

високий фактор розділення;

розвинена поверхню осадження;

високий ступінь розділення високодисперсних систем.

При обґрунтуванні відділення культуральної рідини від біомаси, було обрано достатньо багато обладнання, але доцільним для відділення бактеріальної біомаси від культуральної рідини є центрифугування.

5.10.3 Обґрунтування способу концентрування.

При виборі технології концентрування й очищення позаклітинного ферменту протеази ГЗх обираємо необхідну апаратуру, що дозволить здійснювати ці процеси в безперервному режимі, з високою швидкістю, які забезпечують максимальне зневоднення утворюваного осаду, з мінімальними втратами активності та щоб обраний метод був економічно вигідний.

При отриманні препаратів із глибинних культур, концентрування вихідного фільтрату культуральної рідини в 5-6 разів являється невід'ємною операцією в будь-якій технологічній схемі, та дозволяє отримати продукт, стабільний при зберіганні [10].

Для концентрування ферментних розчинів найчастіше використовують, ультрафільтрацію, діаліз та вакуум-випарювання.

Метод **ультрафільтрації** заключається в продавлюванні під високим надлишковим тиском через напівпроникні мембрани низькомолекулярних сполук і води. В результаті такої обробки концентрат містить високомолекулярні зв'язки, в тому числі і ферменти. Цей метод не завдає ніякої шкоди ферменту. Фермент не піддається денатурації і термічному впливу.

Основною технічною складністю методу ультрафільтрації слід вважати забивання пор мембрани білковими молекулами або супутніми баластними речовинами, що призводить до зниження продуктивності апарату. Останнє вимагає періодичного проведення промивки матеріалу мембрани. Також процес є дуже затратний та економічно не вигідний [29]. Отже не дивлячись на всі переваги ультрафільтрації не обираємо її так як вище зазначені недоліки унеможливають використання цього методу у ферментній промисловості.

Діаліз – це перший вивчений і промислово розвинений мембранний процес, оскільки для його здійснення не потрібна складна апаратура і спеціальні мембрани. Сутність діалізу в тому, що якщо два розчини з різною концентрацією будь-якого компонента розділити мембраною, то почнеться природний процес дифузії, який досягає рівноваги при вирівнюванні

концентрації цього компонента з обох боків мембрани. Відповідно, чим більше розходження у величинах коефіцієнтів дифузії двох компонентів, що знаходяться в розчині, тим краще вони поділяються мембраною. Зрозуміло, що білкові молекули (високомолекулярні речовини) і низькомолекулярні органічні і неорганічні молекули і іони супутніх компонентів в силу величезних відмінностей у коефіцієнтах дифузії практично повністю розділяються мембраною [29].

В якості діалізних мембран використовують зазвичай плівки з целюлози – целофан, купрофан, а також з інших синтетичних полімерів. Процес проводять або за проточною схемою, коли вихідний розчин ферментів постійно прокачують з одного боку мембрани, а діалізуючу рідину (звичайну воду) – з іншого її боку, або за напів проточною схемою, коли розчин ферментів поміщають на певний час у мішечки з діалізної мембрани, які постійно омиваються водою. Таким чином можна видалити основну масу супутніх низькомолекулярних домішок і підвищити активність ферментних розчинів у перерахунку на суху речовину в кілька разів [29].

Процес діалізу має ряд істотних недоліків. По-перше, при діалізі можлива «втрата» ферменту в результаті вимивання іонів металів, що входять до складу молекули ферменту, або стабілізуючих фермент з'єднань, або фрагментів самого ферменту, наприклад, його простетичною групи. По-друге при діалізі проти звичайної водопровідної води може відбуватися втрата активності ферменту в результаті попадання іонів металу в розчин ферменту – інгібіторів ферменту. Слід також зазначити, що в процесі діалізу одночасно з очищенням відбувається сильне розведення ферментного розчину через проникнення води під дією сил прямого осмосу в діалізуючий розчин. Обсяг продіалізованого розчину збільшується приблизно на 20-25 %, а якщо врахувати, що відбувається активне видалення баластних речовин, то в результаті діалізу отримують дуже розбавлені ферментні розчини. Тому цей метод в ферментній промисловості не використовується взагалі, а лише іноді в лабораторних дослідженнях [29].

Випарювання – це процес концентрування розчинів твердих не летких речовин шляхом часткового випаровування розчинника при кипінні рідини.

Випарювання застосовують для концентрування розчинів не летких речовин, виділення з розчинів чистого розчинника (дистиляція) і кристалізації розчинених речовин, тобто не летких речовин в твердому вигляді. При випаровуванні зазвичай здійснюється часткове видалення розчинника з усього обсягу розчину при його температурі кипіння [19, 26].

Тому випарювання принципово відрізняється від випаровування, яке, як відомо, відбувається з поверхні розчину при будь-яких температурах нижче температури кипіння.

У ряді випадків випарений розчин піддають подальшій кристалізації в випарних апаратах, спеціально пристосованих для цих цілей.

В основному застосовують безперервно діючі випарні установки з високою продуктивністю за рахунок великої поверхні нагрівання (до 2500 м² в одиничному апараті).

Конструкція випарного апарату: з примусовою циркуляцією і внутрішньої гріє камерою. Вибір конструкції обумовлений малою в'язкістю випарює розчину, підвищеною інтенсивністю випаровування не тільки за рахунок збільшення різниці щільності рідини і парожидкісні суміші в циркуляційному контурі, а й за рахунок збільшення довжини кип'ятильних труб.

Процес випарювання широко застосовується для підвищення концентрації розбавлених розчинів, виділення з них розчинених речовин шляхом кристалізації, а іноді - для виділення розчинника (наприклад, при отриманні питної або технічної води в випарних опріснювальних установках).

Випарювання - один з най важливіших процесів в хімічній промисловості, оскільки багато реакції проходять в розчинах, і продукти реакцій також можуть перебувати в розчинах [26].

Це най більш вигідний і простий спосіб поділу компонентів розчину. Для здійснення процесу випарювання необхідно теплоту від теплоносія передати киплячого розчину, що можливо лише при наявності різниці температур між ними. При аналізі та розрахунку цю різницю температур між теплоносієм і киплячим розчином називають корисною різницею температур. В якості теплоносія в випарних апаратах най частіше використовують насичену водяну пару, який називають гріючою або первинним. Що утворюється при випаровуванні пар називається вторинним, або соковим[19, 26].

Випарювання під вакуумом має ряд переваг в порівнянні з атмосферним випаровуванням: знижується температура кипіння розчину, що дає можливість використовувати цей спосіб для випарювання розчинів термічно нестійких речовин; підвищується корисна різниця температур, що веде до зниження необхідної поверхні тепло передачі випарного апарату; знижуються втрати теплоти в навколишнє середовище (за рахунок зниження температури стінки); з'являється можливість використання теплоносія низького потенціалу. До недоліків відносяться подорожчання установки за рахунок додаткового обладнання, а також більша витрата пари, що гріє на кілограм випарованої рідини.

При більшій продуктивності (від декількох кубічних метрів на годину і вище), що характерно для промисловості, випарювання проводять по безперервному принципі. В апаратах безперервної дії зазвичай створюють умови для інтенсивної циркуляції розчину, інакше кажучи, гідродинамічна структура потоків в таких апаратах близька до моделі ідеального змішування, тому концентрація розчину в таких апаратах близька до кінцевої, що призводить до погіршення умов тепло передачі.

Отже при виборі концентрування розчинів, доцільним є обрати вакуум випарювання через ряд переваг до мого продукту.

5.10.4 Обґрунтування способу сушіння ферментного препарату

Висушування – процес звільнення речовини (незалежно від агрегатного стану) від рідини. При висушуванні найчастіше відбувається видалення води або залишків органічних розчинників. Цей процес нерідко є і кінцевою операцією при очищенні ферментів. Висушування ферментних препаратів має за ціль отримати стабільний при зберіганні ферментний препарат із культуральної рідини.

В промисловості застосовуються різні методи для сушіння тих чи інших речовин: вакуум-висушування, сублімаційна сушка, розпилювальна сушка, аерофонтанна, вальцьова сушка. Відрізняються ці способи за температурою сушіння, продуктивністю, теплоносіями тощо.

В вакуум-сушильних шафах висушування ферментного препарату відбувається в тонкому шарі (0,5 мм) при температурі близько 30 °С і тиску 136 Па. Тривалість висушування в вакуум-сушильних шафах залежить від товщини шару, тиску, температури теплоносія та властивостей ферментного препарату. Другий період сушки менш інтенсивний, так як відбувається видалення вологи із глибинних шарів матеріалу. Підігрів відбувається водою, яка має температуру на вході приблизно 80-85 °С на першій стадії сушки і приблизно 40-50 °С на другій. Тривалість висушування препарату в вакуум-сушильних шафах становить від 8 до 16 годин в залежності від лабільності ферменту і режиму сушки [18].

Так як процес висушування в вакуум-сушильних шафах досить довгий і має декілька стадій, а продуктивність невелика, то використовувати такий спосіб економічно не вигідно.

Виключаємо використання вальцьової сушки, тому що використовувати такий спосіб сушіння необхідно лише на підприємствах з невеликою продуктивністю. Також в таких сушках можлива велика інактивація ферменту через те, що на вальці подається обігрів паром з температурою 150 °С, і навіть короткочасна взаємодія дає до 12-15 % втрат

активності ферменту. Також досить часто при використанні цього методу висушений препарат потрібно досушувати, і це веде до ще більших втрат [18].

Сублімаційну сушку для ферментних препаратів ведуть при глибокому вакуумі. Ферментний препарат на початкових стадіях сушки віддає частину вологи, охолоджується та само заморожується.

Зазвичай процес сублімаційної сушки починається із заморожування поверхні продукту при температурі мінус 20 – мінус 30 °С. Швидкість заморожування термолабільних матеріалів суттєво впливає на активність ферментів і інших біологічно активних речовин.

До недоліків сублімаційної сушки на відміну від вальцьової сушки або звичайної контактної вакуум-сушки є висока вартість установки, велика складність її експлуатації, значні витрати електроенергії та великі втрати.

Сушарки аерофонтанного принципу дії конструкційно являють собою конічні камери, в які подається осушувальний продукт. У сушильну камеру пристрою вологий матеріал потрапляє за допомогою газу-теплоносія [23]. Великим недоліком аерофонтаних сушарок є провал матеріалу в нижню частину сушарки, тому декілька разів за зміну необхідно його видаляти, також можливі випадки займання пилу, що є дуже небезпечно на виробництві.

У розпилювальних сушарках досягається висока інтенсивність випаровування вологи за рахунок тонкого розпилення матеріалу, що висушується, у сушильній камері, через яку рухається сушильний агент [26].

Розпилюючі сушильні апарати використовуються в тих випадках, коли сушиться продукт, який не витримує тривалого впливу високої температури. Сушіння здійснюється протягом декількох секунд, тому термолабільні продукти не встигають руйнуватися в процесі сушіння. За допомогою розпилюючої сушарки можна досить швидко і якісно висушити великі об'єми ферментних розчинів і отримати відразу подрібнений сухий препарат. Тривалість такого методу дуже мала, 5-8 с. При дотику маси з теплоносієм

волога миттєво випаровується, частинки охолоджуються і тому, не дивлячись на досить великі температури теплоносія на вході і виході, препарат не нагрівається більше ніж на 35 °С [31].

Розпилюючі сушарки поділяють на сушарки з форсуночним розпиленням в потоці теплоносія, в яких застосовуються гідравлічні або пневматичні форсунки та сушарки з відцентровим розпиленням в потоці теплоносія в яких застосовуються дискові розпилювачі.

Відцентрові дискові розпилювачі працюють за принципом розпилення струменів або плівок рідини з диску. Такі сушарки працюють, як правило, за прямоотечійною схемою. Наявність дискового розпилення передбачає великий діаметр сушильної камери, і як наслідок, невелику швидкість газу по перерізу камери. Великий діаметр камери з дисковим розпиленням приводить до збільшення габаритів конічної частини і, як наслідок, до збільшення економічних затрат. Такі сушарки мають ще ряд недоліків: порівняно невелика питома продуктивність, велика витрата сушильного агенту та висока дисперсність продукту сушіння. Такі суттєві недоліки унеможливають використання відцентрової дискової розпилюючої сушарки для сушіння ферменту протеази[2].

Сушарки з форсуночним розпиленням в потоці носія. Як вже згадувалося, в таких сушарках для розпилення можна використовувати гідравлічні (механічні) або пневматичні форсунки. Недоліками механічних форсунок є – складність регулювання продуктивності та ненадійна робота при розпиленні суспензій внаслідок закупорювання отворів твердими частинками, зношування сопла та порівняно з пневматичними форсунками досить мала продуктивність. Тому виключаємо використання механічних форсунок.

Щодо пневматичних форсунок, вони працюють за принципом розпилення рідини швидкісною струминою пари, що подається під тиском 01,-1 МПа. Продуктивність пневматичних форсунок – 12 т/год. Їх переваги: можливість досконало регулювати форму факела, висока продуктивність,

дисперсність розпилювання. Також досить суттєвою перевагою є те, що ця сушарка працює за принципом прямогоку і це дозволяє проводити сушіння при високих температурах без перегріву матеріалу [27]. І втрат активності досить малі, всього 3 %.



Рис 5.2 .Розпилююча сушарка

Отже при обґрунтуванні та виборі обладнання для сушіння було обрано розпилюючу сушарку, для меншого запобігання деструкції ферменту.

5.10.5 Обґрунтування стадії пакування цільового продукту

При виборі упаковки необхідно враховувати властивості самого цільового продукту та умови його зберігання. Необхідно обирати таку тару,

яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень, сприяла безпечному транспортуванню, збереженню та продажу. Продукт пакується у мішки по: 5, 10, 15 та 20 кг, також у поліетиленові мішки, які вкладаються в багатошарові паперові або ткані мішки з поліпропілену.

Для упаковки протеази обираємо крафт-мішки, так як даний пакувальний матеріал володіє наступними перевагами: високий ступінь міцності; повітропроникний, відповідно запакована в мішок продукція здатна «дихати»; максимально адаптується до коливань вологості і температури; водонепроникний; екологічно чистий. Продукт пакується у мішки по: 5, 10, 15 та 20 кг, також у поліетиленові мішки, які вкладаються в багатошарові паперові або ткані мішки з поліпропілену[32].

Недоцільним є використання поліетиленової упаковки, так як вона характеризується повітряною не проникністю і тому цільовий продукт буде швидко псуватися. Також виключаємо використання скляної тари, тому що це зробить товар дорожчим.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники:

- час роботи ферментера $T_{цф} = 70$ год (мийка та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація апарату (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища(1,5 год),засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год) та ферментація (60 год).

• $K_1=1,1$ – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій

• Сумарні втрати продукту при виробництві $E_{св} = 0,2$;

• Коефіцієнт заповнення ферментера $K_{ф}=0,5$;

• Коефіцієнт заповнення посівного апарата $K_{пш} = 0,5$;

• Коефіцієнт заповнення колб $K_{кол} = 0,2$;

• Коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,5$;

• Відсоток посівного матеріалу – 10%

• Втрати при культивування – 10 %

1. Розрахунок кількості виробничих циклів.

1.1. Кількість продукту на добу:

$$G_{нтд} = G_{нд}/T_{рд} = 7.500/60 = 125 \text{ кг/добу.}$$

1.2. Кількість готового продукту за цикл:

$$G_{цк} = G_{нд} \cdot T_{цф}/24 = 125 \cdot 70/24 = 365 \text{ кг/цикл.}$$

1.3. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{св}$):

$$V_{кр} = K_1 \cdot A_{цк}/A_{кр} * 1000(1-E_{св}) = 1,1 \cdot 554 \cdot 10^{-6} / (320 \cdot 1000(1-0,2)) = 2,3 \text{ м}^3$$

1.4. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 7500/365 = 21$$

2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу.

2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Об'єм готового поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) у

виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі ($E_{\phi} = 0,1$),
складе: :

$$V_{\phi} = V_{кр}/(1-E_{\phi}) = 2,3/(1-0,1) = 2,5 \text{ м}^3.$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера :

$$V_{псф} = V_{\phi}/(1+X_{\phi}) = 2,5/(1+0,1) = 2,27 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу на засів виробничого ферментера:

$$V_{пмф} = V_{\phi} - V_{псф} = 2,5 - 2,27 = 0,23 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнт заповнення ферментера $K_{зф} = 0,5$ його
приблизний геометричний об'єм складе :

$$V_{гф} = V_{\phi}/K_{зф} = 2,5/0,5 = 5 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий об'ємом ферментера 5 м^3 .

$$V_{гф} = 5 \text{ м}^3.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$2,5/5 = 0,5$$

1.1. Визначення кількості стадій вирощування посівного матеріалу.

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 230$ л культуральної рідини.
Враховуючи втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через
колектор E_{ϕ} (10-15 %). приймаємо втрати 10- %

Оскільки для засіву виробничого ферментера необхідно 230 л посівного
матеріалу то для одержання інокуляту обираємо посівний апарат на 5000л
компанії «Біотехно». З коефіцієнтом заповнення 0.5.

Для одержання $0,23 \text{ м}^3$ культуральної рідини в посівному апараті
враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор
відпрацьованого повітря. Приймаємо це за 10%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у
посівному апараті становитиме:

$$V_{роб2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 0,23/(1-0,1) = 0,255 \text{ м}^3$$

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят
у 10% (X_{ϕ}) буде становити:

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{ПА}}) = 0.255 / (1 + 0,1) = 0,232 \text{ м}^3$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 0,255 - 0,232 = 0,023 \text{ м}^3 (23 \text{ л})$$

Таку кількість культуральної можна одержати у інокуляторі з $K_{\text{зф}} = 0,5$ його приблизний геометричний об'єм складе :

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{зф}} = 0,255 / 0,5 = 500 \text{ л.}$$

Приймаємо місткість $V_{\text{гф}} = 500 \text{ л.}$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$0,255 / 0,5 = 0,5$$

Для одержання 28 л культуральної рідини в посівному апараті вираховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. Приймаємо це за 10%

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб}2} = V_{\text{пм}1} / (1 - E_{\text{па}}) = 23 / (1 - 0,1) = 26 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят у 10% ($X_{\text{ф}}$) буде становити:

$$V_{\text{пс}2} = V_{\text{роб}2} / (1 + X_{\text{ПА}}) = 26 / (1 + 0,1) = 23,6 \text{ л.}$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм}2} = V_{\text{роб}2} - V_{\text{пс}2} = 26 - 23,6 = 2,4 \text{ л}$$

Таку кількість культуральної рідини можна одержати у інокуляторі з $K_{\text{зф}} = 0,5$ його приблизний геометричний об'єм:

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{зф}} = 26 / 0,5 = 50 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом інокулятора $V_{\text{гф}} = 50 \text{ л.}$

Обираємо ферментер моделі BiostatDCU фірми «Sartorius».

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$26 / 0,5 = 0,5$$

Для одержання 2,4 л культуральної рідини в посівному апараті

вираховуємо втрати у результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря. Приймаємо це за 10%

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 2,4 / (1 - 0,1) = 2,6 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в ферментері з поправкою на інокулят у 10% ($X_{ф}$) буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{ПА}) = 2,6 / (1 + 0,1) = 2,4 \text{ л}$$

Звідси кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 2,6 - 2,4 = 0,2 \text{ л (200 мл)}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати у колбах на качалках об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0.2

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу буде становити:

$$N = V_{пм2} / (V_{колб} * K_{зк}) = 200 / (750 * 0.2) = 2.$$

1.2. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища для виробничого ферментера

Відповідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу, загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища ($V_{псф}$) складуть :

Враховуючи розподілення 50 г на літр соєвого борошна для розчину для підживлення кількість соєвого борошна у початковому складі виробничого середовища складе 50 г на літр ($115 - 50$) = 65

$$G_{ф} = V_{псф} * C_{\Sigma ф} = 2,27 * 65 = 147,55 \text{ кг, в тому числі :}$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} \quad - G_1 = G_{ф} * C_1 / C_{\Sigma ф} = 147,55 * 50 / 65 = 113,5;$$

$$\text{Соєве борошно} \quad - G_2 = G_{ф} * C_2 / C_{\Sigma ф} = 147,55 * 10 / 65 = 22,7;$$

$$\text{CaCO}_3 \quad - G_3 = G_{ф} * C_3 / C_{\Sigma ф} = 147,55 * 2,5 / 65 = 5,67;$$

$$\text{MgSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O} \quad - G_4 = G_{ф} * C_4 / C_{\Sigma ф} = 147,55 * 2,5 / 65 = 5,67;$$

Витрата кукурудзяного борошна для розчину для підживлення складе

Кукур борошно підживлення – $G_0 = G_f \times C_3 / C_{\Sigma f} = 147,55 \times 50 / 65 = 113,5$;

1.3. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{псф} = 2,27 \text{ м}^3$, кількість конденсату становитиме $V_{фк} = 2.27 \times 0,1 = 0.227 \text{ м}^3$.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$$V_{вф} = V_{псф} - G_f - V_{фк} = 2,27 - 0,227 - 0,14755 - 0,1135 = 1,732 \text{ м}^3 = 1732$$

Формуємо композиції:

Таблиця 6.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для виробничої ферментації (стерилізація в збірниках стерилізаторах)

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/ л	Вміст компонента в 2,27 м ³ (2270л) середовища ,кг (л)	Композиція	Об'єм композиції , л
1	2	3	4	5
Кукурудзяне борошно	50	113,5	А	1136,2
Сосве борошно	10	22,7		
Вода		1000		
Конденсат 10%		126,2		
CaCO ₃	2,5	5,67	Б	593,34
MgSO ₄ *7H ₂ O	2.5	5.67		
Вода		582		
Конденсат		65,83		

10%				
Кукурудзяне борошно(підживлення)	50	113,5	В	313,5
Вода		200		
Конденсат 10%		34,97		
Конденсат сумарно				227
Сума Σ	115	2270		2270

Композиції будуть стерилізуватися у окремих збірниках-стерилізаторах. Солі будуть стерилізуватися у одному збірнику при пониженому рН до 4,5.

1.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в апараті місткістю 500 л .

З розрахунку вище стадії підготовки ПМ необхідна кількість посівного матеріалу яку отримують з інокулятора – 1,11, звідси кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить :

$$V_i = \frac{V_i}{1 - E_{па}} = \frac{0,23}{1 - 0,1} = 0,255 \text{ м}^3.$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{псі} = \frac{V_i}{1 + X_{па}} = \frac{0,255}{1 + 0,1} = 0,232 \text{ м}^3.$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву:

$$V_{пмі} = V_i - V_{псі} = 0,255 - 0,232 = 0,023 \text{ м}^3.$$

Згідно зі прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні втрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псі}$ складають :

$$G_{\phi} = V_{псі} \times C_{\Sigma\phi} = 0,232 \times 65 = 15,08 \text{ кг, в тому числі:}$$

$$\text{Кукурудз. борошно} - G_1 = G_{\phi} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 15,08 \times 50 / 65 = 11,6$$

$$\text{Соеве борошно} - G_2 = G_{\phi} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 15,08 \times 10 / 65 = 2,32$$

$$\text{CaCO}_3 - G_3 = G_{\phi} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 15,08 \times 2,5 / 65 = 0,58;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 15,08 \times 2,5 / 65 = 0,58;$$

1.5. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарата.

Оскільки об'єм поживного середовища у посівному апараті складає $V_{\text{псі}} = 232$ л ($0,232 \text{ м}^3$) кількість конденсату буде дорівнювати.

$$V_{\text{фк}} = 232 \times 0,1 = 23,2 \text{ л.}$$

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$$V_{\text{ві}} = V_{\text{псі}} - G_1 - V_{\text{ік}} = 232 - 23,2 - 15,08 = 193,72 \text{ л.}$$

Формуємо композиції

Таблиця 6.2

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в посівному апараті на $0,500 \text{ м}^3$

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/ л	Вміст компонента в - $0,232 \text{ м}^3$ (232л) середовища ,кг (л)	Композиція	Об'єм композиції , л
1	2	3	4	5
Кукурудзяне борошно	50	11,6	А	113,92
Соєве борошно	10	2,32		
Вода		100		
Конденсат 10%		12,65		
CaCO ₃	2,5	0,58	Б	94,88
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,5	0,58		
Вода		93,72		
Конденсат 10%		10,55		
Конденсат сумарно				23,2
Сума Σ	65	232		232

Солі будуть стерилізуватися в одній композиції Б при пониженому рН до 4,5

1.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 50 л.

З розрахунку вище стадії підготовки ПМ необхідна кількість посівного матеріалу яку отримують з посівного апарата наступна – 112 л, звідси кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить :

$$V_i = \frac{V_i}{1 - E_{па}} = \frac{23}{1 - 0,1} = 25,55 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{псі} = \frac{V_i}{1 + X_{па}} = \frac{25,55}{1 + 0,1} = 23,22 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву:

$$V_{пмі} = V_i - V_{псі} = 25,55 - 23,22 = 2,33 \text{ л.}$$

Згідно зі прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні втрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псі}$ складають :

$$G_{\phi} = V_{псі} \times C_{\Sigma\phi} = 23,22 \times 65 = 1509,3\text{г} \quad (1,5093 \text{ кг}), \text{ в тому числі:}$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} - G_1 = G_{\phi} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 1509,3 \times 50 / 65 = 1161$$

$$\text{Соєве борошно} - G_2 = G_{\phi} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 1509,3 \times 10 / 65 = 232,2$$

$$\text{CaCO}_3 - G_3 = G_{\phi} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 1509,3 \times 2,5 / 65 = 58,05;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 1509,3 \times 2,5 / 65 = 58,05;$$

1.7. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для інокулятора.

Оскільки об'єм поживного середовища у посівному апараті складає $V_{псі} = 23,22$ л кількість конденсату буде дорівнювати.

$$V_{фк} = 23,22 \times 0,1 = 2,32 \text{ л}$$

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного

середовища буде :

$$V_{\text{вi}} = V_{\text{пci}} - G_1 - V_{\text{iк}} = 23,22 - 2,32 - 1,5093 = \text{л} = 19,37 \text{ л}$$

Формуємо композиції:

Таблиця 6.3.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища та одержання посівного матеріалу в посівному апараті на 50 л

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/ л	Вміст компонента в (23,2л) середовища ,кг (л)	Композиція	Об'єм композиції , л
1	2	3	4	5
Кукурудзяне борошно	50	1,161	А	11,39
Соєве борошно	10	0,2322		
Вода		10		
Конденсат 10%		1,26		
CaCO ₃	2,5	0,058	Б	9,48
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,5	0,058		
Вода		9,37		
Конденсат 10%		1,06		
Конденсат сумарно				2,32
Сума Σ	65	23,22		23,22

Солі будуть стерилізуватися у одній композиції при пониженому рН.

1.8. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у інокуляторі місткістю 20 л .

З розрахунку вище стадії підготовки ПМ необхідна кількість посівного матеріалу яку отримують з посівного апарата наступна – 11,31 л, звідси кількість поживного середовища та посівного матеріалу у інокуляторі

становить :

$$V_i = \frac{V_i}{1 - E_{па}} = \frac{2,33}{1 - 0,1} = 2,58 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища у посівному апараті становитиме:

$$V_{псі} = \frac{V_i}{1 + X_{па}} = \frac{2,58}{1 + 0,1} = 2,34 \text{ л}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву:

$$V_{пмі} = V_i - V_{псі} = 2,58 - 2,34 = 0,24 \text{ л}$$

Згідно зі прийнятим складом поживного середовища для вирощування інокуляту загальні втрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псі}$ складають :

$$G_{ф} = V_{псі} \times C_{\Sigma ф} = 2,34 \times 65 = 152,1 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{Кукурудз. борошно} - G_1 = G_{ф} \times C_1 / C_{\Sigma ф} = 152,1 \times 50 / 65 = 117$$

$$\text{Соєве борошно} - G_2 = G_{ф} \times C_2 / C_{\Sigma ф} = 152,1 \times 10 / 65 = 23,4$$

$$\text{CaCO}_3 - G_3 = G_{ф} \times C_3 / C_{\Sigma ф} = 152,1 \times 2,5 / 65 = 5,85;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{ф} \times C_4 / C_{\Sigma ф} = 152,1 \times 2,5 / 65 = 5,85;$$

1.9. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для інокулятора.

Оскільки об'єм поживного середовища у посівному апараті складає $V_{псі} = 11,43$ л кількість конденсату буде дорівнювати = оскільки середовище буде готуватися і стерилізуватися в колбах.

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде :

$$V_{ві} = V_{псі} - G_1 - V_{ік} = 2,34 - 0,152 = 2,188 \text{ л}$$

Формуємо композиції

Таблиця 6.4.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в посівному апараті на 5 л

Об'єм середовища,	Концентрація, г/л	Вміст компонента в	Композиція	Об'єм композиції, мл

яке необхідно приготувати		(2.34л) середовища ,г (мл)		
1	2	3	4	5
Кукурудзяне борошно	50	117	А	1328,4
Соєве борошно	10	23,4		
Вода		1188		
Конденсат 10%		-		
CaCO ₃	2,5	5,85	Б	1011,7
MgSO ₄ *7H ₂ O	2.5	5.85		
Вода		1000		
Конденсат 10%		-		
Конденсат сумарно				-
Сума Σ	65	2340		2340

Солі будуть стерилізуватися в одній колбі при встановленому рН у 4.5.

1.10. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить 0,24 л = 240 мл. Кількість колб в якій можна одержати дану кількість ПМ – 2 штук.

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{пск}$ складають:

$$G_{\phi} = V_{псф} \times C_{\Sigma\phi} = 0,24 \times 65 = 15,6 \text{ г, в тому числі:}$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} - G_1 = G_{\phi} \times C_1 / C_{\Sigma\phi} = 15,6 \times 50 / 65 = 12$$

$$\text{Соєве борошно} - G_2 = G_{\phi} \times C_2 / C_{\Sigma\phi} = 15,6 \times 10 / 65 = 2,4$$

$$\text{CaCO}_3 - G_3 = G_{\phi} \times C_3 / C_{\Sigma\phi} = 15,6 \times 2,5 / 65 = 0,6;$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\phi} \times C_4 / C_{\Sigma\phi} = 15,6 \times 2,5 / 65 = 0,6;$$

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{вi}} = V_{\text{псi}} - G_1 - V_{\text{iк}} = 240 - 15,6 = 224,4 \text{ мл}$$

Формуємо композиції:

Таблиця 6.5.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в колбах на качалці

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента в (0.24 л) середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
1	2	3	4	5
Кукурудзяне борошно	50	12	А	114,4
Соєве борошно	10	2,4		
Вода		100		
Конденсат 10%		-		
CaCO ₃	2,5	0.6	Б	100,6
Вода		100		
Конденсат 10%		-		
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,5	0,6	В	25
Вода		24,4		
Конденсат 10%		-		
Сума Σ	65	240		240

Усі композиції готуються у колбах та стерилізуються у окремих колбах в автоклаві.

Матеріальний баланс на один цикл виробництва (партію).

Таблиця 6.6

№	Використано	Отримано
---	-------------	----------

з/п	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм ³
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл, г)			
1.1.	Кукурудзяне борошно	12 г	Нестерильне ПС	240
1.2.	Соєве борошно	2,4		
1.3.	CaCO ₃	0.6		
1.4.	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,6		
1.5.	Вода	224,4		
	Всього:	240	Всього:	240
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1.	Нестерильне ПС	240	Стерильне ПС	240
	Всього:	240	Всього:	240
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мл)			
3.1.	Стерильне ПС	240	Посівний матеріал	240
3.2.	Посівний матеріал	-		
	Всього:	240	Всього:	240
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА НА 5 л (г, мл)			
4.1.	Кукурудзяне борошно	117	Нестерильне ПС	2340(2,34 л)
4.2.	Соєве борошно	23,4		

4.3	CaCO ₃	5,85		
4.4	MgSO ₄ *7H ₂ O	5,85		
4.5.	Вода	2188		
	Всього:	2340	Всього:	2340
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
5.1.	Нестерильне ПС	2,34	Стерильне ПС	2.34
5.2.	Конденсат	-	(втрат немає)	0
	Всього:	2,34	Всього:	2,34
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ на 5 л (л)			
6.1.	Стерильне ПС	2,34	Посівний матеріал	2.33
6.3.	Посівний матеріал з колб на качалках	0.24		
6.4.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	0,25
	Всього:	2,58	Всього:	2.58
7	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА НА 50 л (кг, л)			
7.1	Кукурудзяне борошно	1,161	Нестерильне ПС	20,9
7.2	Соєве борошно	0,2322		
7.3	CaCO ₃	0,058		
7.4	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,058		
7.5	Вода	19,37		

	Всього:	20,9	Всього:	23,22
8	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (л)			
8.1	Нестерильне ПС	20,9	Стерильне ПС	113,13
8.2	Конденсат	2.32	(втрат немає)	0
	Всього:	23,22	Всього:	23,22
9	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ на 50 л (л)			
9.1	Стерильне ПС	23,22	Посівний матеріал	23
9.2	Посівний матеріал з інокулятора на 5 л	2,33		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	2,55
	Всього:	25,55	Всього:	25,55
10	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА НА 500 л (кг, л)			
10.1	Кукурудзяне борошно	11,6	Нестерильне ПС	208,8
10.2	Соеве борошно	2,32		
10.3	CaCO ₃	0.58		
10.4	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.58		
10.5	Вода	193,72		
	Всього:	208,8	Всього:	208,8
11	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ НА 425 (л)			
11.1	Нестерильне ПС	208,8	Стерильне ПС	232

11.2	Конденсат	23,2	(втрат немає)	0
	Всього:	232	Всього:	232
12	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ на 500 л (л)			
12.1	Стерильне ПС	232	Посівний матеріал	230
12.3	Посівний матеріал з інокулятора на 50 л	23		
12.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	25
	Всього	255	Всього	255
13.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ, кг л			
13.1.	Кукурудзяне борошно	113,5	Нестерильне ПС	2043
13.2.	Соеве борошно	22,7		
13.3	CaCO ₃	5,67		
13.4	MgSO ₄ *7H ₂ O	5.67		
13.5.	Кукурудзяне борошно для підживлення	113,5		
13.6	Вода	1782		
	Всього:	2043	Всього:	2043
14.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (5000 л)			
14.1.	Нестерильне ПС	2043	Стерильне ПС	2270
14.2.	Конденсат	227	(втрат немає)	0,0
	Всього:	2270	Всього:	2270
15.	ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТУ ВИРОБНИЧОМУ ФЕРМЕНТЕРІ (л)			
15.1.	Стерильне ПС	2270	Культуральна рідина	2300

15.2.	Посівний матеріал з посівного апарата	230		200
	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	
	Всього:	2500	Всього:	2500

Розрахунок технологічного обладнання.

3.1. Уточнючий розрахунок ферментаційного обладнання.

3.1.1. Уточнючий розрахунок кількості ферментерів.

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_3=0,61$:

$$V_{гф} = V_{ф}/K_3 = 2,5/0,5 = 5 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер компанії « Біотехно» на 5 м^3 л:

Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 :

$$N_{фр} = V_{гф}/V_{нф} = 5/5 = 1 \text{ – приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$$K_{зф} = V_{ф}/(V_{нф} \times N_{фр}) = 2,5/(5 \times 1) = 0,5$$

3.1.2. Уточнючий розрахунок кількості інокуляторів

Посівний апарат для одержання 255 л ПМ

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3=0,5$:

$$V_{гін} = V_{ін}/K_3 = 255/0,5 = 500 \text{ л.}$$

Як посівний апарат обираємо ферментер « Біотехно» на 500 л:

Кількість інокуляторів при заданому $K_{зін}$:

$$N_{інр} = V_{гін}/V_{нін} = 500/500 = 1 \text{ – приймаємо } 1.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі приймаємо до установки посівних апаратів $N_{інр} + 1$ запасний.

Посівний апарат для одержання 26л ПМ.

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3=0,5$:

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_3 = 26/0,5 = 50 \text{ л}$$

Як посівний апарат обираємо ферментер компанії «Sartorius» на 50 л моделі BIOSTAT® D DCU [9]: $V_{\text{ін}} = 50$ л. Кількість посівних апаратів при заданому $K_{\text{зін}}: N_{\text{інр}} = V_{\text{гін}}/V_{\text{нін}} = 50/50 = 1$ – приймаємо 1

Поправляємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 26/0,5 = 0,5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі приймаємо до установки посівних апаратів $N_{\text{інр}} + 1$ запасний.

Інокулятор для одержання 2,58 л ПМ.

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_3 = 0,5$:

$$V_{\text{гін}} = V_{\text{ін}}/K_3 = 2,6/0,5 = 5 \text{ л}$$

Як посівний апарат обираємо ферментер компанії «Sartorius» на 5 л моделі BIOSTAT® Cplu:

$V_{\text{ін}} = 5$ л. Кількість посівних апаратів при заданому $K_{\text{зін}}: N_{\text{інр}} = V_{\text{гін}}/V_{\text{нін}} = 5/5 = 1$ – приймаємо 1.

Поправляємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 2,6/0,5 = 5 \text{ приймаємо до установки інокуляторів } N_{\text{інр}} + 1 \text{ запасний.}$$

3.1.3. Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}} = 0,2$:

$$V_{\text{гколб}} = V_{\text{колб}}/K_{\text{колб}} = 200/0,2 = 1000 \text{ мл}$$

$$\text{Об'єм 1 качалочної колби } V_{\text{нколб}} = 750 \text{ мл.}$$

$$\text{Кількість качалочних колб при заданому } K_{\text{колб}} = 0,2:$$

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{гколб}}/V_{\text{нколб}} = 1000/750 = 1,3 \text{ колби. Приймаємо 2 штуки.}$$

3.2. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері та підготовки посівного матеріалу

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції А при виробничому ферментері.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора змішувача при заданому $K_{зб} = 0,5$

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 1136/0,5 = 1622,8 \text{ м}^3.$$

Обираємо збірник- змішувач типу СРЕН об'ємом $1,6 \text{ м}^3$. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить: $N_p = V_{Апа}/V_{рст} = 1.622/1,6 = 1,01$ – приймаємо 1.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора $K_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_p) = 1136/1600 = 0,5$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах $(0,7 - 0,9)$, приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції Б при виробничому ферментері.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,5$

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 593/0,5 = 847,14 \text{ м}^3.$$

Обираємо збірник- змішувач типу СРЕН об'ємом 1 м^3 . Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить:

$$N_p = V_{Апа}/V_{рст} = 0,847/1 = 0,84 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_p) = 593/1000 = 0,59$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах $(0,6 - 0,9)$, приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування розчину соєвого борошна для підживлення при виробничому ферментері.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-

змішувача при заданому $K_{зб} = 0,5$

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 313/0,5 = 447,14 \text{ л}$$

Обираємо збірник- змішувач типу СРЕН об'ємом 500 л . Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить :

$$N_p = V_{Апа}/V_{рст} = 447,14/500 = 0,89 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_p) = 313/500 = 0,526$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,5 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції А при посівному ферментері на 425 л .

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,5$,

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 114/0,5 = 162,8 \text{ л.}$$

Обираємо реактор- змішувач типу СРЕН об'ємом 160 л . Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить :

$$N_p = V_{Апа}/V_{рст} = 162,8/160 = 1,017 - \text{приймаємо } 1 .$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_p) = 114/160 = 0,71$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,7 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції Б при посівному ферментері на 425 л .

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7$

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 94,88/0,7 = 135,5 \text{ л.}$$

Обираємо реактор- змішувач типу СРЕН об'ємом 160 л . Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить :

$$N_p = V_{Апа}/V_{рст} = 135,5/160 = 0,84 - \text{приймаємо } 1 . \text{ Уточнюємо}$$

коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_p) = 94,88/160 = 0,6$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,6 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції А при посівному ферментері на 50 л .

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,7$

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 11,39/0,7 = 16,3 \text{ л.}$$

Обираємо реактор-змішувач об'ємом 20 л . Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить :

$$N_p = V_{Апа}/V_{рст} = 16,3/20 = 0,81 - \text{приймаємо } 1 . \text{ Уточнюємо}$$

коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{Апа}/(V_{рст} \times N_p) = 11,4/20 = 0,55$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,5 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

Уточнюючий розрахунок реактора для приготування композиції Б при посівному ферментері на 50л.

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування та стерилізації композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,5$:

$$V_{Апа} = V_A/K_{зб} = 9,5/0,5 = 14, \text{ л.}$$

Обираємо реактор- змішувач об'ємом 20 л . Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$ становить :

$N_p = V_{\text{Апа}}/V_{\text{рст}} = 14,4/20 = 0,72$ – приймаємо 1 . Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора :

$$K_{зр} = V_{\text{Апа}}/(V_{\text{рст}} \times N_p) = 9,5/20 = 0,47$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,5 – 0,9), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний (2 шт.).

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ферменту протеази зображено в табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д-3 Д-6 Д-15 Д-17 Д-19 Д-21 Д-23 Д-25 Д-27 Д-29	Об'ємно- ваговий дозатор	10	Дозатор виробництва НВП "Техноаги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%.
Н-2 Н-5 Н-40	Винтовий насос	3	Винтовий насос фірми Bellin, продуктивністю до 260 м ³ /год
Р-7	Збірник для Гембару	1	Реактор об'ємом 200 л,н/ж сталь оснащений перемішуючим пристроєм, швидкість перемішу-вання 100 об/хв.
ПЗ-8	Повітрозабірник	1	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-9	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал – хімволокно ФВР, Е=90%.

НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Закрасняний А.О		
Консультант				
Керівник		Пенчук Ю. М.		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ				
			Літ.	Арк.
			Аркушів	
Кафедра БТМ ⁹²				

К-10	Компресор	1	Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с.
Т-11	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач серії АС-13,5 фірми «Уралкомпресормарш»(Росія) продуктивністю 13,5 нм ³ /год.
РС-12	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія), об'єм 430 л, робочий тиск 1,8 МПа.
Т-13	Теплообмінник нагрівач	1	Корпус теплообмінника фірми VENTS (Україна) виготовлений із оцинкованої сталі, максимальний робочий тиск 1,6 МПа.
Ф-14	Фільтр головний	1	Фільтруючий матеріал –волоконистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E=96%.
Р-16 Р-20 Р-24 Р-28	Реактор змішувач для композиції А	8	Реактори об'ємом 5 л, 50 л., 500л,5м ³ , з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв.
Р-18 Р-26 Р-30 Р-22	Реактор змішувач для композиції Б		
ЗК-31	Засівний колба	1	Загальний об'єм до 5 л. Нержавіюча сталь
Ф-32 Ф-34 Ф-36 Ф-38	Індивідуальний фільтр	4	Фільтри марки BonescoActive carbon filter (Швеція), E=99.
ІН-31	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 5 л, швидкість перемішування 180 об/хв.
ІН-33	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 50л, швидкість перемішування 180 об/хв.

ІН-35	Інокулятор	1	Ферментер барботажний об'ємом 500 л, швидкість перемішування 180 об/хв.
ФР-39	Ферментер	1	Ферментер барботажний об'ємом 5 м ³ , швидкість перемішування 180 об/хв.
Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ЗК-1	Збірник культуральної рідини з мішалкою та сорочною	1	Реактор-збірник з НЖ сталі на 5 м ³ з мішалкою та сорочкою, Виробник : Zhejiang, China [14].
ЦВ-3	Центрифуга відстійна	1	Центрифуга відстійна ОГН-903Т-02 потужністю 30 кВт, максимальна кількість обертів на хвилину 2000, фактор розділення 1500 g, місткість робочої частини 145 л. Виробник : ПАО "Сумське НПО, Україна [15].
Р-4	Реактор-збірник супернатанту	1	Реактор хімічний обладнаний якорною мішалкою типу СЕРн місткістю 4300 л СЭрн 4,0-2-12, обладнаний сорочкою. ТОВ « Азовхімсервіс» [16].
ВВА-6	Вакуум-випарний апарат	1	Вакуумний випарний апарат МЗС-320з перемішувальним пристроєм місткістю 2000 л. Робочий тиск 0,08 ... 0,085 МПа Виробник Україна [17].
Р-8	Реактор для збирання концентрату	1	Реактор хімічний обладнаний якорною мішалкою типу СЕРн місткістю 2500 л, обладнаний сорочкою. ТОВ « Азовхімсервіс» [18].
СР-10	Сушарка розпилювальна	1	Розпилювальна сушарка А1-ОРЧ продуктивністю 500 кг/год, потужність 96 кВт. Виробник: Україна[19].
ФПА-11	Фасовочно-пакувальний апарат	1	Пакувально-дозувальний апарат для сухих продуктів у мішки поліетиленові типу MQD-530 з дозуванням 50-3000 г

			продуктивністю 25-65 упаковок за хввиробництва НВП «МООНА.»[20]
Н-2, Н-5	Насоси відцентрові імплерні	2	Насос імплерний фірми «ООО Ватерпас» серії типу ЕРМАJОR 60потужністю до 19500 л/год, [21].
Н-7, Н-9	Насос перистальтичний	2	Насоси перистальтичні фірми «ООО Ватерпас» серії типу RоthоPSF2потужністю до 712 л/год, [22].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу та виділення ферменту протеази включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка повітря для розпилюючої сушарки, підготовка та стерилізація поживних середовищ, та піногасника) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез ферменту протеази, зберігання культуральної рідини, відділення біомаси, отримання очищеної культуральної рідини яка містить вихідний фермент; сушіння ферментного препарату).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування мийчих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину каустичної соди

Для миття обладнання та комунікацій необхідно 5 м³ мийного засобу (див. розд. 2). Робочий розчин каустичної соди (2 %) готують в установці СІР-мийка. Для цього зважують за допомогою об'ємно-вагового дозатора 445 кг каустичної соди та додають 4555 л води.

ДР 1.1.2. Підготовка робочого розчину Гембару

Зі складу надходить концентрат Гембару (25 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Готують у збірнику об'ємом 800 л. Щоб отримати 560 л (0,5 %) розчину Гембару наливають 24 л 25% Гембару та 536 л водопровідної води і включають перемішуючий пристрій

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. Його проводять у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях. При проведенні вологого прибирання

використовують 0,5 % робочий розчин Гембару (від ДР 1.1.2).

НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Закрасняний А.О			РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант								
Керівник		Пенчук Ю. М.				Кафедра БТМФ6		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання приміщень.

Генеральне прибирання проводять раз у місяць 0,5 %-м робочим розчином «Гембар» (від ДР 1.1.2.). Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульта 0,5 % розчином Гембару з розрахунку 100 мл/м². Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію СІР – мийки, питну воду і 2 %-й робочий розчин каустичної соди (від ДР 1.1.1.).

ДР 1.3.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Після проведення миття, ополіскування та ремонтних робіт перевіряють обладнання на герметичність, для цього в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (дифторхлорметан). Далі закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Потім перебивають 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. При більшому відхиленні за допомогою галогенного

течієпошукача починають пошук неущільнень шляхом перевірки усіх місць з'єднань. При наближенні щупа течієпошукача до місця нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх таких місць їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають глуху пару і нагрівають його до 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, 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 години. 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 $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 2-3 м від найвищого приміщення за допомогою пристрою для забору повітря.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Повітря очищується від грубого аерозолію на фільтрі грубої очистки. Ступінь очищення – 90 %.

ДР 2.3. Компресування повітря

Повітря стискають у компресорі до 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря до температури 25 °С для відведення надлишкової вологи.

ДР 2.5. Видалення зайвої вологи

Повітря подають на ресивер для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ($W = 60 \%$).

ДР 2.6. Нагрівання повітря Охолоджене повітря підігрівають до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику.

ДР 2.7. Очищення на головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі. Ступінь очищення – 96 %. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

ДР 2.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 %.

ДР 3. Підготовка повітря для розпилюючої сушарки

ДР 3.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється повітрозбірником (П-7) на висоті близько 2–3 м. від найвищої ділянки будівлі. Потім повітря через повітрозабірну шахту потрапляє до фільтру попереднього очищення (Ф-8).

ДР 3.2. Грубе очищення повітря

На стадії грубого очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром до 150, 300 мкм. В якості фільтрів (Ф-8) попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки – ФЯП. Який складається з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої покладений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан). Ефективність очищення повітряними фільтрами ФЯП становить 80 %.

ДР 3.3. Очищення повітря на головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у головному фільтрі (Ф-10). Для головних фільтрів використовується фільтр ФТО-750 з ефективністю $E = 99,92\%$. ДР 3.4. Нагрівання повітря

ДР 3.4. Нагрівання повітря

Повітря нагрівається у калорифері (К-57) до температури $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, для подальшої подачі до розпилюючої сушарки (РС-58).

ДР 4. Приготування та стерилізація піногасників

ДР 4.1. Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 5 л.

Так як робочий об'єм поживного середовища становить 2,5 л, то кількість піногасника, якого необхідно приготувати та простерилізувати потрібно 20 мл відповідно.

У мірному циліндрі відміряють необхідну кількість піногасника. Вміст мірного циліндра переносять у колбу об'ємом 100 мл. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують у автоклаві.

Стерилізацію проводять при температурі $131\text{ }^{\circ}\text{C}$, тиску $0,15\text{ МПа}$ упродовж 40 хв.

ДР. 4.2. Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 50 л.

Робочий об'єм середовища 136 л, для такої кількості середовища необхідно простерилізувати 200 мл піногасника. Мірним циліндром відміряють необхідну кількість піногасника. У колбу місткістю 500 мл переносять піногасник, колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві.

Стерилізацію проводять при температурі $131\text{ }^{\circ}\text{C}$, тиску $0,15\text{ МПа}$ упродовж 40 хв.

ДР. 4.3. Приготування на стерилізація піногасника для ферментера об'ємом 500 л.

Для виробничого культивування у ферментері місткістю 500 л, необхідно підготувати 2 л піногасника.

Стерилізація відбувається у збірнику, який обладнаний електричною системою підігріву при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР. 4.4. Приготування на стерилізація піногасника для ферментера об'ємом 5000 л.

Для виробничого культивування у ферментері місткістю 5000 л, необхідно підготувати 20 л піногасника.

Стерилізація відбувається у збірнику, який обладнаний електричною системою підігріву при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживних середовищ для колб на качалках

ДР 5.1.1 Приготування і стерилізація поживного середовища

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у *табл. 8.1.*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 200 мл поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,2 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Кукурудзяне борошно	100	20	А	140
Соєве борошно	10	2		

CaCO ₃	2,5	0,5	Б	60
MgSO ₄ *2H ₂ O	2,5	0,5		

Поживне середовище поміщають в колби які закривають ватно-марлевими пробками далі колби поміщають в автоклав. Стерилізація композиції А відбувається за температури 112 °С на 30 хв. Композиція Б стерилізується окремо в автоклаві за температури 131 °С 40 хв.

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживних середовищ для інокулятора 5 л.

ДР 5.2.1 Приготування і стерилізація поживного середовища

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу інокуляторі 5л наведений у табл. 8.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,5 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,5 л середовища, г	Композиція	Об`єм композиції, мл
Кукурудзяне борошно	100	250		1500

Соєве борошно	10	25	А	400
CaCO ₃	2,5	6,25	Б	300
MgSO ₄ *2H ₂ O	2,5	6,25		300

Поживне середовище поміщають в колби які закривають ватно-марлевими пробками далі колби поміщають в автоклав. Стерилізація композиції А відбувається за температури 112 °С на 30 хв. Композиція Б стерилізується окремо в автоклаві за температури 131 °С 40 хв.

ДР 5.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 50 л інокулятора

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Кукурудзяне борошно і соєве борошно поміщають в інокулятор об'ємом 50 л. та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 5.3.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 5кг CaCO₃ та MgSO₄*2H₂O наважки переносять в інокулятор на 50 л з коефіцієнтом заповнення 0.5, додають 20л дистильованої води, та заварюють.

Таблиця 8.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 25 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 25 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм води, л	Об'єм композиції, л
Кукурудзяне борошно	100	4	*А	15,75	20
Соєве борошно	10	0,25			
CaCO ₃	2,5	0,062	*Б	4,32	5
MgSO ₄ *2H ₂ O	2,5	0,062			
			Всього:	20,7	25

ДР 5.4 Приготування та стерилізація поживних середовищ для 500 л інокулятора***ДР 5.4.1. Приготування та стерилізація композиції А***

Кукурудзяне борошно і соєве борошно поміщають в інокулятор об'ємом 500 л. та стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 5.4.2. Приготування композиції Б

На вагах попередньо зважують 0,6 кг CaCO₃ та 0,6 кг MgSO₄*2H₂O

наважки переносять в інокулятор 500 л, з коефіцієнтом заповнення 0,5, додають по 250 л дистильованої води, перемішують.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 250 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 250 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм води, л	Об'єм композиції, л
Кукурудзяне борошно	100	25	А	172,5	200
Соєве борошно	10	2,5			
CaCO ₃	2,5	0,6	Б	48,8	50
MgSO ₄ *2H ₂ O	2,5	0,6			
			Всього:	221,3	250

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу**ТП.6.1. Підтримання колекційної культури**

Колекційну культуру *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д зберігають у пробірках на агаризованому середовищі в холодильник при 5 – 7 °С. Для збереження фізіолого-біохімічних властивостей штаму здійснюють пересіви (не рідше 1 разу на 2 місяці). Всі роботи з колекційною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках, розсівають у пробірки зі скошеним середовищем. Вирощують при температурі 37 °С упродовж 24 год.

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від ТП 6.2) пересівають петлею у пробірки з мясо-пептонним середовищем. В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год.

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 5 літрів.

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у інокулятор розміром 5 л в асептичних умовах вносять 2000 мл розчину композиції А, 500 мл розчину композиції Б.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 50 л.

В інокулятор об'ємом 50 л, де вже знаходиться попередньо простерилізована композиція А, в асептичних умовах вносять 5 л стерильної композиції Б (від ДР 4.3.3.). Після цього перекачують посівний матеріал (від ТП 5.3.) через патрубков відкривши вентиль і вмикають перемішувачий пристрій. Інокулятор обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається піногасник (від ДР 3.1.). Також подається стерильне повітря (від ДР 2.8.). Температура вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі – 30 °С, тривалість – 48 год. Швидкість перемішування становить 180 об/хв.

В апараті створюється надлишковий тиск ($P = 0,02 - 0,05$) подачею стерильного стисненого повітря.

З дотриманням правил асептики з малого інокулятора відбирають проби через кожні 8 годин, в якій аналізують: вміст вуглецю, азоту та мікробіологічну чистоту.

Процес закінчують по досягненні 24 годин культивування. Після закінчення культивування, культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 500 л.

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500л.

В інокулятор об'ємом 500 л з 150 л попередньо простерилізованою композицією А (від ДР 4..1.) в асептичних умовах самоплином подають 50 л стерильного розчину композиції Б (від ДР 4..2), а за допомогою труби перетискування – посівний матеріал (від ТП 5.6.) і вмикають перемішувачий

пристрій. Інокулятор обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається піногасник. Також подається стерильне повітря (від ДР 2.8.). Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 37 °С, тривалість – 24 год. Швидкість перемішування становить 180 об/хв.

З дотриманням правил асептики з інокулятора відбирають проби через кожні 8 годин, в якій аналізують: вміст вуглецю, азоту та мікробіологічну чистоту.

Процес закінчують по досягненні 48 годин культивування. Після закінчення культивування, культуральну рідину перекачують в ферментер 5 м³ через трубу перетискання.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1 Виробничий біосинтез

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з об'ємом 5 м³. У попередньо простерилізований ферментер в асептичних умовах за допомогою винтового насоса вносять стерильне поживне середовище (від ДР 4.5) Через вентель – посівний матеріал (від ТП 5.6) і вмикають перемішуючий пристрій. Перемішуючим пристроєм слугує турбінна мішалка закритого типу, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 180 об/хв. Ферментер обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається піногасник (від ДР 3.4.). Також подається стерильне повітря (від ДР 2.8.). Тривалість виробничого культивування становить 60 годин при температурі 37 °С.

В апараті створюється надлишковий тиск ($P = 0,02 - 0,05$) подачею стерильного стисненого повітря.

З дотриманням правил асептики з посівного апарату відбирають проби через кожні 8 годин, в якій аналізують: вміст вуглецю, азоту, активність протеази та мікробіологічну чистоту.

Процес біосинтезу завершують, коли активність протеази становить 320 од/мл і культуральна рідина передається на стадію виділення ферменту.

ТП 8. Відділення біомаси від культуральної рідини

ТП 8.1 Центрифугування культуральної рідини.

У реактор-збірник культуральної рідини на 5 м³ ЗК-1 завантажують весь об'єм культуральної рідини з виробничого ферментера (близько 3000 л) у якій міститься цільовий продукт. Після цього відкривають кран подачі води холодної та охолоджують культуральну рідину до 12 °С, вмикають мішалку на 100 обертів та підтримують даний режим перемішування упродовжсього терміну зберігання.

Для початку відділення біомаси відкривають донний клапан збірника ЗК-1 та клапан входу ректора Р-4. Після цього вмикають центрифугу ЦВ-3, та встановлюють швидкість обертання ротору: 2000 об/хв. Потім встановлюють час витримки супернатанту у центрифугі 18-25 хв, далі вмикають насос Н-2, подають певну кількість культуральної рідини зі збірника ЗК-1 на центрифугу (кількість 140-145 л). Після витримки у центрифугі протягом 18-25 хв відкривають клапан відбору продукту у центрифугі і продукт поступає у реактор Р-4. Потім завантажують наступну порцію продукту з ЗК-1. У Реакторі Р-4 після подачі першої порції продукту вмикають мішалку на 120 об/хв та подають холодну воду для охолодження продукту до 12⁰С. Після порційного центрифугування по закінченню кількості культуральної у реакторі ЗК-1 процес завершують. Біомасу відвантажують вручну з ємності для збору біомаси.

ТП.9 Концентрування

ТП 9.1 Концентрування на вакуум випарному апараті.

Відкривають донний клапан реактора Р-4 та насосом Н-5 подають 1000 л супернатанту у вакуумний випарник ВВА-6. Після додавання всієї кількості апарат герметизується, після цього з нього відкачується повітря до тиску 100 кПа і починають набір температури порційною подачею пари. Температура упарювання становить 50⁰С і підтримується до завершення процесу. Упарювання проводять до зменшення вихідної кількості розчину

до 250 л . Одержаний концентрат перекачують насосом Н-7 до реактора-збірника Р-8. У реакторі після додавання першої порції концентрату подають у сорочку реактора холодну воду і підтримують температуру 12-15 °С та вмикають мішалку виставлену на 150 об /хв. Упарювання та перекачку концентрату до Р-8 здійснюють порційно по 1000 л початкового супернатанту та 250 л концентрату відповідно у 3 заходи. Орієнтовна кількіть концентрату після упарювання становить 750 л.

ТП 10. Сушіння продукту.

ТП 10.1 Сушіння продукту на розпилювальній сушарці.

Відкривають клапан донного зливу реактора Р-8, вмикають подачу повітря на сушарку СР-10 та насосом Н-9 подають концентрат на розпилювальну головку сушарки СР-10. Гаряче повітря для сушіння температурою повинно мати температуру 250⁰С, гаряче повітря в момент контакту краплі з розпилюючого дистку буде охолоджуватися до 65⁰С, що не буде призводити до інактивації ферменту. Процес сушіння проводять при продуктивності подачі насосу Н-9 7-8 літрів на хвилину. Процес сушіння проводять до вичерпання всієї кількості концентрату. Вологість продукту повинна становити на більше 5-6 %.

ТП 11. Стандартизація

У бункері (Б-18) висушений ферментний препарат стандартизують до активності протеази в готовому продукті 1600 од/г

ПМВ 12. Пакування готового продукту.

ПМВ 12.1 Пакування у поліетиленові мішки.

У бункер пакувальної машини ФПА-11 завантажують сухий продукт вручну через окремі ємності одержаний на сушарці СР-10. Встановлюють на приймач пакувального матеріалу блок з поліетиленовими мішками. Встановлюють вагову кількість на автоматичному дозаторі пакувальної машини у значенні 400 г, встановлюють продуктивність у 25 пакетів за хв

Запускають пакувальну машину. Завершують процес пакування після вичерпування кількості продукту.

ПМВ 12.2 Групове пакування.

Мішки завантажують на палету з дерева та обмотують поліетиленовою плівкою. Додають документацію та сертифікати якості і відправляють на склад. Наносять номер партії та серії.

ЗВ 13. Знешкодження відходів

ЗВ 13.1. Знешкодження газоподібних відходів

Очищення викидів з ферментерів здійснюють за допомогою скрубєрів.

ЗВ. 13.2. Знешкодження твердих відходів

Найбільше застосування для знешкодження та утилізації твердих промислових відходів знаходять термічні методи їх обробки під впливом високих температур. Спалювання помірно та мало небезпечних твердих промислових відходів можна здійснювати в печах різної конструкції (камерні, барабанні тощо).

ЗВ 13.3. Знешкодження рідких відходів

Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують на очисні споруди.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Мікробіологічний контроль.

В мікробіологічному контролі передбачається: підтримання умов, потрібних для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів; виробничий процес та готову продукцію; своєчасне виявлення контамінації та встановлення джерела її появи [30].

Підчас вирощування та культивування штаму мікроорганізму один раз на вісім годин відбирають пробу для аналізу та виявлення сторонніх контамінантів. Відібрані проби культуральної рідини мікроскопіюють та візуально оглядають, для виявлення можливих заражень, а також здійснюється періесів проб на чашки Петрі з агаризованими середовищами [30].

В лабораторних умовах готують препарат роздавлена крапля, для подальшого мікроскопіювання та виявлення сторонніх мікроорганізмів. Для приготування препарату роздавлена крапля, на предметне скло наноситься одна крапля дистильованої води, за допомогою петлі на краплю вноситься культуральна рідина і накривається покривним склом. Мікроскопіювання здійснюють зі збільшенням 40х.

Клітини являють собою грампозитивні, поодинокі рухливі палички розміром 0,6-0,8 і 0,2-0,3 мк, спороутворюючі, мають центральне положення спори і овальну форму[2].

					НУХТ БТЕК 04.02.43. ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Закрасняний А.О						
Консультант								
Керівник		Пенчук Ю. М.						
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ ₁₁		



Рис.9.1 Колонії *Bacillus licheniformis* на тарілці з агаром крові.

Для мікроскопіювання використовують препарат – «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою 90х .

При потребі перед мікроскопією звичайного препарату роблять препарат з фарбуванням за Грамом. Для кращого підтвердження чистоти культури:

Готують мазковий препарат та фіксують його на полум'ї пальника. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають.

Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2 хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. У препараті повинні бути лише грампозитивні клітини які фарбуються у фіолетовий колір.

9.2 Визначення концентрації біомаси

Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [30].

Визначення титру клітин (концентрації клітин). Метод Коха:

В ряду послідовних десятикратних розведень досліджуваного зразка з 2 останніх розведень (ступінь розведення залежить від кількості КУО в 1 мл досліджуваного препарату). Роблять кілька послідовних десятикратних розведень культуральної рідини, орієнтовно 7-8 штук. Далі по 0,1 мл мікробної суспензії висівають на чашки Петрі з поживним середовищем (МПА або рибним агаром). Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища шпателем Дрігальського до повного вбирання (висихання) суспензії. Чашки закривають і поміщають перевернутими догори дном в термостат для інкубації. Посіви інкубують при температурі $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$ протягом 12- 24 год. Метод придатний для визначення лише живих клітин. Після інкубації підраховують кількість колоній, що вирости [33, 34].

9.3 Визначення активності протеази.

Основою визначення є широко відомий метод Ансона, заснований на визначенні тирозину, який утворився в результаті ферментного гідролізу білка, з реактивом Фоліна.

Після дії дослідного ферментного препарату на розчин казеїну білок, що не розклався, осаджують 5 %-ою трихлороцтовою кислотою (ТХО) і у фільтраті за допомогою колориметричної реакції з реактивом Фоліна визначають кількість гідролізованого білка, який не осаджується ТХО. Беруть кількість розщепленого білка, пропорційну кількості тирозину, що міститься у фільтраті.

Одержані значення оптичної густини переводять у мікромолі тирозину за стандартною кривою, побудованою за чистим тирозином. За одиницю ПС взято таку кількість ферменту, яка каталізує перехід у неосаджуваний ТХО стан кількість білка, яка містить 1 мікромоль тирозину, за 1 хв при температурі $30 ^\circ \text{C}$. Протеолітичну активність препаратів виражають числом одиниць в 1 г препарату, а розчинів ферментів числом одиниць в 1 мл розчину [30].

У контрольну пробірку вносять 1 мл фільтрату культуральної рідини. В три пробірки додають по 3 мл реактиву динітросаліцилової кислоти (ДНС) і перемішують. Всі три пробірки поміщають у киплячу водяну баню на 5 хв. Потім пробірки охолоджують до кімнатної температури і колориметрують на фотоелектоколориметрі або спектрофотометрі з довжиною хвилі 540 нм, в кюветах з товщиною поглинаючого світла 10 мм.

Якщо значення оптичної густини дослідних проб знаходяться за межами робочої зони градуювального графіка, визначення активності слід повторити з розчином, що має більший або менший вміст ферменту.

Ферментативну активність протеази ПрсА (од/мл) визначають за формулою:

$$\text{ПрсА} = \frac{(C_0 - C_k)}{t \cdot c}$$

де C_0 – молярна концентрація протеази у дослідній пробі;

C_k – молярна концентрація протеази у контрольній пробі;

t – тривалість гідролізу, хв.;

c – масова концентрація ферментного препарату в 1 мл робочого розчину аналізуємого зразка, розраховують за формулою:

$$c = \frac{m}{V \cdot P}$$

де m – маса наважки, г;

V – об'єм розведення, мл;

P – розведення основного розчину для приготування робочого розчину.

9.4 Визначення концентрації амінного азоту

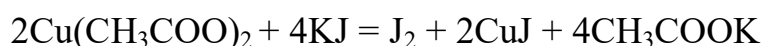
Джерелом азоту в середовищі для культивування *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366Д є соєве борошно, до складу якого входить азот в аміній формі.

Концентрація азоту визначається у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ -

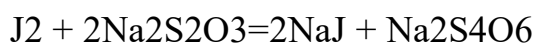
2366Д при 3000 об/хв протягом 20 хв, для видалення біомаси, мідним методом.

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні сполуки. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [30].

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



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію:



1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$ [15].

Техніка визначення. В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 мл дослідного розчину, додають 3-4 краплини індикатору тимолфталеїну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/л до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 мл 80 %-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що

виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 мл культуральної рідини. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = \frac{a \cdot 0,28 \cdot 6 \cdot 10 \cdot 100}{50}$$

де a – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, витраченого на титрування, л; b – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз,

9.5 Визначення джерела вуглецю

У колбу на 100 мл додають 50 мл відібрану пробу культуральної рідини. В пробу підливають 2-3 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Ретельно перемішують і ставлять на 30 хвилин в термостат при 37 °С. У присутності кислоти відбувається гідроліз крохмалю на моносахарид глюкозу.

Через 30 хвилин колбу виймають з термостату, нейтралізують 10% розчином соди, беруть 1 мл нейтралізованого розчину і проводять реакцію Фелінга. Випадає цегляно-червоний осад міді.

Крім того, на крохмаль проводять якісну реакцію з I_2 в КІ.

В основу перманганатного методу Бертрана покладаючи визначення масі оксиду одновалентного купруму Cu_2O , який випав в осад при взаємодії реактиву Фелінга з редукуючими цукрами. Маса облогу визначається методом взаємодії його з сполуками трьохвалентного феруму (шляхом титрування розчин перманганату калію).

Суть методу. Метод заснований на відновленні цукрами двухвалентної міді з розчину Фелінга до одновалентного оксиду міді. Виділений осад Cu_2O розчиняють в кислому розчині сульфату заліза (3+) і утворюється при цьому

еквівалентну кількість сульфату заліза (2+) титрують розчином перманганату калію.

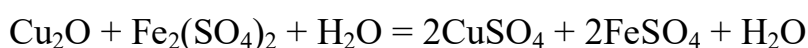
Техніка визначення. Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

У конічну колбу послідовно вносять по 20 мл розчинів Фелінга I і II, розчини змішують, потім доливають 20 мл фільтрату, отриманого з культуральної рідини. Вміст колби перемішують і нагрівають до кипіння, кип'ятять протягом 3 хв, рахуючи від появи перших бульбашок. Після цього колбу знімають з вогню, ставлять в похилому положенні для кращого осідання випавшого закису міді і гарячу рідину зливають з осаду закису міді на скляний фільтр №4 або азбестовий фільтр, спеціально приготовлений в скляній трубці.

Розчин фільтрують у колбу Бунзена при невеликому розрідженні, уникаючи по можливості попадання осаду на фільтр. Після зливання всієї рідини на фільтр колбу і фільтр промивають кілька разів гарячою дистильованою водою до зникнення лужної реакції промивних вод.

Щоб уникнути переходу закису міді в окис при зіткненні з повітрям осад під час фільтрування повинен перебувати під водою. Після закінчення промивання осаду водою фільтрат з колби Бунзена виливають, а колбу ретельно промивають спочатку водопровідною водою, потім споліскують дистильованою водою. У конічну колбу до осаду закису міді доливають невеликими порціями 20-30 мл розчину сірчаноокислого заліза, кожен раз зливаючи розчин на фільтр [34].

У присутності сірчаноокислого заліза осад закису міді відновлює еквівалентну кількість сірчаноокислого окису заліза в сірчаноокислу закись заліза, кількість якої визначається титруванням розчином перманганату калію який окислює його в сульфат заліза (III).





Після розчинення закису міді колбу і фільтр промивають кілька разів дистильованою водою, поєднуючи все промивні води в колбі Бунзена. Потім вміст колби титрують перманганатом до незникаючого слабо-рожевого забарвлення.

Кількість мілілітрів перманганату, який пішов на титрування, множать на титр, виражений по міді, і визначають число міліграмів міді. Потім за отриманим кількості міді знаходять відповідну кількість цукру і розраховують процентний вміст цукру (x) в досліджуваному продукті за формулою:

$$X_1 = \frac{GV \cdot 100}{g \cdot 20 \cdot 1000}$$

де G - кількість цукру, знайдене по таблиці, мг;

V - об'єм мірної колби, мл;

g - навішування досліджуваної речовини, г;

20 - кількість випробуваного розчину, мл [30].

9.6 Визначення протеолітичної активності протеази (модифікований метод Ансона).

Метод засновано на гідролізі білку казеїнату натрію препаратом фермента, який знаходиться в досліджуваному розчині з подальшою інактивацією фермента і осадженням негідролізованого білку трихлортовою кислотою (ТХО)

Протеолітична активність характеризує здатність ферментів каталізувати розщеплення білку до пептидів і амінокислот і виражається числом одиниць протеази в 1 г препарату [30].

За одиницю протеолітичної активності (ПС) приймають таку кількість ферменту, котра за 1 хв при температурі 30⁰С перетворює в не осаджений трихлортовою кислотою стан казеїнату натрію в кількості, яка відповідає 1 мкмоль тирозину (1 мкмоль тирозину дорівнює 0,181мг).

Активність протеази визначають при наступних значеннях рН:

2,5±0,2 – кисла протеїназа

3,5±0,2 – слабокисла протеїназа

7,2±0,2 – нейтральна протеїназа

9,5±0,2 – лужна протеїназа

Методика визначення

Для визначення ферментативної протеолітичної активності проводять ферментативний гідроліз при 1% концентрації білку-субстрату в розчині (після змішування розчину субстрату і розчину ферменту). Кількість взятого ферменту повинна бути так розрахована, щоб був присутній великій надлишок субстрату і щоб зміна величини оптичної щільності лежали в межах 0,07-0,85 для кислих протеаз і 0,20-0,60 – для нейтральних і лужних протеаз [34].

В дві пробірки наливають по 2мл субстрату і установлюють їх в ультратермостат з температурою 30⁰С. Приблизно через 10хв в кожную пробірку додають по 2мл розчину ферменту, пробірку струшують і залишають в ультратермостаті для гідролізу на 10хв при температурі 30⁰С. Через 10хв в обидві пробірки додають по 4мл 0,3 М розчину ТХО Cl₃ССООН, щоб перервати ферментативну реакцію і осадити білок та високомолекулярні продукти гідролізу.

Суміш швидко перемішують і для забезпечення повного осадження витримують при температурі 30⁰С ще 20хв. Потім фільтрують через маленькі лійки з паперовими фільтрами в сухі пробірки.

Фільтрат повинен бути зовсім прозорим. Відбирають в чисті пробірки по 1мл фільтрату, додають по 5мл 0,5 М розчину карбонату натрію Na₂CO₃, перемішують і швидко додають при безперервному перемішуванні по 1мл робочого розчину реактиву Фоліна і витримують протягом 20хв. Після

реакції розчини приймають голубе забарвлення, інтенсивність якого вимірюють на фотоелектроколориметрі.

Одночасно готують контрольну пробу, приливаючи реактиви в зворотній послідовності: до 2мл ферментного розчину того ж розведення, як і в основному аналізі додають 4мл ТХО Cl_3CCOOH , витримують в ультратермостаті при 30°C 10хв, а потім вносять 2мл субстрату. Через 20хв розчин фільтрують, відбирають в суху пробірку 1мл фільтрату, а потім при перемішуванні вносять 5мл 0,5 М розчину карбонату натрію Na_2CO_3 та 1мл робочого розчину реактива Фоліна. Контрольна проба повинна мати слабке голубе забарвлення.

Оптичну густина аналізуемого розчину визначають по відношенню до контрольної проби на фотоелектроколориметрі при довжина хвилі 656-670 нм в кюветах товщиною поглинаючої стінки світло шару 10мм.

9.7 Визначення білку за методом Лоурі

Метод оснований на реакції білків з реактивом Фоліна, який дає синє забарвлення. Метод використовують для визначення в розчинах білку з концентрацією від 10 до 100 мкг [34].

Методика проведення

До 0,4 мл розчину білку додають 2 мл розчину С. Суміш перемішують і через 10 хв приливають до неї 0,2 мл робочого розчину Фоліна. Інтенсивність забарвлення визначають на фотоелектроколориметрі з червоним світлофільтром (або на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм) через 30 хв. Кількість білка знаходять по калібрувальному графіку [30].

Побудова калібрувального графіка

Для побудови графіка 100 мг чистого білку (сироваткового γ - глобуліну, або кристалічного альбуміну і т.п.) розчиняють в 100 мл 0,1 н. розчину NaOH (1мл приготовленого розчину містить 1 мг білку).

Приготовлений розчин розливаємо в 10 мірних колб на 100 мл, починаючи з 1 і закінчуючи 10 мл. Розчини в колбах доводять дистильованою водою до мітки і перемішують. З кожної колби відбирають по 0,4 мл приготовлених розчинів і додаємо по 2 мл розчину С. Суміш перемішують і через 10 хв. додають 0,2 мл робочого розчину Фоліна і колориметрують[34].

По одержаним даним будують калібрувальний графік

9.8 Просіювання протосубтіліну

Просіювання. Подрібнений протосубтілін необхідно просіювати крізь визначені сита. Мета цієї операції – одержання продукту з однаковим розміром часток, що досягається за допомогою ситового аналізу.

Необхідно дотримуватися умови, щоб речовини, що подрібнюються, не взаємодіяли з матеріалом сита і не змінювали свого складу. Результат просіювання прямо залежить від тиску, під яким проходить порошок, від величини отворів сита, а також від тривалості і сили, з якими проводиться просіювання. Тому при просіюванні необхідно враховувати вплив зазначених факторів і проводити цей процес не дуже швидко, ретельно перемішуючи порошок[34].

50,00 г протосубтіліну просівають на лабораторних ситах 0.25 мм. Встановлюють наступний порядок просіювання: ставлять піддон, над ним - одне або два сита, передбачені нормативно-технічною документацією на препарат.

Верхнє сито закривають кришкою і зміцнюють весь набір сит на платформі розсіву, після чого включають мотор.

Для очищення сит при просіюванні застосовують гумові кружечки, які поміщають на сито в кількості 5 шт. Через 8 хв просіювання припиняють, злегка постукують по обичайок сит і знову продовжують просівати протягом 2 хв. Після просіювання гумові кружечки видаляють[34].

9.9 Визначення вологи

Метод заснований на висушуванні досліджуваного препарату до постійної маси при температурі 105 ° С.

проведення аналізу

У попередньо висушену до постійної маси бюксу поміщають 1,000-2,000 г препарату і щипцями ставлять в сушильну шафу на 2 ч, після чого бюксу закривають кришкою, охолоджують в ексікаторі і зважують. Наступні зважування проводять через кожну годину висушування навішування до постійної маси.

Маса вважається постійною, коли різниця між двома наступними зважуваннями не перевищуватиме 0,005 г.

3.5.4. Опрацювання результатів

Масову частку вологи (W) у відсотках обчислюють за формулою

$$W = \frac{(m_2 - m_3) \cdot 100}{m_2 - m_4} , (2)$$

За остаточний результат випробування приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, відносно розбіжність між якими не повинно перевищувати 0,25%.

Результат округлюють до першого десяткового знака[34].

найменування показника	Норма для груп			метод аналізу
	I	II	III	
Зовнішній вигляд і колір	Порошок від світло-бежевого до світло-коричневого			За <u>ГОСТ 20264.1</u>
Масова частка вологи,%, не більше	10			За <u>ГОСТ 20264.1</u>
Масова частка залишку після просіювання на ситі з дротяної сітки N 025,%, не більше	10			За <u>ГОСТ 20264.1</u>
Протеолітична активність (ПС), од / г	70 ± 7	120 ± 12	250 ± 25	За <u>ГОСТ 20264.2</u>
Нешкідливість в тест-дозі	нешкідливий			за 5.2

9.10 Визначення зовнішнього вигляду і кольору протосубтіліну

3,00 г досліджуваного препарату поміщають на гладку чисту поверхню аркуша білого паперу і візуально визначають зовнішній вигляд і колір, перемішуючи при природному світлі [34].

Карта постадійного контролю біосинтезу протеази

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
К _x 1.1.1 Підготовка робочого розчину Каустичної соди	Концентрація розчину каустичної соди	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 2 %
К _x 1.1.2 Приготування робочого розчину Гембару	Концентрація розчину Гембару	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 0,5 %
К _т , К _м 1.2.1, 1.2.2 Підготовка виробничих приміщень	М/б чистота поверхонь виробничих приміщень (стіни, підлога, двері)	Змиви тампонами або метод відбитків	Після прибирання	В змивах з площею 10 x 10 см допускається ріст не більше 50 м м/о (бактерій і грибів сумарно);

<p>К_Т1.3.1, 1.3.2</p> <p>Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій</p>	<p>Обладнання та комунікації, температура</p>	<p>Термометр технічний, годинник</p>	<p>Під час проведення миття</p>	<p>t = 40 °С, τ = 30 хв</p>
<p>К_Т1.3.3, 1.3.4</p> <p>Технологічний контроль герметичності обладнання</p>	<p>Обладнання та комунікації, тиск</p>	<p>Датчик</p>	<p>Після миття та ополіскування обладнання</p>	<p>P=0,01 МПа, τ = 1 год</p>
<p>К_Т, К_М 1.3.5</p> <p>Стерилізація обладнання</p>	<p>Обладнання, режим стерилізації вузлів, тиск, температура, мікробна контамінація.</p>	<p>Манометр, термометр м/б метод, висіви на чашки Петрі</p>	<p>Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу.</p>	<p>p = 0,003, 0,005 Мпа, t = 130°С, τ = 1 год</p>

<p>К_Т2.2</p> <p>Попереднє грубе очищення</p>	<p>Повітря, ступінь чистоти</p>	<p>Часточки бруду; манометр</p>	<p>Пезперервно при подачі повітря</p>	<p>E = 90%</p>
<p>К_Т2.3</p> <p>Компресування повітря</p>	<p>Повітря, температура, тиск стиснення повітря</p>	<p>Термометр, мономент технічний</p>	<p>Після компресування повітря</p>	<p>p = 0,35 Мпа, t = 120-250 °С</p>
<p>К_Т2.4</p> <p>Охолодження повітря</p>	<p>Повітря, температура</p>	<p>Темометр технічний</p>	<p>Після охолодження повітря</p>	<p>t = 25-40°С,</p>

К _Т 2.5 Видалення зайвої вологи	Вологість повітря	Психромет-ричний метод	Видалення зайвої вологи	W=60-70%
К _Т 2.6 Нагрівання повітря	Повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання	t = 35°C
К _Т 2.7 Очищення на головному фільтрі	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у головному фільтрі	E = 96 %
К _Т 2.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Повітря, тупінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 99%
К _Т 3.1 Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 5л.	температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, p = 0,15 МПа, τ = 40 хв,

<p>К_Т3.2</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора о'бємом 50л.</p>	<p>температура, час, стерильність</p>	<p>технічні ваги</p>	<p>мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$,</p>
<p>К_Т3.3</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора о'бємом 500л.</p>	<p>температура, час, стерильність</p>	<p>технічні ваги</p>	<p>мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$,</p>
<p>К_Т3.4</p> <p>Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора о'бємом 5000л.</p>	<p>температура, час, стерильність</p>	<p>технічні ваги</p>	<p>мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$,</p>

<p>Кт 4.1.1</p> <p>Приготування та стерилізація поживного середовища</p>	<p>Композиція А, Б</p> <p>температура, час, стерильність</p>	<p>технічні ваги</p>	<p>мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$V=750\text{мл}$,</p> <p>$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$,</p> <p>$p = 0,05\text{ МПа}$,</p> <p>$\tau = 30\text{ хв}$,</p>
<p>Кт, 4.2.1</p> <p>Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного борошна</p>	<p>Композиція А,</p> <p>температура, час, стерильність</p>	<p>технічні ваги</p>	<p>мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$,</p> <p>$\tau = 15\text{ хв}$,</p>
<p>Кт, 4.2.2</p> <p>Приготування та стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А,</p> <p>температура, час, стерильність</p>	<p>технічні ваги</p>	<p>мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$,</p> <p>$p = 0,05\text{ МПа}$,</p> <p>$\tau = 30\text{ хв}$,</p>

Кт, 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$,
Кт, Км 4.3.1 Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного борошна	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визна-чається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 15\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визна-чається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,05\text{ МПа}$, $\tau = 30\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визна-чається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти

<p>КТ, Км 4.4.1</p> <p>Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного борошна</p>	<p>Композиція А, температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор</p>	<p>Тиск визна-чається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 80 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 15 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p>КТ, Км 4.4.2</p> <p>Приготування та стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А, температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Манометр технічний, м/б контроль об'ємний дозатор</p>	<p>Тиск визна-чається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 112 \text{ }^\circ\text{C}$, $p = 0,05 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відс. мікробіоти</p>
<p>КТ, Км 4.4.2</p> <p>Приготування та стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Манометр технічний, м/б контроль об'ємний дозатор</p>	<p>Тиск визна-чається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$, $p = 0,15 \text{ МПа}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відс. мікробіоти</p>

<p>Кт4.5.1</p> <p>Заварювання соєвого борошна та кукурудзяного борошна</p>	<p>Композиція А, температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор</p>	<p>Тиск визна-чається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 15\text{ хв}$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.5.2</p> <p>Приготування та стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А, температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Манометр технічний, м/б контроль об'ємний дозатор</p>	<p>Тиск визна-чається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 10\text{ хв}$, відс. мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.5.2</p> <p>Приготування та стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Манометр технічний, м/б контроль об'ємний дозатор</p>	<p>Тиск визна-чається під час стерилізації,м/б контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 10\text{ хв}$, відс. мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 5.1.</p> <p>Підтримання колекційної культури</p>	<p>Температура, час, асептичність</p>	<p>Термометр технічний, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури</p>	<p>$t = 3-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 3-4$ місяці, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Км, Кт 5.2.</p> <p>Одержання робочої культури на агаризовному середовищі</p>	<p>Температура, час, асептичність</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, час і зовнішній вигляд визначається під час виробничого процесу. Мікробіологічний контроль по закінченню процесу</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.3</p> <p>Вирощування культури в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Після вирощування культури в колбах на качалках</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $w=240$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 5 л.</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $w=180$ об/хв. МПа, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 50 л.</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $w=180$ об/хв., $R_n=0,02$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 500 л.</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу</p>	<p>$t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $w=180$ об/хв., $P_n=0,02$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 6.1. Виробниче культивування</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість культивування швидкість перемішування, активність ксиланази, рН, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, годинник, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, рН метр, колориметричний метод</p>	<p>Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 8 год</p>	<p>$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60$ год, $w=180$ об/хв., $P_n=0,02$ МПа, $A=320$ од/мл, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Кт 7 Відділення біомаси від супернатанту	Температура КР, Оберти мішалки, Оберти центрифуги, Час центрифугування	Термометр технічний Тахометр технічний Годинник	Під час процесу та перед початком	T = 750C n1 = 100 об /хв n2 = 2000 об /хв t = 18-25 хв
Кт 9 Концентрування	Температура випарювання Тиск	Термометр технічний Барометр вакуумний	Під час проведення технологічного процесу	T = 50 0C P = 0,2-0,3 МПа
Кт 10 Сушіння концентрату	Температура Подача розчину Вологість продукту	Термометр технічний, годинник Датчик продуктивності Фізичний метод	Під час проведення технологічного процесу	T = 65 0C p = 7-8л /хв w = 5-6%
Кт 11 Пакування у мішки	Маса наважки для пакування Продуктивність	Ваги Датчик продуктивності	Перед початком процесу	m = 400 г p = 25 шт /хв

Кт 12 Перевірка на герметичність	Наявність документації та кількість мішків на палеті	Візуальний контроль	Після та під час процесу пакування	t- 0,5 год P= 0.1-0,2 мПа
--	--	---------------------	---------------------------------------	------------------------------

РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОЇ ДІЛЯНКИ З ФОРМУВАННЯМ ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Процеси культивування мікроорганізмів проводяться в багатофазних гетерогенних системах з використанням багатокомпонентних живильних середовищ в умовах складних біохімічних механізмах регуляції росту біомаси, синтезу метаболітів та можливістю протікання процесів в автокатолітичному режимі, що і призводить до гострої необхідності автоматичного регулювання цих процесів. Застосування автоматичних контрольно-вимірвальних пристроїв дозволить забезпечити високу якість мікробіологічної продукції, котра повинна відповідати міжнародним стандартам якості [31, 33, 34].

Основним завданням виробничої ферментації є отримання якісної продукції з низькою собівартістю. Для забезпечення оптимальних умов та інтенсифікації процесу, крім ферментера, ділянка автоматизації включає в себе реактори для приготування розчину солей хлориду кальцію дигідрату, сульфату манію дигідрату, заварювання та стерилізації кукурудзяного та соєвого борошна та піногасника [35, 36, 39].

Отже, в результаті аналізу технологічного процесу встановлено, що автоматизація даної виробничої ділянки повинна забезпечувати:

1. В об'ємно-ваговому дозаторі контролюють масу сипких компонентів і об'єм рідин;
2. В реакторі-змішувачі для заварювання кукурудзяного та соєвого борошна проводять контроль і управління рівня рідини, контролюють тиск, контролюють і регулюють як температуру

					НУХТ БТЕК 04.02.20. ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Закрасняний А.О			РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОЇ ДІЛЯНКИ З ФОРМУВАННЯМ ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ	Літ.	Арк.	Аркушів
Консультант		Клименко О. М.						
Керівник		Пенчук Ю. М.				Кафедра БТМ¹⁸		
Зав.кафедри		Пирог Т.П.						

3. стерилізації, так і температуру розчину в реакторі, а також контроль і регулювання інтенсивності перемішування[37, 38].

4. Контроль і управління рівнем рідини, а також контроль і регулювання інтенсивності перемішування забезпечують для реактора-змішувача приготування розчину солей.

5. У виробничому ферментері проводять контроль і управління рівнем рідини та витрати повітря на аерацію середовища в ході культивування; контролюють і регулюють наступні показники – рН, температуру стерилізації/біосинтезу, швидкість обертів мішалки і окремо контролюють тиск в апараті під час стерилізації (0,15 МПа) [39].

ЗАВДАННЯ НА РОЗРОБКУ СИСТЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЧОЇ ФЕРМЕНТАЦІЇ

№ з.п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
Д-1	Об'ємно-ваговий дозатор для всіх апаратів	Сипучі компоненти	$317 \pm 0,5$ г	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Об'єм рідин	$250 \pm 0,1$ л	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
Р-2	Реактор-змішувач для заварювання кукурудзяного та соєвого борошна об'ємом 20 м ³	Рівень рідини	$1,2 \pm 0,1$ л	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Захист від переповнення	Вплив на подачу води
		Температура стерилізації Температура середовища	$112 \pm 0,1$ °С $40 \pm 0,1$ °С	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
		Тиск стерилізації	0,15 МПа	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
		Інтенсивність перемішування;	300 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
Регулювання	Захист від переповнення			Вплив на кількість обертів/хв і кнопка «Стоп» по місцю		

Р-3	Реактор-змішувач для приготування солей	Рівень рідини	1000 л	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Регулювання	Захист від переповнення	Вплив на подачу води
		Інтенсивність перемішування	300 об/хв	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів/хв і кнопка «Стоп» по місцю
ФР-6	Виробничий ферментер об'ємом 5м3	Рівень рідини:	2300 л	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Управління	Захист від переповнення	Вплив на подачу води
		рН: середовища	7-	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
		Температура: Стерилізації Біосинтезу	131±0,1°С 37°С	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
		Тиск стерилізації	0,15 МПа	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
		Інтенсивність перемішування	300 об/хв	Контроль	Відображення Реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість

						обертів мішалки за хвилину і кнопка «Стоп» по місцю
		Витрати повітря	1 м ³ /(м ³ ПС ×год)	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Управління	Ручне/дистанційне управління	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
Н-7	Насос	Режим роботи насосу	Включено/виключено	Управління	Захист від переповнення збірника	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю

ОПИС ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ СХЕМИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

У першому контурі відбувається контроль і реєстрація подачі регламентованої кількості і об'ємів речовин для Р-2, Р-3, на об'ємно-ваговому дозаторі (поз. 1а).

У другому контурі здійснюється контроль та регулювання перемішування компонентів за допомогою мішалки, яка приводиться в дію мотором (М). Частота обертів мотора мішалки регулюється виконавчим механізмом (поз. 2а). Спостереження за зміною частоти обертів здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB1).

У третьому контурі здійснюється контроль та регулювання тиску, який має регламентоване значення 0,15 МПа. за допомогою датчика (поз. 3а). Спостереження за зміною тиску передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Сигналізація про відхилення значення або досягнення заданого значення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога.

У четвертому контурі здійснюється контроль та регулювання температури датчиком температури (поз. 4б). Регулюють температуру в реакторі (подачею пари/води) виконавчими органами (поз. 4в, 4д) за допомогою електропневмоперетворювачів (поз. 4б, 4г).

У п'ятому контурі відбувається управління подачі стерильного середовища до ФР-4 регуляцією виконавчого органу (поз. 5б) за допомогою електропневмоперетворювача (поз. 5а).

У шостому контурі контролюють рівень рідини в апараті Р-2 за даними датчиків рівня (поз. 6а, 6б). Спостереження за наповненням апарату здійснюється на АРМі оператора. Контроль відбувається на ПК (поз. 6в) При переповненні реактора передбачається звукова сигналізація.

У сьомому контурі контролюють рівень рідини в апараті Р-3 за даними датчиків рівня (поз. 7а, 7б). Спостереження за наповненням апарату здійснюється на АРМі оператора. Контроль відбувається на ПК (поз. 7в) При переповненні реактора передбачається звукова сигналізація.

У восьмому контурі здійснюється контроль та регулювання перемішування компонентів за допомогою мішалки, яка приводиться в дію мотором (М). Частота обертів мотора мішалки регулюється виконавчим механізмом (поз. 8а). Спостереження за зміною частоти обертів здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB2).

У дев'ятому контурі відбувається управління подачі не стерильного середовища до ФР-4 регуляцією виконавчого органу (поз. 9б) за допомогою електропневмоперетворювача (поз. 9а).

У десятому контурі для ферментера ФР-4 контролюють температуру датчиком температури (поз. 10а). Регулюють температуру в реакторі (подачею пари/води) виконавчими органами (поз. 10в, 10д) за допомогою електропневмоперетворювачів (поз. 10б, 10г).

В одинадцятому контурі контролюють концентрацію іонів H^+ , що є показником кислотності або лужності середовища. Показники з первинного датчика (поз. 11а) поступають на перетворювач (поз. 11б) і на АРМ-оператора. Всі дані реєструються і зберігаються в архіві.

У дванадцятому контурі здійснюється контроль та регулювання тиску, який має регламентоване значення 0,15 МПа. за допомогою датчика (поз. 12а). Спостереження за зміною тиску передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін у його архіві. Сигналізація про відхилення значення або досягнення заданого значення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога.

У тринадцятому контурі здійснюється контроль та регулювання перемішування компонентів за допомогою мішалки, яка приводиться в дію мотором (М). Частота обертів мотора мішалки регулюється виконавчим механізмом (поз. 13а). Спостереження за зміною частоти обертів здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB3).

У чотирнадцятому контурі контролюють рівень середовища у Фр-4. При досягненні верхнього або нижнього рівнів спрацьовують відповідні датчики (поз. 14а, 14б). Сигнал від датчика подається на сигналізатор рівня (поз. 14в). Сигналізація про досягнення верхнього та нижнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

У п'ятнадцятому контурі контролюють подачу піногасника XIAMER коли рівень рідини доходить до датчика (поз. 15а) рівня верхньої межі за допомогою електропневмоперетворювача (поз. 15б).

У шістнадцятому контурі контролюють показник розчиненого в середовищі кисню датчиком рO₂ (поз. 16а). Показники виводять на АРМ оператора-технолога з перетворювача (поз. 16б).

У сімнадцятому контурі необхідно управляти роботою двигуна насоса подачі культуральної рідини з ферментера у збірник культуральної рідини.

У контурі передбачається: управління з АРМа оператора включенням/відключенням насосу; аварійне відключення насосу кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса.

Подача напруги на двигун насоса здійснюється за допомогою магнітного пускача КМ1. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB4).

СПЕЦИФІКАЦІЯ НА ПРИЛАДИ ТА ЗАСОБИ АВТОМАТИЗАЦІЇ

№	№ позиції	Найменування і технічна характеристика засобу	Тип, модель	Виробник
1	1а	Ваговий дозатор, межа дзування 50-1000 г, клас точності по ДСТУ 10223-97, електроживлення 220 В, 50 Гц	ДВА-1	Асвік-Центра (Україна)
2	2а, 8а, 13а	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В	VFD007EL21A	Delta Electronics
3	3а, 12а	Диференційний перетворювач тиску, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, під'єднання – 1/2NPT, клас точності – 0,075, вихідний сигнал аналоговий	PAD	Kobold
3	4а, 10а, 15а	Датчик термперетворювач опору ТСП, НСХ-Pt100, діапазон (0 – 150)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	TSM-0193-01	ЧТП “Теплоприбор” (Росія)
4	4б, 4г, 10б, 10г, 15б	Електро-пневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwer серія 2700	СВ Альтера (Україна)
5	4в, 4д, 10в, 10д	Електропневматичний перетворювач, вхідний сигнал 4...20мА, вихідний сигнал 20...100кПа	2713WP	Dwyer
6	5б, 9б, 14а, 14б	Поплавковий датчик рівня діапазон робочих температур -60...+125°С, густина робочого середовища $\geq 0,66$ г/см ³ , з уніф. вих. сигнал 4...20 мА, матеріал – нержавіюча сталь 12Х18Н10Т	ПДУ-И	ОВЕН (Україна)
7	5а, 9а	Регулюючий пневматичний клапан, управляючий сигнал 20-100 кПа	3244-1	Samson (Німеччина)
8	16а	Датчик розчиненого кисню в середовищі, діапазон вимірювань 0,05...20,0 мг/л, датчик аналоговий закритого типу, матеріал – POM	Охумах COS41	Endress+Hauser (Росія)

9	166	Перетворювач розчиненого кисню , підключення IP65, вхідний сигнал 1-канальний перетворювач, вихідний сигнал 0/4-20 мА	Liquisys COM223	Endress+Hauser (Росія
10	11a	Датчик рН, діапазон вимірювання 0...14, матеріал – скло/кераміка, робоча температура 0...140 °С, робочий тиск – макс 7 бар	Memosens CPS171D	Endress+Hauser (Росія
11	116	1-/2-канальний перетворювач для рН-метра Memosens, матеріал – полікарбонат, робоча температура -20...60 °С, ступінь захисту IP67, вхідний сигнал – 2 входи 0/4...20 мА (опція) або 2 цифрових входи (опція), вихідний сигнал – 2...4 токових виходи 0/4...20 мА	Liquiline CM442	Endress+Hauser (Росія
12	KM1	Магнітний пускач, робочий струм 7А, управляючий сигнал 220 В	3RT2015- 1AP01	SIEMENS
13	SB1 SB2 SB3 SB4	Двоклавішна кнопочка станція «Пуск»-«Стоп»	8LP2T B7113	Lovato

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Агро Час Тваринництво Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://agrotimes.ua/article/majbutne-kormovih-fermentiv/>
2. Протосубтілін. Sibbio.ru [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.sibbio.ru/catalog/ptitsevodstvo/protosubtilin/>
3. Пат. № 2303066, С12N9/56, С12N1/20. Штамм бактерій *bacillus licheniformis*-продуцент щелочної протеазы/ Цурикова Н. В., Нефедова Л. И., Окунев О.Н., Сеницын А. П., Черноглазов В. М., Воейкова Т. А., Костылева Е. В. – Опубл. 20.07.2007.
4. Пат. № 2272838 РФ С12N9/14, С12N1/20. Штамм бактерії *bacillus macerans* bs-04 - продуцент пектиназ, протеазы, ксиланазы и амилазы./Полетаева О. А.Шишкова Э. А. Бравова Г. Б. Нестеренко Е. А. Бурмистрова В. В. – Опубл. 13.05.2016.
5. Пат. №2208633 РФ С12R1/125, С12N1/20, С12С-С12Q. Штамм *bacillus subtilis* p-1 - продуцент протеазы/ Т.Н. Кузнецова, Р.С. Нафиков, М.М. Алсынбаев, В.Ф. Кулагин. – Опубл. 19.10.1998
6. GBIF | Global Biodiversity Information Facility [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.gbif.org/ru/species/111216981/verbatim>
7. ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://ena.lp.edu.ua:8080/bitstream/ntb/26181/1/2001-3-42-47.pdf>
8. ПрАТ «Оріль-Лідер». [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.mhp.com.ua/ru/operations/chao-orelj-lider>
9. Мосичев М.С.Общая технология микробиологических производств: учеб. / М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов – М.: Лёгкая и пищевая промышленность, 1982. – 264 с.
10. Грачёва И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачёва, А.Ю. Кривова. – М.: Элеватор, 2000. – 512 с.
11. Вимоги до санітарного стану підприємств [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://medbib.in.ua/sanitarnyie-trebovaniya-myityu.html>

12. Описание основных технологий производства протеази. Abercade consulting [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.abercade.ru/research/analysis/5623.html>
13. Пирог, Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. – К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
14. Синицын А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. / А. П. Синицын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов – М. :Изд-во МГУ, 1995. – 224с.
15. Грачёва И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачёва, А.Ю. Крявова. – М. :Элеватор, 2000. – 512 с.
16. Дезцентр+ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://dezmed.com.ua/ru/instruktsiia/item/dezaktin-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu>
17. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.
18. Біотехнічне обладнання [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.marazm.org.ua/e-shop/oxorona_praci/other44-64_zhurnal-perevirky-tehnologichnogo-obladnannja-ta-gazoprovodiv-na-germetychnist.html
19. Препарат ферментный протосубтилин Г3х. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200023353>
20. Забор – атмосферный воздух. Большая Энциклопедия Нефти и Газа. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ngpedia.ru/id20748p1.html>
21. Наказ від 14.12.2001 № 502 Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів.
22. Барабанный вакуум-фильтр. FindPatent.com.ua. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://findpatent.com.ua/patent/207/2070417.html>
23. Проект автоматического фильтра-пресу ФПАКМ для фильтрования культуральной среды. Библиофонд. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.bibliofond.ru/view.aspx?id=699278>

24. Фильтр-прессы. НПК «ПСМ». [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://hydrotrend.ru/filter-press/fpakm>
25. Випарювання. StudFiles. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.studfiles.ru/preview/5199040/>
26. Сушарки-аерофонтанні (флеш-сушарки). Perryvidex. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://perryvidex.eu/ua/dryers/dr550-dryer-flash>
27. Стасевич М.В. Технологічнеобладнанняфармацевтичної та біотехнологічної промисловості / М.В.Стасевич, А.О. Миляннич, Л.С.Стрельников та ін. – Львів : «Новий світ – 2000», 2017. – 410 с.
28. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудованиемикробиологическихпроизводств. – М.: Агропромиздат, 1987
29. Центрифуга відстійна ОГН-90-3Т-3 [Электронный ресурс] – режим доступа:http://frunze.com.ua/wp-content/uploads/2016/03/sumy_npo_centrifuges_catalog_ru.pdf
30. Вакуум-випарний апарат [Электронный ресурс] – режим доступа:<https://ub.ua/market/view/679976/all/vakuum-vyparnoy-apparat-mzs-320/>
31. Розпилювальна сушарка [Электронный ресурс] – режим доступа:https://knowledge.allbest.ru/manufacture/2c0a65635a3bd68b5d43a88421206d37_0.html
32. Пакувальний апарат [Электронный ресурс] – режим доступа:<http://ua.moohamachinery.net/packaging-machine/vertical-packing-machine/automatic-auger-milk-washing-powder-weighing.html>
33. Фермент степень очистки. Справочник химика 21. [Электронный ресурс] – режим доступа: <http://chem21.info/info/629954>
34. Препараты ферментные. Методы определения органолептических, физико-химических и микробиологических показателей [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200023407>
35. Проць Я.І., Савків В.Б., Шкодзінський О.К., Ляшук О.Л. Автоматизація виробничих процесів. Навчальний посібник для технічних

спеціальностей вищих навчальних закладів. – Тернопіль: ТНТУ ім. І.Пулля, 2011. – 344с.

36. Значення автоматизації в організації виробничого процесу. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://allref.com.ua/uk/skachaty/Znachennya_avtomatizaciyi_v_organizaciyi_virobnichogo_procesu?page=1

37. М.М. Благовещенская, Н.О. Воронина, А.В. Казаков Автоматика и автоматизация пищевых производств. – М: Агропромиздат. – 1991. –239 с.

38. Автоматизація. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://elprivod.nmu.org.ua/ua/entrant/%D0%90%D0%B2%D1%82%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20ua.pdf>

39. Конспект лекцій з дисципліни «Контроль та керування біотехнологічними процесами » для здобувачів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 72 с.

ДОДАТКИ

FREEPATENT

ПАТЕНТНИЙ ПОШУК |

штам бактерій *Bacillus licheniformis*-продуцент лужної протеази

Класи МПК:	C12N9 / 56 <i>Bacillus subtilis</i> або <i>Bacillus licheniformis</i> C12N1 / 20 бактерії; поживні середовища для них	
Автор (и):	Цурикова Ніна Василівна (RU), Нефедова Лідія Іванівна (RU), Окунев Олег Миколайович (RU), Синіцин Аркадій Пантелеймонович (RU), Черноглазов Володимир Михайлович (RU), Воейкова Тетяна Олександрівна (RU), Костильова Олена Вікторівна (RU)	
Власник патенту (і):	Товариство з обмеженою відповідальністю Науково-виробнича компанія "Фермтек" (RU)	
пріоритети:	подача заявки: 2005-11-14	публікація патенту: 20.07.2007

Винахід відноситься до галузі біотехнології і може бути використано в мікробіологічній промисловості для виробництва ферментних препаратів протеаз, що застосовуються в різних галузях промисловості і сільського господарства, де потрібно гідроліз білкових речовин. Штам *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2366Д отриманий з штаму *B. licheniformis* ВКМ В-2184Д з використанням багатоступінчастої генетичної селекції із застосуванням ультрафіолетового опромінення з одночасним впливом хімічних мутагенів. Протеазна активність в культуральній рідині на 60 год досягається 320 од / мл. Активність сухого спіртоосажденного препарату лужної протеази становить 1600 од / г. Винахід забезпечує можливість отримання високоактивних ферментних препаратів лужної протеази.

Винахід відноситься до галузі біотехнології і може бути використано в мікробіологічній промисловості для виробництва ферментних препаратів протеаз, що застосовуються в різних галузях промисловості і сільського господарства, де потрібно гідроліз білкових речовин.

Протеази (протеолітичні ферменти) застосовуються у виробництві миючих засобів (для видалення білкових забруднень); в текстильній промисловості для обробки виробів з вовни, шовку і шкіри і поліпшення їх споживчих властивостей, для Обезволашіваніе шкір при виробництві шкіри; в різних галузях харчової промисловості для отримання білкових гідролізатів, для м'якшення м'яса і риби, для отримання клеїв; в сільському господарстві - в якості кормової добавки, а також для утилізації пір'я і отримання з них кормових продуктів.

Відомі різні мікроорганізми - продуценти лужних протеаз і способи їх культивування в аеробних умовах. Вибір штаму-продуцента визначається його здатністю забезпечити високий рівень активності протеаз в ферментаційній середовищі, швидкістю їх біосинтезу, виходом ферменти з одиниці маси використовуються для ферментації субстратів, а також вартістю цих субстратів.

Bacillus licheniformis-60 депонований у Всеросійській колекції мікроорганізмів при Інституті біохімії і фізіології мікроорганізмів ім. Г.К.Скрябіна РАН під № ВКМ У-2366 Д.

Штам *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ У-2366 Д отримано з використанням багатоступінчастої генетичної селекції із застосуванням методів ефективного мутагенезу - ультрафіолетового опромінення з одночасним впливом хімічних мутагенів з штаму *Bacillus licheniformis*-78 ВКМ В-2184Д.

Умови зберігання. Штам може зберігатися в ліофілізованому стані протягом декількох років на одвірках з агаризованому середовищем наступного складу: м'ясо-пептони бульйон і солодове сусло (7 ° С) у співвідношенні 1: 1; казеїн 1,0%; агар-агар - 2,5%; рН середовища 7,5; з обов'язковим пересівом не рідше одного разу на 2 місяці на цю ж середу.

Культурально-морфологічні ознаки штаму.

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

На м'ясо-пептонном агарі (37 ° С, 24 години) штам дає нормальний ріст клітин, колонії неправильної форми з піднятим центром, слизові, гладкі, непрозорі, 2-5 мм в діаметрі, в процесі росту поступово набувають світло-коричневий пігмент.

На м'ясо-пептонном бульйоні (37 ° С, 24 години) штам дає нормальний ріст клітин, в процесі зростання серед мутніє, до 24 години росту з'являється світло-коричневий відтінок.

На агаризованому середовищі з казеїном або мікробними клітинами штам дає нормальний ріст і утворення зон гідролізу навколо колоній. Колонії неправильної форми, слизові, гладкі, непрозорі з піднятим центром, 3-5 мм в діаметрі, з рівними краями. До 72 годинах зростання виникають суперечки на всій поверхні колонії, колір суперечка - світло-коричневий, що переходить до 120-144 годинах зростання в темно-коричневий.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму

Аероб. Температурний діапазон зростання - 10-55 ° С. Оптимальна температура зростання - 37 ° С. Зростає при значеннях рН середовища - 5-10. Оптимум рН зростання - 7,3-7,8.

Культивування штаму *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ У-2366 Д здійснюють в аеробних умовах в погруженому стані при температурі 37 ° С протягом 48-72 годин, рН середовища 7,5-7,8. Для росту культури і біосинтезу протеази джерелом вуглецю та азоту можуть служити крохмаль, гідролізований крохмаль, кукурудзяна, соєва або інша зернова мука, або їх екстракти, дріжджові клітини, пептони, дріжджовий екстракт, казеїн, сечовина, амонійний азот.

Активність лужної протеази визначають за методом Ансона, модифікованому Е.Д.Каверзневої для комплексних ферментних препаратів протеаз, при рН субстрату 9,5; температурі 30 ° С, використовуючи казеїн як субстрат [Каверзнева Е.Д. «Стандартний метод визначення протеолітичної активності для комплексних препаратів протеаз». Прикл. биохим. мікробиол. 1980, т.7., Вип.2, с.225-228]. За одиницю активності лужної протеази приймається така кількість ферменту, яке призводить до утворення в об'єкті трихлороцтової кислотою стан кількість казеїну, що містить 1 мкмоль тирозину.

Ферментні препарати, отримані за допомогою пропонованого штаму, можуть бути використані у вигляді культуральної рідини, у вигляді рідких концентрованих препаратів, одержуваних за допомогою ультрафільтрації або упарювання культуральної рідини, або у вигляді сухих препаратів, одержуваних осадженням етанолом або іншими органічними розчинниками з ультрафільтрата культуральної рідини, а також висушуванням або гранулюванням.

Протеаза активна в широкому діапазоні рН - від 5,5 до 12,0 з оптимумом при рН 7-10,5 в діапазоні температури від 30 до 70 ° С, з оптимумом при 60-65 ° С.

Можливість використання винаходу ілюструється прикладами, які не обмежують обсяг і сутність домагань, пов'язаних з ними.

Приклад 1. Для отримання посівного матеріалу (інокулята) культуру бактерій *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366 Д вирощують на рідкому поживному середовищі складу: казеїн - 1%; м'ясо-пептони бульйон і солодове сусло в співвідношенні 1: 1, рН середовища 7,5. Культивування проводять в качалочних колбах, що містять 50 мл стерильної живильного середовища, на гойдалці з 240 об / хв при 37 ° С протягом 36-48 годин.

Отриманий посівний матеріал в кількості 0,3% до обсягу середовища вносять в качалочні колби об'ємом 750 мл, що містять 50 мл живильного середовища складу, г / л: кукурудзяна мука - 100, соєве борошно - 10, CaCO₃ - 2,5, MgSO₄ × 7H₂O - 2,5; рН середовища 7,5-7,8.

Культивування штаму здійснюють в аеробних умовах на гойдалці (240 об / хв) при температурі 37 ° С. Кожні 24 години, починаючи з 48 годин росту, відбирають проби, в яких визначають протеазний активність.

Протеазна активність в культуральній рідині на 60 годин росту становить 210 од / мл.

Приклад 2. Культивування здійснюють в качалочних колбах, як описано в прикладі 1, використовуючи рідку

7H_2 Про - 2,5; рН середовища 7,5-7,8.

Колби інкубують на гойдалці при 37°C і 240 об / хв протягом 60 годин. Протеазна активність в культуральній рідині становить 260 од / мл.

Приклад 3. Культивування здійснюють в качалочних колбах, як описано в прикладі 1, використовуючи рідку живильне середовище наступного складу, в г / л: кукурудзяна мука - 120, соєве борошно - 20, CaCO_3 - 2,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,5; рН середовища 7,5-7,8.

Колби інкубують на гойдалці при 37°C і 240 об / хв протягом 60 годин. Протеазна активність в культуральній рідині становить 280 од / мл.

Приклад 4. Проводять процес культивування в ферментере типу Анкум 2М з робочим об'ємом 6,0 л. Аерація становить 1 обсяг повітря на 1 об'єм середовища в ферментере. Ферментер інокулюють 500 мл виросла культури, отриманої через 36 год культивування на качалочних колбах

Культивування здійснюють в качалочних колбах, як описано в прикладі 1, використовуючи рідку живильне середовище наступного складу, в г / л: кукурудзяна мука - 120, соєве борошно - 20, CaCO_3 - 2,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,5; рН середовища 7,5-7,8.

Культивування здійснюють протягом 60 годин при 37°C , рН середовища 7,5-7,8, використовуючи склад середовища, як описано прикладі 3. Протеазна активність в культуральній рідині становить 320 од / мл.

Активність сухого препарату лужної протеази становить 1600 од / г.

Приклад 5. Культивування здійснюють в качалочних колбах, як описано в прикладі 3, використовуючи в якості продуцента вихідний штам *Bacillus licheniformis*-78 ВКМ В-2184D.

Колби інкубують на гойдалці при 37°C і 240 об / хв протягом 60 годин. Протеазна активність в культуральній рідині становить 45 од / мл.

Таким чином, запропонований штам *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366 Д має здатність продукувати лужну протеазу, що створює можливість отримання високоактивних ферментних препаратів лужної протеази.

Для досягнення високої продуктивності штаму не потрібно застосування складних і дорогих поживних середовищ. Для культивування можуть використовуватись поживні середовища, що традиційно застосовуються в промислових технологіях отримання такого роду ферментних препаратів.

Ферментні препарати, одержувані на основі запропонованого штаму, дозволяють істотно збільшити ефективність їх використання в різних областях біотехнології і, особливо, в якості кормових добавок.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Штам бактерій *Bacillus licheniformis*-60 ВКМ В-2366 Д (Всеросійська колекція мікроорганізмів при ІБФМ ім. Г.К.Скрябіна РАН) - продуцент лужної протеази.

Штам bacillus subtilis p-1 - продуцент протеази

Автори патенту:

Кузнецова Т.М.Нафік Р.С.Алсинбаев М.М.Кулагін В.Ф.C12R1 / 125 - Схема кодування для підкласів C12C-C12Q або C12S, що відносяться до мікроорганізмівC12N1 / 20 - бактерії, поживні середовища для них

Винахід відноситься до біотехнології, а саме до отримання нового штаму Bacillus subtilis P-1 - продуцента протеази з високою загальною і питомою активністю в культуральній рідині. Штам отриманий селекцією з штаму Bacillus subtilis 534 шляхом багаторазового пересіву через живильне середовище зі зростаючою концентрацією антибіотика. Розміри клітин (7-1,3) x ((0,5) мм, розташовані окремо або невеликими ланцюжками, утворюють внутрішні центральні суперечки овальної форми. Зростає на різних поживних середовищах. Аероб, грампозитивний, володіє рухливістю, оптимальні умови росту при температурі 37⁰ С і рН 6,0-7,5. Винахід забезпечує високий рівень синтезу протеази при скороченій тривалості культивування. 2 табл., 1 мул.

Винахід відноситься до біотехнології, зокрема до створення нового штаму, який використовується для отримання ферменту - протеази. Протеолітичні ферменти широко використовуються в медицині, в харчовій, сільськогосподарській, шкіряній промисловості та інших галузях народного господарства. Протеолітичні ферменти отримують в якості продуктів біосинтетической діяльності з грибів або бактерій. Однак бактерії використовувати краще, тому що вони мають більш швидкий цикл розвитку і синтезу протеази в порівнянні з грибами. У зв'язку з цим селекція нових бактеріальних штамів для отримання протеаз актуальна і в даний час.

Найбільш близьким до заявляється об'єкту є штам Bacillus subtilis ФУ-79, реєстраційний ЦМПМВ-1989 (1), один з найбільш сильних продуцентів протеази. Відомий штам може продукувати протеазу в кількості 14,7-30 ПЕ / мл, в залежності від живильного середовища, за 38 годин біосинтезу.

Недоліком цього штаму є тривалість процесу культивування - 38 годин, а також необхідність його вирощування на середовищах, в які входять нестандартні харчові компоненти - кукурудзяний екстракт, Осахаренний крохмаль, які підвищують вартість поживних середовищ, роблять їх менш стандартними, а також зникають питомою активність ферменту протеази в культуральній рідині, оскільки з ними вносяться додатковий білок.

Завданням винаходу є створення нового штаму Bacillus subtilis, здатного продукувати протеазу в промислових обсягах на синтетичній живильному середовищі.

Технічний результат, що отримується від використання нового штаму, полягає в отриманні ферменту - протеази з високою загальною і питомою активністю в культуральній рідині при скороченні тривалості процесу культивування.

Завдання вирішується створенням нового штаму шляхом селекції з відомого штаму Bacillus subtilis 534, реєстраційний ВКМВ-1666Д (2), здатного до швидкого зростання на простих за складом поживних середовищах.

Штам Bacillus subtilis 534 багаторазово пересівали через живильне середовище, що містить зростаючі концентрації антибіотика. Отриману популяцію антибіотикостійкими варіанту штаму висували моноспоровим расеевом на щільних середу з казеїном для виділення колоній, що володіють високою продукцією протеази. В результаті селекції виділено штам Bacillus subtilis P1, що володіє високою продукцією протеази на простих за складом синтетичних поживних середовищах.

Для підтвердження генетичних відмінностей вихідного штаму Bacillus subtilis 534 і селекціоновані штаму Bacillus subtilis P1 проведений аналіз геномного поліморфізму штамів Bacillus subtilis 534 і P1 методом кінцевого мчення рестрикційного фрагментів

радіоактивною міткою [α-³²P] дАТФ з подальшим поділом високовольтним секвенірують електрофорезом в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах (креслення). На радіоавтографі, представленому на кресленні, можна бачити велику кількість загальних

характеризується наступними властивостями.

Культурально-морфологічні властивості.

Вегетативні клітини-палички овоїдної форми з розмірами (7-1,3) x ((0,5) мкм, розташовані окремо або невеликими ланцюжками. Утворюють внутрішні центральні суперечки овальної форми. У популяції джугтики лофотрихіальніе і перитрихіально. Колонії на мясопептонном агарі плоскі, злегка блискучі, білого кольору з рівними краями. На мясопептонном бульйоні при температурі 37 °С через 18-24 год спостерігається рівномірне помутніння бульйону. Аероб, грампозитивний, володіє рухливістю, оптимальні умови росту при температурі 37 °С і рН 6,0-7, 5.

Біохімічні властивості.

Не зростає в анаеробних умовах, гідролізує сечовину і крохмаль, розріджує желатину. Дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера. Ферментує глюкозу, сахарозу, мальтозу, маніт, лактозу. Редукує нітрати. Продукує каталазу, протеазу. Не володіє лецитиназної активністю. Утворює аміак і сірководень, не утворює індол.

Антибіотикостійкими Визначення чутливості штаму до антибіотиків вивчали диско-дифузійним методом, використовуючи стандартні диски, просочені антибіотиками. Штам висували на щільних живильне середовище і розкладали диски з

антибіотиками, по 5 на чашку Петрі. Посіви інкубували при температурі 37 °С протягом 24 год. Стійкими вважали штам при відсутності затримки росту антибіотиком.

Штам має стійкість до пеніциліну, карбеніцилін, ампіциліну, оксациліну, поліміксину.

Вірулентність Культура штаму *B. subtilis* P1 була перевірена на вірулентність. Для дослідження вірулентності штам вирощували на м'ясо-пептонном агарі протягом 24 год при температурі 37 °С. Вирослу біомасу змивали 0,9% -ним розчином натрію хлориду і готували бактеріальні суспензії з концентрацією клітин від 0,5 до 5,0 млрд / в мл. Отримані суспензії вводили білим безпородним мишам масою (16 г) двома способами: одноразово внутрішньочеревно і п'ятикратно перорально (по одній дозі щодня протягом 5 днів). Результати випробувань представлені в табл.2.

Спостереження за тваринами проводили протягом 5 днів після закінчення курсу ін'єкцій або перорального введення. У цей період всі тварини залишалися активними, добре поїдали харчові раціони, додавали у вазі, фізіологічні відправлення і поведінкові реакції у них не змінювалися. Отримані дані свідчать про безпеку штаму *Bacillus subtilis* P1.

Штам *Bacillus subtilis* P1 використовували для отримання протеолітичного ферменту.

Винахід характеризується наступними прикладами.

Приклад 1. Штам вирощували шляхом періодичного гомогенного глибинного культивування в ферментері АК-10 з об'ємом живильного середовища - 8 л. Для вирощування штаму *Bacillus subtilis* P1, з метою отримання протеази використовують синтетичну живильне середовище, що містить мінеральні солі, як джерело азоту - сечовину, як джерело вуглецю - мальтозу.

Посівний матеріал отримували вирощуванням штаму *Bacillus subtilis* P1 у флаконах при температурі 37 °С протягом 16-18 год в рідкому поживному середовищі того ж складу, що і для культивування. Отриманий посівний матеріал, вносять в обсязі 1% від обсягу живильного середовища в ферментері. Ферментацію ведуть при температурі 37 °С з аерацією протягом 24 год. В результаті культивування отримано 6 л ферментсодержащего культуральної рідини з активністю протеази 28-32 ПЕ / мл і питомою активністю (20,0 ПЕ / мг білка).

Приклад 2. Штам вирощували шляхом періодичного гомогенного глибинного культивування в реакторі Біор-100 з об'ємом живильного середовища - 70 л. Живильне середовище і підготовка маточного штаму, як в прикладі 1.

Отриманий посівний матеріал, вносять в обсязі 1% від обсягу живильного середовища в реакторі "Біор - 100". Ферментацію

вірулентність культури штаму *B. subtilis* P1 була перевірена на вірулентність. Для дослідження вірулентності штаму вирощували на м'ясо-пептонному агарі протягом 24 год при температурі 37 °С. Вірослу біомасу змивали 0,9% -ним розчином натрію хлориду і готували бактеріальні суспензії з концентрацією клітин від 0,5 до 5,0 млрд / в мл. Отримані суспензії вводили білим безпородним мишам масою (16 ± 1) г двома способами: одноразово внутрішньочеревно і п'ятикратно перорально (по одній дозі щодня протягом 5 днів). Результати випробувань представлені в табл.2.

Спостереження за тваринами проводили протягом 5 днів після закінчення курсу ін'єкцій або перорального введення. У цей період всі тварини залишалися активними, добре поїдали харчові раціони, додавали у вазі, фізіологічні відправлення і поведінкові реакції у них не змінювалися. Отримані дані свідчать про безпеку штаму *Bacillus subtilis* P1.

Штам *Bacillus subtilis* P1 використовували для отримання протеолітичного ферменту.

Винахід характеризується наступними прикладами.

Приклад 1. Штам вирощували шляхом періодичного гомогенного глибинного культивування в ферментері АК-10 з об'ємом живильного середовища - 8 л. Для вирощування штаму *Bacillus subtilis* P1, з метою отримання протеази використовують синтетичну живильне середовище, що містить мінеральні солі, як джерело азоту - сечовину, як джерело вуглецю - мальтозу.

Посівний матеріал отримували вирощуванням штаму *Bacillus subtilis* P1 у флаконах при температурі 37 °С протягом 16-18 год в рідкому поживному середовищі того ж складу, що і для культивування. Отриманий посівний матеріал, вносять в обсязі 1% від обсягу живильного середовища в ферментері. Ферментацію ведуть при температурі 37 °С з аерацією протягом 24 год. В результаті культивування отримано 6 л ферментсодержащої культуральної рідини з активністю протеази 28-32 ПЕ / мл і питомою активністю (20,0 ± 2,0) ПЕ / мг білка.

Приклад 2. Штам вирощували шляхом періодичного гомогенного глибинного культивування в реакторі Біор-100 з об'ємом живильного середовища - 70 л. Живильне середовище і підготовка маточного штаму, як в прикладі 1.

Отриманий посівний матеріал, вносять в обсязі 1% від обсягу живильного середовища в реакторі "Біор - 100". Ферментацію ведуть при температурі 37 °С з аерацією протягом 24 год. В результаті культивування отримано 60 л ферментсодержащої культуральної рідини з активністю протеази 30 ± 2 ПЕ / мл питомою активністю (20,0 ± 2,0) ПЕ / мг білка.

Література 1. А.с. 885253, кл. МКІ 3 12 N 9/28, 30.11.81.

2. Никитенко В.И. Бактеріальний препарат для профілактики та лікування запальних процесів і алергічних захворювань // Міжнародна заявка. N 89/09607, WO, 19.10.1989.

3. Петрова І.С., Вінцонайте М.М. Визначення протеолітичної активності ферментних препаратів мікробіологічного походження // Прикладна біохімія та мікробіологія. - 1966. - N 2. -С. 322-327.
формула винаходу

Штам бактерій *Bacillus subtilis* P-1 - продуцент протеази.

МАЛЮНКИ

Малюнок 1 , Малюнок 2 , Малюнок 3

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 272 838**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2004118612/13, 21.06.2004**

(24) Effective date for property rights: **21.06.2004**

(45) Date of publication: **27.03.2006 Bull. 9**

Mail address:

**115478, Moskva, Kashirskoe sh., 24, str.17,
NTTs "Lekblotekh"**

(72) Inventor(s):

**Bravova Galina Borisovna (RU),
Shishkova Ehmilija Aleksandrovna (RU),
Smimova Tat'jana Evgen'evna (RU),
Burmistrova Valentina Valer'evna (RU),
Nesterenko Elena Antonovna (RU),
Poletaeva Olga Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Nekommercheskoe partnerstvo Nauchno-
tekhnicheskij tsentr "Lekarstva i
biotekhnologija" (NTTs "Lekblotekh") (RU)**

(54) **STRAIN OF BACTERIUM BACILLUS MACERANS BS-04 AS PRODUCER OF PECTINASES,
PROTEASE, XYLANASE AND AMYLASE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiological industry, biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to producing enzymes and represents a new strain of Bacillus macerans BS-04 as a producer of pectinases,

protease, xylanase and amylase. This strain provides preparing the broad complex of enzymes and characterized by short cycle of growth in combination with enhanced accumulation of biomass.

EFFECT: valuable properties of strain.

1 tbl, 4 ex

RU 2 2 7 2 8 3 8 C 1

RU 2 2 7 2 8 3 8 C 1

Изобретение представляет собой новый штамм *Bacillus macerans* BS-04 и относится к отрасли микробиологической промышленности, производящей ферментные препараты, и может быть использовано при получении ферментсодержащих лекарственных средств, применяемых для лечения и профилактики заболеваний, связанных с нарушениями процессов пищеварения; и при получении препаратов, применяемых с целью увеличения выхода и улучшения качества овощных и фруктовых соков и пюре, плодово-ягодного осветленного вина, эфирных и растительных масел, чая, при обработке трудноусвояемых растительных кормов и получении биологических добавок для сельского хозяйства.

Известен *Clostridium pectinofermentas* шт. 15 - анаэробный продуцент мацерирующих ферментов, предназначенных для применения в льноперерабатывающей промышленности (1). *Clostridium pectinofermentas* шт. 15 синтезирует в процессе глубинного культивирования пектат-трансэлиминазу (0,55 ед/мл), экзо-полигалактуроназу (2,5 ед/мл), пектинэстеразу (0,13 ед/мл), ксиланазу (0,96 ед/мл) и не синтезирует эндо-полигалактуроназу и целлюлазу. Существенным недостатком указанного штамма является низкий уровень биосинтеза ферментов.

Известен штамм *Bacillus circulans* шт.31 ЦМПМ В-1741 - продуцент мацерирующих ферментов (2). *Bacillus circulans* шт.31 является факультативным анаэробом. Оптимальные условия культивирования: pH среды 8,1-8,3; температура 37-42°C; время культивирования 36 ч. Продуцент синтезирует пектолитические ферменты: пектат-трансэлиминазу от 2 до 10 ед/мл, эндо-полигалактуроназу - 25 ед/мл. Существенными недостатками штамма *Bacillus circulans* шт.31 являются: низкая активность синтезируемых ферментов и длительный период культивирования продуцента.

Известен штамм бактерии *Bacillus circulans* ВКМП-В-5622 - продуцент комплекса пектолитических ферментов и ксиланазы (3). Штамм синтезирует ферменты: пектат-трансэлиминазу - на среде, содержащей свекловичный жом, от 3800 до 6700 ед/мл; а на среде, содержащей картофельный крахмал от 10000 до 25000 ед/мл; эндо-полигалактуроназу от 32,57 до 87,7 ед/мл; экзо-полигалактуроназу от 12,0 до 36,77 ед/мл и ксиланазу до 30,8 ед/мл. Штамм культивируют в течение 10-18 ч при pH среды 7,8-8,6 и температуре 36-45°C.

Наиболее близким аналогом (прототипом) к заявляемому штамму является штамм *Bacillus macerans* ЦМПМ В-2692 - продуцент пектолитических ферментов (4), который в условиях глубинного культивирования образует эндо-полигалактуроназу с активностью 6,7 ед/мл, экзо-полигалактуроназу с активностью 5,3 ед/мл и пектат-трансэлиминазу с активностью 9000 ед/мл. Культивирование продуцента осуществляют при температуре 32-35°C, pH 6,8-7,2 в течение 18-20 ч. Существенным недостатком указанного штамма является недостаточно высокая активность пектат-трансэлиминазы и узкий комплекс синтезируемых ферментов.

Целью настоящего изобретения является получение высокоактивного штамма факультативно-анаэробной бактерии *Bacillus macerans* BS-04 - способного синтезировать широкий комплекс ферментов, обладающего повышенным синтезом пектиназ, а именно, пектат- и пектинлиаз, эндо- и экзо-полигалактуроназ, пектинэстеразы; и дополнительным синтезом протеазы, ксиланазы, амилазы, и характеризующегося коротким циклом роста с повышенным накоплением биомассы.

Заявляемый штамм *Bacillus macerans* BS-04 выделен в результате многократного рассева исходного штамма *Bacillus macerans* ЦМПМ В-2692 и выделения моноспоровых вариантов. Штамм *Bacillus macerans* BS-04 имеет следующие культурально-морфологические и физиологические признаки.

Культурально-морфологические признаки

- непрозрачной серединой, края колонии матовые, шершавые, непрозрачные, неровные, размер колоний от 1 мм до 10 мм;
- на третьи сутки колонии светло-бежевые с более светлой и плотной, чуть выпуклой серединой. Все колонии блестящие, полупрозрачные, края неровные. Размер колоний от 1 мм до 11 мм.
- 15 На среде Чапека с глюкозой:
- на первые сутки колонии однородные, выпуклые молочно-белого цвета, блестящие, прозрачные, края ровные, размер колоний от 0,5 мм до 1,5 мм;
 - на вторые сутки колонии неоднородные светло-бежевого цвета, середина блестящая в
- 20 виде пуговки, края неровные, матовые, шершавые, размер колоний от 1 мм до 4 мм;
- на третьи сутки колонии неоднородные светло-бежевого цвета, середина блестящая в виде пуговки, края неровные, матовые, шершавые, размер колоний от 1 мм до 7 мм;
 - на шестые сутки колонии неоднородные, края неровные, матовые, шершавые; середина блестящая в виде пуговки, непрозрачная, размер колоний 0,2-1,2 мм, цвет
- 25 светло-бежевый.
- На среде Чапека с крахмалом:
- на первые сутки размер колоний 0,01-0,5 мм, колонии блестящие, непрозрачные, однородные, выпуклые, цвет белый, края неровные;
 - на третьи сутки размер колоний 0,5-2,0 мм, колонии блестящие, непрозрачные,
- 30 однородные, выпуклые, цвет молочно-белый, края неровные;
- на четвертые сутки колонии 0,5-2,5 мм, блестящие, выпуклые, непрозрачные, цвет молочно-белый, центр более плотный (точечное уплотнение), края неровные глубоко изрезанные;
 - на шестые сутки колонии от 0,5 до 5 мм, непрозрачные, блестящие, неоднородные с
- 35 точечным уплотнением в центре, края матовые, неровные.
- На мясопептонном агаре:
- рост слабый, колонии точечные, бежевые.
- Физиолого-биохимическая характеристика штамма
- Отношение к углеводам: усваивает глюкозу, сахарозу, ксилозу, арабинозу, мальтозу и
- 40 маннит с образованием кислоты и газа, гидролизует крахмал.
- Образует каталазу, ацетон, кристаллические декстрины. Нитраты редуцирует в нитриты. Фенилаланин не дезаминирует, тирозин не расщепляет. Аммиак и сероводород не образует. Гиппураты не гидролизует. Желатин разжижает на 1 см в верхней части. Молоко пептонизирует с образованием сгустка и газа. Растет на среде с 0,001% лизоцимом, не
- 45 растет на среде с 5% хлористым натрием.
- Хорошо растет на ломтиках моркови, картофеля, репы, капусты белокочанной, кабачка, тыквы, яблока (некислых сортов) и груши с полной мацерацией субстрата.
- На среде с 1% азотнокислым натрием в анаэробных условиях отмечается задержка спорообразования.
- 50 Отношение к кислороду - факультативный анаэроб. Минимальная температура роста +10°C, максимальная +45°C, оптимальная 37-42°C, pH 7,4-7,8.
- Время культивирования в аэробных условиях 10-18 ч, в условно-анаэробных - 18-30 ч. Продукент подвержен сезонным влияниям, поэтому в весенний и осенний периоды

заявляемого продуцента. Степень мацерации растительных субстратов определяли по уменьшению массы обработанного ферментом субстрата по сравнению к контрольным вариантам и выражали в процентах.

Примеры культивирования штамма *Bacillus macerans* BS-04

Пример №1

Культуру выращивали на среде, г/л:

25	Свекловичный жом молотый	20,0
	Кальций хлористый	0,9
	Натрий углекислый (сода)	2,0
	Аммоний фосфорнокислый двузамещенный	2,6
	Натрий фосфорнокислый однозамещенный	2,2
	Кукурузный экстракт	7,4
30	Вода водопроводная	остальное

Питательную среду разливали по 100 мл в качалочные колбы вместимостью 750 мл и стерилизовали при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 45 мин. В качестве посевного материала использовали споры штамма *Bacillus macerans* BS-04, которые образуются на поверхности скошенного картофельного агара после инокулирования и выращивания в течение 48 ч при 40°C. Смывом с 1 косяка засеивали 3 колбы в количестве 3% к объему питательной среды. Культивирование проводили в аэробных условиях на качалке с частотой вращения 180-200 об/мин при рН среды 7,6, температуре 40°C и в течение 10 ч.

Пример №2

Культивирование проводили на среде в соответствии с примером №1, за исключением аэрации, температуры и рН среды. Выращивание проводили в условно-анаэробных условиях. С этой целью использовали круглые плоские колбы с узким горлом. Питательную среду наливали в количестве 0,5 объема колбы. Культивирование проводили при рН среды 7,8, температуре 42°C, в течение 24 ч без перемешивания.

Пример №3

Культивирование проводили в течение 18 ч в условиях, соответствующих условиям примера №1. Состав питательной среды отличался от состава примера №1 дополнительным содержанием 1% казеина и 1% кормовых дрожжей "Биотрин".

Пример №4

Продуцент выращивали на среде, г/л:

Картофельный крахмал	100,0
Амилосубтилин Г3х с АС 550 ед/г	0,37
Аммоний лимоннокислый двузамещенный	30,0

Страница: 5

RU 2 272 838 C1

Натрий фосфорнокислый двузамещенный	3,0
Калий фосфорнокислый однозамещенный	2,0
Магний сернокислый	1,5
Кальций сернокислый	1,5

Натрий фосфорнокислый двузамещенный	3,0
Калий фосфорнокислый однозамещенный	2,0
Магний сернокислый	1,5
Кальций сернокислый	1,5
Железо сернокислое закисное	0,02
Марганец сернокислый	0,00125
Медь сернокислая	0,0075
Аминобензойная кислота	0,01
Вода дистиллированная	остальное
pH среды	7,4

5

10 Картофельный крахмал, входящий в состав питательной среды, предварительно осахаривали амилозубтилином ГЗх с АС 550 ед/г. Питательную среду по 300 мл разливали в колбы вместимостью 2 л и стерилизовали при 1,5 МПа. Культивирование осуществляли в условно-аэробных условиях при pH 7,4, температуре 37°C без перемешивания в течение 30 ч.

15

По окончании культивирования продуцента проводили определение активностей ферментов в супернатанте, полученном из культуральной жидкости при центрифугировании при 5000 об/мин в течение 10 мин. Данные по результатам опытов представлены в таблице.

20

Использование предлагаемого штамма *Bacillus macerans* BS-04 по сравнению с прототипом имеет следующие преимущества:

1. Повышенный синтез пектатлиазы до 60000 ед/мл (в прототипе до 9000 ед/мл), пектинлиазы до 25000 ед/мл (в прототипе - отсутствует).

2. Более высокий уровень синтеза эндо-полигалактуроназной активности: при pH субстрата 4,0 - до 9 ед/мл, а при pH субстрата 8,0 до 909 ед/мл (в прототипе - 6,7 ед/мл).

25

3. Более высокий уровень синтеза экзо-полигалактуроназной активности до 15,1 ед/мл (в прототипе - 5,3 ед/мл).

4. Синтез пектинэстеразной активности достигает 57,84 ед/мл (в прототипе - отсутствует).

30

5. Кроме вышеуказанных пектиназ штамм дополнительно синтезирует: щелочную протеазу (до 0,76 ед/мл), ксиланазу (до 0,19 ед/мл) и амилазу (до 83,2 ед/мл).

6. Повышенное накопление биомассы (титр клеток) достигает $2,7 \times 10^{10}$ (в прототипе данные отсутствуют).

35 Таким образом, предлагаемый штамм имеет значительные преимущества по сравнению с прототипом, что позволит при его промышленном использовании получать высокоактивные препараты с широким комплексом ферментов для медицинской и пищевой промышленности, а также для сельского хозяйства.

40

45

45 40 35 30 25 20 15 10 5

Таблица

№ при- мера	Условия культивирования				Ферментативная активность, ед/мл							Титр кле- ток		
	Аэрация	pH	Т °С	Продол жит., ч	Пек- татлиа- за	Пекти н- лиаза	Эндо-ПГ		Экзо- ПГ	Пекти- нэсте- раза	Про- теаза		Ксила- наза	Амила- за
							рН субстрата	8,0						
1	аэроб- ные	7,6	40	10	10500	1500	8	870	8,2	19,05	0,24	0,08	36,9	1,8 x 10 ⁹
2	условно- анаэробные	7,8	42	24	7200	900	5	710	8,0	17,14	0,12	0,02	18,3	1,2 x 10 ⁸
3	аэроб- ные	7,6	40	18	9300	2000		909	9,2	28,58	0,49	0,12	31,0	2,2 x 10 ⁹
4	условно- аэроб- ные	7,4	37	30	60000	25000	8,4	833	15,1	57,84	0,76	0,19	83,2	2,7 x 10 ¹⁰

Ферменти

1. Пулуланаза (КФ 3.2.1.41)
2. Фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2)
3. Глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
4. 6-Фосфоглюкокіназа (КФ 2.7.1.11)
5. Фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13)
6. Гліцерльдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.2.1.12)
7. Фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3)
8. 2,3-дифосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.12)
9. Енолаза (КФ 4.2.1.11)
10. Піруват кіназа (2.7.1.40)
11. Піруват дегідрогеназа (КФ 1.2.4.1)
12. Піруват дегідрогеназа (КФ 1.2.4.1)
13. Піруват дегідрогеназа (КФ 2.3.1.12)
14. 6-фосфоглюконоальдолаза (КФ 3.1.1.31)
15. 6-фосфоглюконат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.44)
16. Транскетолаза (КФ 2.2.1.1)
17. Глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
18. Аспартат аміотрансфераза (КФ 2.6.1.1)
19. Аргінін синтаза (КФ 6.3.5.4)
20. Глутамат дегідрогеназа (КФ 1.4.1.2)
21. Глутамін синтетаза (КФ 6.3.1.2)
22. Карбомоїлфосфат синтаза (КФ 6.3.5.5)
23. Орнітинкарбомоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.3)
24. Аргінін деїміназа (КФ 3.5.3.6)
25. Глутамат-5-кіназа (КФ 2.7.2.11)
26. Глутамат-5-серміальдегід дегідрогеназа (КФ 1.2.1.41)
27. -
28. Піролін-5-карбоксилат редуктаза (КФ 1.5.1.2)
29. Аспартат кіназа (КФ 2.7.2.4)
30. Аспартат-серміальдегід дегадірогеназа (КФ 1.2.1.11)
31. Гомосерин дегідрогеназа (КФ 1.1.1.3)
32. Гомосерин кіназа (КФ 2.7.1.39)\
33. Треонін синтаза (КФ 4.2.3.1)
34. Треонін дегідратаза (КФ 4.3.1.19)
35. Ацетолатат синтаза (КФ 2.2.1.6)
36. Редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)
37. Редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)
38. Дигідроксидегідратаза (КФ 4.2.1.9)
39. Аміотрансфераза (КФ 2.6.1.42)
40. Лейцин дегідрогеназа (КФ 1.4.1.9)
41. Треонін-3-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.103)
42. Гліцин С-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.29)
43. Гліцин гідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1)
44. Серин о-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30)
45. Цистеїн синтаза (КФ 2.5.1.47)
46. Цистатіон синтаза (КФ 2.5.1.48)
47. Цистатіон синтаза (КФ 2.5.1.48)

48. 5-метилтетрагідрофолат-гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.13)
49. Метіонін синтаза (КФ 2.1.1.14)
50. 4-гідрокси-тетрагідродипіколінат (КФ 4.3.3.7)
51. 4-гідрокси-тетрагідродипіколінат редуктаза (КФ 1.17.1.8)
52. Тетрагідродипіколінат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89)
53. Амінотрасфераза (КФ 2.6.1.-)
54. N-ацетилдіамінопімелат деацетилаза (КФ 3.5.1.47)
55. Діамінопімелат епімераза (КФ 5.1.1.7)
56. Діамінопімелат декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20)
57. Аланін дегідрогеназа (КФ 1.4.1.1)
58. Ацетолактат синтаза (КФ 2.2.1.6)
59. Редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)
60. Редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)
61. Дигідроксидегідратаза (КФ 4.2.1.9)
62. Амінотрансфераза (КФ 2.6.1.42)
63. 2-ізопропілмалат синтаза (КФ 2.3.3.13)
64. 3-ізопропілмалат (КФ 4.2.1.33)
65. 3-ізопропілмалат (КФ 4.2.1.33)
66. 3-ізопропілмалат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.85)
67. –
68. Амінотрансфераза (КФ 2.6.1.42)
69. Фосфоенолпіруваткарбоксикіназа (КФ 4.1.1.49)
70. Піруват карбоксилаза (КФ 6.4.1.1)
71. Рибулософосфат-3-епімераза (КФ 5.1.3.1)
72. Транскетолаза (КФ 2.2.1.1)
73. 3-декси-7-фосфогептулонат синтаза (КФ 2.5.1.54)
74. 3-дегідрокюінат синтаза (КФ 4.2.3.4.)
75. 3-дегідрокюінат дегідратаза (КФ 4.2.1.10)
76. Шикімат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.25)
77. Шикімат кіназа (КФ 2.7.1.71)
78. 3-фосфошикімат-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19)
79. Хоризмат синтаза (КФ 4.2.3.5)
80. Хоризмат мутаза (КФ 5.4.99.5)
81. Префенат дегідратаза (КФ 4.2.1.51)
82. Гістидиолфосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9)
83. Префенат дегідрогеназа (КФ 1.3.1.12)
84. Гістидиолфосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9)
85. Антранілат синтаза (КФ 4.1.3.27)
86. Антранілат сфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18)
87. Фосфорибозилантранілат ізомераза (КФ 5.3.1.24)
88. Індол-3-гліцеролфосфат синтаза (КФ 4.1.1.48)\
89. Триптофан синтаза (КФ 4.2.1.20)
90. Рибозо-5-фосфат ізомераза А (КФ 5.3.1.6)
91. Рибозофосфат пірофосфаткіназа (КФ 2.7.6.1)
92. АТФ фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17)
93. Фосфорибозил-АТФ пірофосфогідролаза (КФ 3.6.1.31)
94. Фосфорибозил-АМФ циклогідролаза (КФ 3.5.4.19)
95. Фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазол карбоксамід риботімід ізомераза (КФ 5.3.1.16)
96. Імідазол гліцеролфосфат синтаза (КФ 4.3.2.10)
97. Імідазолгліцеролфосфат дегідратаза (КФ 4.2.1.19)

98. Гістидиолфосфат аміотрансфераза (КФ 2.6.1.9)

99. Гістидіолфосфат (КФ 3.1.3.15)

100. Гістидіол дегідрогеназа (КФ 1.1.1.23)

101. Гістидіол дегідрогеназа (КФ 1.1.1.23)