

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

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

«__» __ червня 2024 р.

«__» __ червня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Культивування *Bacillus thuringiensis var. israelensis* для одержання
ларвіцидного препарату Бактицид

Виконала: здобувачка IV курсу, групи 3

САВИЧ Анна Ярославівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Людмила РЕШЕТНЯК

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
«01» березня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

САВИЧ Анна Ярославівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus thuringiensis var. israelensis* для одержання ларвіцидного препарату Бактицид
керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, зав. кафедри д.т.н., доц
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.
3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 50м³, коефіцієнт заповнення становить 0,6, цільовий продукт у вигляді біоінсектицидного препарату на основі культуральної рідини бактерії та дельта-ендотоксину, виробничий штам *Bacillus thuringiensis var. israelensis*
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема біосинтезу *Bacillus thuringiensis var. israelensis* формату А1 – аркушів 1
Апаратурна схема біосинтезу *Bacillus thuringiensis var. israelensis* у форматі А1 – аркушів 1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 03.03.24	Виконано
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	03.03.24- 06.03.24	Виконано
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	06.03.24.- 09.03.24	Виконано
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	09.03.24.- 11.03.24	Виконано
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.03.24.- 15.03.24	Виконано
	Розділ 6. Специфікація обладнання	15.03.24- 18.03.24	Виконано
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	18.03.24.- 21.03.24	Виконано
	Розділ 8. Контроль виробництва	21.03.24.- 25.03.24	Виконано
	Розділ 9. Охорона довкілля	25.03.24 - 28.05.24	Виконано

Здобувач _____
(підпис)

Анна САВИЧ _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технічної та апаратурної схем біосинтезу бактерії *Bacillus thuringiensis var. Israelensis*. Бактерія *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* активно застосовується у сільському господарстві для боротьби зі шкідниками. Загалом із комарами, попелицею та іншими комахами, які здатні шкодити врожай або шкодити людям. Виробництво препарату планується на вегетативний період сільськогосподарських робіт. Розраховуємо виробництво на задоволення 20% потреб ринку, що складає 766,6 мЗ.

Технологічна схема біосинтезу *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* включає в собі допоміжні роботи (підготовка персоналу, аераційного повітря, титрувальних розчинів, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (п'ять стадії вирощування посівного матеріалу, застосування колб на 300 мл, та інокуляторів на 5, 50, 500 л та 5мЗ, а також біосинтез у ферментері об'ємом 50мЗ, з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури, технологічної схеми (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А1, 1 аркуш). Загальний обсяг роботи – 95 сторінок, 14 таблицок, 8 рисунків та 85 літературних найменувань.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis var. Israelensis*, біосинтез, біоінсектициди, боротьба з комахами.

ABSTRACT

The qualification work is about development of technical and hardware schemes for the biosynthesis of *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. Bacteria *Bacillus thuringiensis var. israelensis* is actively used in agriculture for pest control. In general, with mosquitoes, aphids and other insects that can damage crops or harm people. Production of the preparation is planned for the vegetative period of agricultural work. We expect production to meet 20% of market needs, which is 766,6 m³.

Technological scheme of the biosynthesis of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* includes auxiliary works (training of personnel, aeration air, titration solutions, sterilization of nutrient media) and technological process (five stages of seed cultivation, use of 300 ml flasks, and inoculators for 5, 50, 500 l and 5 m³, as well as biosynthesis in a fermenter with a volume of 50 m³, with a filling factor of 0.6).

The qualifying paper consists of an introduction, nine chapters, a list of used literature, a technological diagram (format A1, 1 sheet) and an apparatus diagram (format A1, 1 sheet). The total volume of the work is 95 pages, 14 tables, 8 illustrations and 85 literary titles.

Keywords: *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, biosynthesis, bioinsecticides, insect control.

Зміст

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
1.1. Фізико-хімічні властивості δ -ендотоксину.....	10
1.2. Сфери практичного застосування δ -ендотоксину.....	11
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	13
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.	17
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	18
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	20
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба в цільовому продукті	21
3.2. Розрахунок потужності виробництва.	22
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера.	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	28
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	28
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ..	30
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	30
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	30
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	31

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	35
5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника ..	44
5.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту ..	44
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	46
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	60
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	72
8.1. Карта постадійного контролю.....	72
8.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ	78
8.3. Визначення концентрації цільового продукту δ -ендотоксину:.....	80
8.4. Визначення джерела вуглецю та крохмалю.	81
8.5. Оцінка біологічної дії.	83
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	84
9.1 Аналіз технологічної схеми проєктованого біотехнологічного виробництва.....	84
9.2 Способи знезараження води:.....	84
9.3 Способи знезараження повітря:	84
9.4 Способи знезараження твердих відходів:.....	85
Список використаної літератури:.....	86

ВСТУП

На сьогоднішній день важливою проблемою сільського господарства є боротьба не тільки з бур'янами, а й з шкідниками комахами. Такі комахи як сарана, метелики, попелиці, гусениці та інші, наносять дуже велику шкоду сільському господарству [1] (так, попелиці пошкоджують пагони, бруньки, а також переносять захворювання від рослини до рослини) [2]. Також не потрібно забувати про комах збудників важких захворювань, таких як малярійний комар [3]. Шкоду несуть не тільки самі комахи, але і їх личинки (самка малярійного комара може відкласти близько 280 яєць) [4]. Саме тому у агрокультурі окрім хімічних пестицидів та гербіцидів застосовуються біологічні. Бактерія *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* є універсальною у цьому плані – не шкодить людині, та показує дуже позитивні результати щодо зниження популяцій комах.

Загалом, бактерія містить дельта ендотоксин, а також кристалічні білки CRY та CYT – саме ці ферменти впливають на комах та знищують їх [5].

Знищення комах у сільськогосподарській культурі актуально і наразі в Україні. До прикладу, біла капуста – дуже розповсюджена комаха, яка вражає капусту, суницю та інші продукти (розвиток одного покоління комах від 3-6 тижнів). Такі комахи як попелиці вражають плодові дерева, троянди бобові та інші продукти – вони мають великий ареал розповсюдження, а самки дуже швидко відкладають яйця. Кожна комаха типу шкідників приносить сільськогосподарській культурі та фермерам збитки [6]. Тому, токсини бактерії *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* дозволяють знищувати комах ще на стадії личинки, не дозволяючи переходити у стадію лялечки або імаго (токсину потрібно всього на всього менше тижня задля того щоб була уражена велика територія, та шкідники не змогли розвиватися) [3].

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Савич А.Я.				Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Воронцов О.О.						8	95
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Отже, середньорічні втрати врожаю від шкідників на полях України становлять, за різними оцінками, в середньому 5 % (загалом, найбільш шкідливими є клопи, кліщі, попелиці та ін.) Також, в Україні не є достатнім кількість бактеріальних гербіцидів на даний момент, саме тому використання бактерії *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* є актуальним та потрібним [7].

Продуцентами дельта-ендотоксину є тільки бактерії *Bacillus thuringiensis*, а штам *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* Н14 показав найкращу синтезувальну здатність – 9,38 г/л, саме тому доцільно використовувати його.

Мета кваліфікаційної роботи – проєктування ділянки доферментаційних процесів та моделювання технічної та апаратурної схем для біосинтезу *Bacillus thuringiensis var. Israelensis*.

Новизною кваліфікаційного проєкту є використання високоефективного штаму бактерій задля знищення інсектицидів та забезпечення збереження сількогосподарського врожаю від шкідників.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1. Фізико-хімічні властивості δ -ендотоксину

δ -ендотоксин – білкові токсини які виробляються бактерією *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* [8]. При спороутворенні, бактерії виробляють кристали δ -ендотоксину, вони поділяються на C_g та C_{yt} кристали [9] Форма кристалів може бути від ромбовидної до сферичної [10].

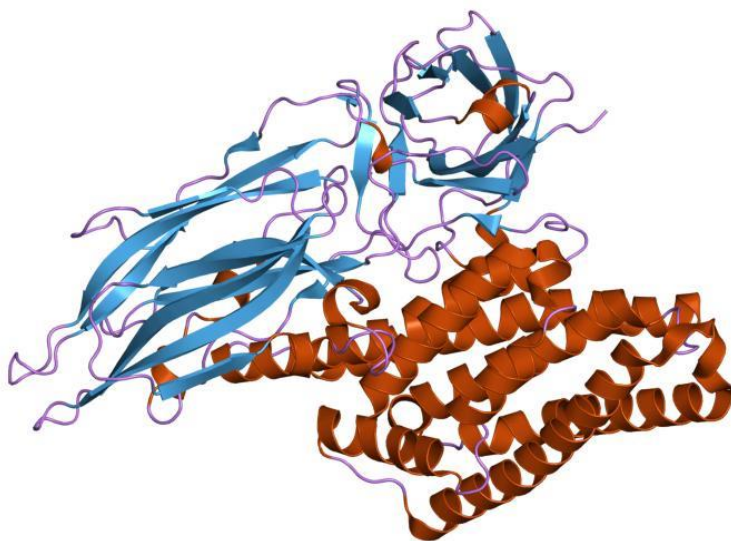


Рис. 1.1. – структурна формула δ -ендотоксину [11]

Коли комаха проковтує цей білок, він починає активуватись тільки у неї в шлунку, при рН – 9.5 та завдяки шлунковому соку. δ -ендотоксин зв'язується з рецепторами, які знаходяться на епітелію шлунку, зв'язування з рецепторами викликає загибель комахи через безпосереднє зупинення гомеостазу [12], що приводить до лізису клітин та осмотичного шоку [9].

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Савич А.Я.				Розділ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Воронцов О.О.						10	95
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

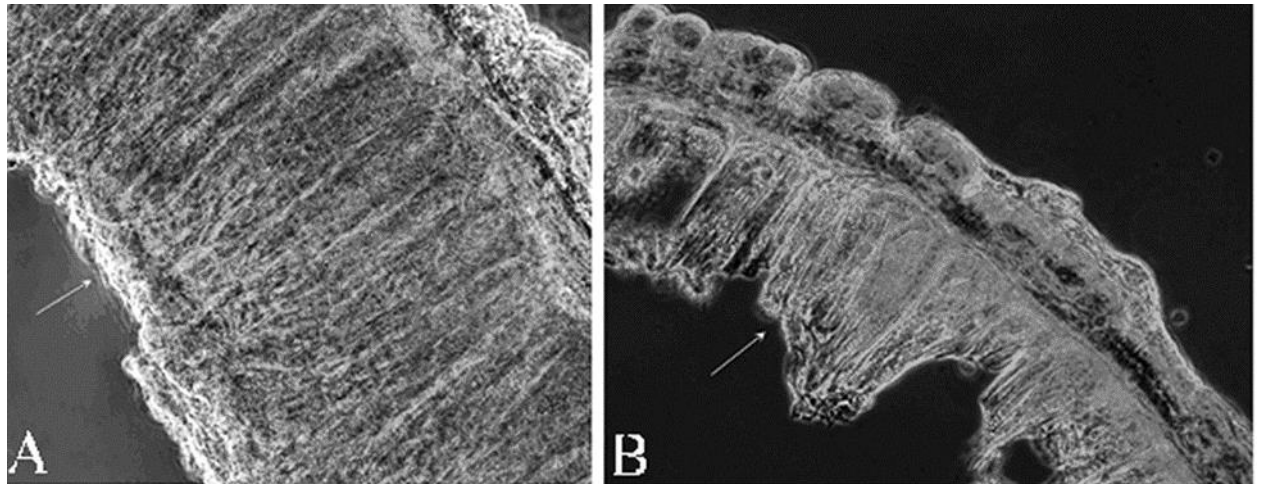


Рис.1.2. – А фрагмент – не оброблена середня кишка сарани, В фрагмент – середня кишка сарани, яка піддалась дії δ -ендотоксину [13]

δ -ендотоксин застосовується проти личинок комах двокрилих, лускокрилих, твердокрилих, а також прямокрилих [14] (загалом сарани) [13].

На людину δ -ендотоксин не справляє отруйної дії (різна будова рецепторів у людини та комах, через які δ -ендотоксин має специфічну дію, та зв'язується тільки з певними рецепторами певних комах) [14].

Температура плавлення: 56° - 57° [15]

Загальна вага: 29,26 кДа [16]

1.2. Сфери практичного застосування δ -ендотоксину

Через свою гербіцидну дію, δ -ендотоксин широко застосовується у сільському господарстві (зادля захисту овочів, фруктів та ін. продуктів від личинок комах та комах) [17]. Були випадки використання δ -ендотоксину у генетично змінених рослинах, щоб вони вже генетично мали винищувальну дію на шкідників [18] (наприклад, у помідорах, кукурудзі та картоплі [19]). Через свою токсичну дію на комах, δ -ендотоксин використовується як гербіцид [20]. δ -ендотоксин входить до складу таких препаратів:

- Бактицид – лавріцидний препарат, який застосовується проти личинок комарів. Зберігається у вигляді суспензії та застосовується розпилом. Застосування препарату відбувається у період активного розмноження комарів (на полях, водоймах та інших місцях знаходиться велика кількість

їх личинок). Розпилювати препарат можна у полях, водоймах, стоках та на інших місцях можливого скупчення комах. Препарат дає свій результат після 6-24 годин обробки місцевості. Препарат застосовують в об'ємі 5-10 літрів на галон, має рідку форму. Препарат містить 5% дельта-ендотоксинів та 5% спор бактерій. Виробляється торговою компанією Bacticide As [21].



Рис.1.3. – ларвіцидний препарат – Бактицид [22]

- Лепідоцид – інсектицид, призначений проти листогризучих комах. Рідина коричневого кольору, застосовується розпилом у період вегетативного розмноження личинок, бажано підтримувати інтервал розприскування 7-10 днів (ефективний проти гусені віку 1-3 років). Застосовується в об'ємі 3-4 л/га. Виробляється компанією Biona [23].

- Бітоксібацилін – інсектицид. Рідина, застосовується розпилом для капусти, винограду, люцерни та інших овочів та фруктів застосовується в об'ємі 35 мл або 4-5 л., для огірків ця концентрація вище 70 мл/5л. Інтервал між обробками повинно бути 5-7 днів (для огірків 15). Бажано проводити оприскування у вечірню годину або після дощу. Виробляється компанією БТУ [24].

- Aquabac – інсектицид проти комарів. Має форму гранул, які використовуються на водоймах не застосовується на водоймах, які людина використовує як питні. У звичайних водоймах не шкодить рибі. Застосовується в об'ємі 200 г, інтервал між обробкою 7-14 днів. Виробляється компанією Becker Microbial Products [25].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.

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

Мікроорганізми, які здатні до синтезу δ -ендотоксина - тільки бактерії *Bacillus thuringiensis*. До прикладу, порівнюючи *Bacillus cereus* і *Bacillus thuringiensis* можна дізнатися, що обидва види бактерій можуть культивувати альфа-ендотоксин, бета-ендотоксин, але δ -ендотоксин *Bacillus cereus* вже не спроможній виділяти [26]. Саме тому культивування цього клітинного токсину потрібно проводити порівнюючи бактерії виду *Bacillus thuringiensis*, такі як *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* H14, *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* QBT220 та *Bacillus thuringiensis sv2*.

Виділення біомаси спостерігалось краще всього у штама *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* H14 – 9,38 (порівняно з іншими бактеріями). Згідно даних таблиці 2.2. – середовище для культивування коштує 2,33 грн, найдешевше середовище у штама *Bacillus thuringiensis sv2* – 0,39 грн, але він виробляє значно менше біомаси. Умовна вартість цільового продукту у таблиці 2.3. - 0,248, що є дешевше ніж у штама , *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* QBT220, але не дешевше ніж у *Bacillus thuringiensis sv2*.

Тим не менш, порівнюючи дані згідно виділення біомаси, коштів та інших даних можна вибрати штама *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* H14 найкращим серед досліджуваних.

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Савич А.Я.				Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Воронцов О.О.						13	95
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л		Тривалість культивування, год	Біомаса, г/л	Концентрація токсину, мг/л	Умови культивування	Література
	компонент	концентрація					
<i>Bacillus thuringiensis var. Israelensis</i> H14	Крохмал Соевий шрот CaCO ₃ KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ MnSO ₄ · 7 H ₂ O MgSO ₄ FeSO ₄	15 г/л 25 г/л 20 г/л 1 г/л 1 г/л 0,01 г/л 3 г/л 0,01	96 год	9,38	147,25	Бактерій культивували 96 год, при 30° та Ph 7, а після центрифугували при 4000 об/хв., промивали NaCl та знову центрифугували при обертах 14000 хв. У свіжій пробірці культура зберігалась при 4°	Kavita N., Roda A.T., Samir J., <i>Bacillus thuringiensis strain QBT220 pBtoxis plasmid structural instability enhances δ-endotoxins synthesis and bioinsecticidal activity</i> , Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 228, 2021, 112975. ISSN 0147-6513, https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112975 .
<i>Bacillus thuringiensis var. Israelensis</i> QBT220	Крохмал Соевий шрот CaCO ₃ KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ MnSO ₄ · 7 H ₂ O MgSO ₄ FeSO ₄	15 г/л 25 г/л 20 г/л 1 г/л 1 г/л 0,01 г/л 3 г/л 0,01	96 год	7,53	101,85	Бактерій культивували 96 год, при 30° та Ph 7, а після центрифугували при 4000 об/хв., промивали NaCl та знову центрифугували при обертах 14000 хв. У свіжій пробірці культура зберігалась при 4°	Kavita N., Roda A.T., Samir J., <i>Bacillus thuringiensis strain QBT220 pBtoxis plasmid structural instability enhances δ-endotoxins synthesis and bioinsecticidal activity</i> , Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 228, 2021, 112975. ISSN 0147-6513, https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112975 .
<i>Bacillus thuringiensis</i> sv2	Глюкоза Дріжджовий екстракт NaCl Na ₂ HPO ₄ MgSO ₄ MnCl ₂	10 г/л 0,5 г/л 2,5 г/л 1 г/л 0,2 г/л 0,05 г/л	72 год	6,30	16,0	Культура росла при 30°, при постійному переміщенні 200 об/хв, 72 год. Густина перевіряли на спектрофотометрі (600 нм)	Patil Chandrashekar Devidas, Borase Hemant Pandit, Patil Satish Vitthalrao, "Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous <i>Bacillus thuringiensis</i> and Their Application against Larvae of <i>Aedes aegypti</i> ", The Scientific World Journal, vol. 2014, Article ID 273030, 6 pages, 2014. https://doi.org/10.1155/2014/273030

Висновок: умови культивування у бактерій майже однакові, підтримка того ж рН, t та інших показників. *Bacillus thuringiensis* sv2 потрібно менше часу (72 години), і середовище також має менше компонентів. Тим не менш, найкращі показники вироблення біомаси у *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* H14 – 9,38, порівняно з 7,53 та 6,30. Концентрація токсину найбільша у штама H14 – 147,25

Вартість компонентів поживного середовища

Таблиця 2.2.

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у поживному середовищі, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i> H14	Крохмал	15	35	0,525	1
	Соевий крохмал (шрот)	25	30	0,75	2
	CaCO ₃	20	39	0,78	3
	KH ₂ PO ₄	1	134	0,134	4
	K ₂ HPO ₄	1	73,44	0,07344	5
	MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01	43	0,00043	6
	MgSO ₄	3	23	0,069	7
	FeSO ₄	0,01	12,5	0,0000125	8
Вартість 1 л середовища – 2,33					
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Israelensis</i> QBT220	Крохмал	15	35	0,525	1
	Соевий крохмал (шрот)	25	30	0,75	2
	CaCO ₃	20	39	0,78	3
	KH ₂ PO ₄	1	134	0,134	4
	K ₂ HPO ₄	1	73,44	0,07344	5
	MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01	43	0,00043	6
	MgSO ₄	3	23	0,069	7
	FeSO ₄	0,01	12,5	0,0000125	8
Вартість 1 л середовища – 2,33					
<i>Bacillus thuringiensis</i> sv2	Глюкоза	10	22	0,60	9
	Дріжджовий екстракт	0,5	40	0,02	10
	NaCl	2,5	30	0,075	11
	Na ₂ HPO ₄	1	70	0,07	12
	MgSO ₄	0,2	23	0,0046	7
	MnCl ₂	0,05	98	0,0049	13
Вартість 1 л середовища – 0,77					

Висновок: найдешевшим є середовище для *Bacillus thuringiensis* sv2, за наявності небагатої кількості компонентів, середовища для штамів QBT220 та H14 вийшли в одну ціну (кількість компонентів для їх синтезу більша).

Ціни:

1 - https://harkiv-torg.com.ua/p822462531-krahmal-kukuruznyj.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiA0JKfBhBIEiwAPhZXDwX7HEBbUGiAX_ipIO4tr_NEw7uM9DXJZSzfHmCnoM6kn-LMCA_TxoCoJcQAvD_BwE, 2 - <https://prom.ua/p5288778-soevyj-shrot-proteina.html?&primelead=MC44NQ>, 3 - https://tov-srp.com/product/kalczij-karbonat/?gclid=CjwKCAiA0JKfBhBIEiwAPhZXD_YRFq0xYalNCXx2kxrR8GyVpfq2Yw5U0sfHXVm49Z2NauvWWRUi9xoC_asQAvD_BwE, 4 - <https://prom.ua/p818430088-kalij-monofosfat.html>, 5- <https://cnlygzha.en.made-in-china.com/product/pdKGZxXbErkI/China-Factory-Price-Anhydrous-Dipotassium-Phosphate-for-Alkali-Water.html>, 6- <https://esi.in.ua/product/sulfat-margancza/>, 7 - <https://prom.ua/p293371290-sulfat-magniia-magnij.html?&primelead=Ml4zNzU>, 8 - <https://prom.ua/p1716961049-zhelezo-sernokisloe-sulfat.html>, 9 - <https://prom.ua/p1026105741-glyukoza-pischevaya.html>, 10 - <https://euroimpex.all.biz/uk/drizhdzhovi-ekstrakty-drizhdzhovi-poroshky-g1706228>, 11 - <https://sil-ukraina-6882.agrobiz.net/goods/sil-ekstra-v-mishkah-50-kg-ukraina/>, 12 - <https://prom.ua/p262712020-natrij-fosfornokislyj-dvuzameschyonnyj.html?&primelead=My42>, 13 - <https://snabhim.com.ua/uk-ua/glyukoza>

Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні

Таблиця 2.3.

Біологічний агент	Концентрація токсину, мг/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворення токсину за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i> H14	147,25	96	1,53	2,33	15,82
<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i> QBT220	101,85	96	1,06	2,33	23,06
<i>Bacillus thuringiensis</i> sv2	16,0	72	0,22	0,77	48,12

Висновок: Умовну вартість розраховували від концентрації токсину. Найбільший показник має штамп H14 – 147,25. Умовна вартість 1 г у нього вийшла – 15, 82 , що є найдешевшим варіантом серед запропонованих. Також і інші характеристики у штама найліпші, тому беремо його

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.

Проведемо перевірочний розрахунок для складу ПС задля вирощування *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* – продуцента δ -ендотоксину.

Тривалість культивування 96 год.

Розрахунок джерела вуглецевого живлення:

Концентрація біомаси – 9,38 г/л

$$9,38/2 = 4,69$$

1 моль крохмалю (162) – 72 вуглецю

$$12 * 6 = 72$$

15г крохмалю - x

$$15*72/162 = 6,66$$

$$6,66 * 0,4 \text{ (40\% вуглецю на холосте окиснення)} = 1,88$$

$$4,69 + 1,88 = 6,57$$

Розрахунок джерела азотного живлення:

У соєвому шроті 25 г білку (так як, джерела азоту саме так немає). У 100г соєвого шрота міститься 46% білка, 10% білка займає азот

$$25 \text{ г} - 100\%$$

$$X - 46\%$$

$$25*46/100 = 11,5 \text{ г/л (білок)}$$

$$11,5 \text{ г} * 0,1 = 1,15 \text{ г/л (азот)}$$

Концентрація в біомасі 9,38 г/л, вміст азоту – 10% - 0,94 г/л. Кількість азоту задовольняє вимогам

2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Морфолого-культуральні ознаки:

Bacillus thuringiensis var. Israelensis – грам позитивна бактерія, яка має паличкоподібну форму. Розмір бактерії: ширина 1,0—1,2 мкм та довжина 3,0—5,0 мкм. У бактерії наявні джгутики у формі перитрихів (тобто, по всій довжині бактерії) [27]. *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* має ендоспори, а також дельта-ендотоксин (кристали якого зв'язуються з рецепторами у шлунку комах та знищують їх) [28]. Кристали можуть мати різну форму (від ромбовидної до сферичної).

Клітина стінка із пептидоглікану муреїну, потовщена [10].

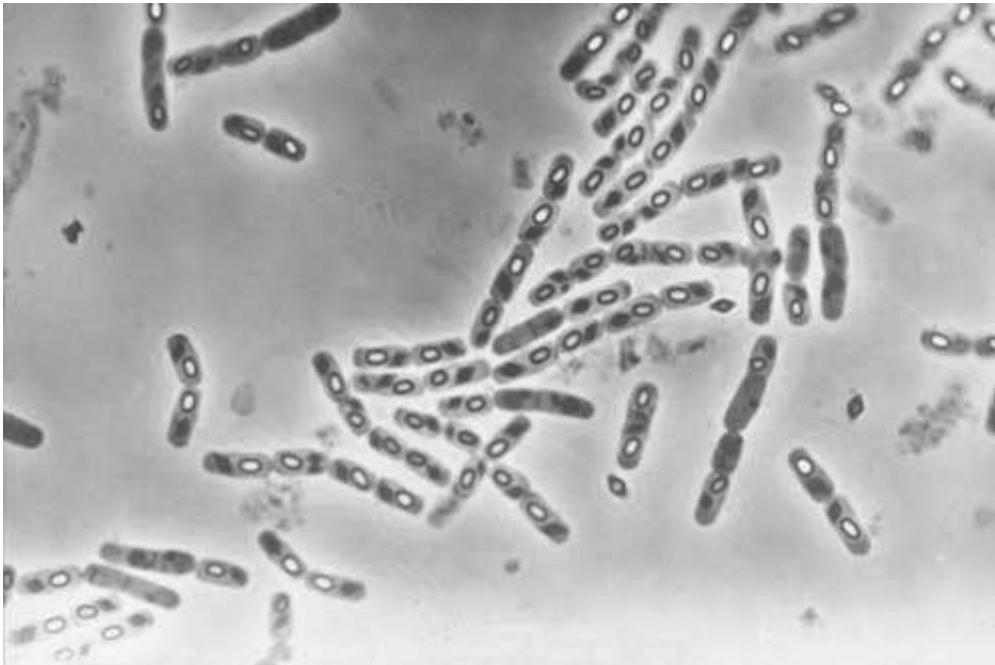


Рис. 2.1. *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* у світловому мікроскопі [29]



HD1 culture on T3 agar plate

RM11 culture on T3 agar plate



78/11 culture on T3 agar plate

Рис.2.3. колонії *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* на агаризованому середовищі [30]

Фізіолого-біохімічні ознаки: *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* - факультативний аероб (може використовувати кисень для дихання, але за його відсутності функціонує також). Температура для росту бактерії коливається (оптимальною може бути 30° або 37°), але згідно даних можна сказати, що *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* є мезофілом [27]. рН для росту мікроорганізму може варіюватись від 5,5 до 7. Максимальний ріст та вироблення біомаси спостерігались при рН 7, тому *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* є нейтрофілом [31].

Bacillus thuringiensis var. *Israelensis* хемоорганогетеротроф (це означає, що як джерело енергії, донор електронів та джерело вуглецю він використовує органічні

речовини). Зазвичай, звичайним джерелом вуглецю для *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* є глюкоза, целюлоза, рибоза та ін [33].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетична класифікація для *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [33].

Домен - *Bacteria*

Тип - *Bacillota*

Клас - *Bacilli*

Порядок - *Bacillales*

Родина - *Bacillaceae*

Рід - *Bacillus*

Вид - *Bacillus thuringiensis*

Підвид - *Bacillus thuringiensis var. Israelensis*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.

3.1. Потреба в цільовому продукті

Потреба у біоінсектицидах на сьогоднішній день визначається великою кількістю комах шкідників, які негативно впливають на врожай. Близько 40% сільськогосподарських культур у всьому світі страждає від шкідників комах (особливо від попелиці, білокрилки, колорадського жука та ін.). Це створює потребу в гербіцидах та інсектицидах – представниками якого є препарати на основі *Bacillus thuringiensis var. Israelensis*. У 2021 році в Україні було виготовлено 35,2 тис. тонн інсектицидів. З них 21,6 тис. тонн (61,4%) становили хімічні інсектициди, 12,9 тис. тонн (36,8%) - біологічні інсектициди [34].

Препарат Бактицид не виготовляється в Україні, тому ставимо статистику згідно іншого препарату Бітоксисабациліну, який виробляє українська компанія БТУ. Згідно інструкції та попри великий спектр застосування беремо декілька продуктів – капуста, буряк, цибуля.

Концентрація бактерій у препараті: $1,0 \times 10^9$ КУО/см³ [35]

Згідно даних, у 2021 р площа посівів овочів відкритого ґрунту була 452,8 тис. га (помідори, капуста, огірки, цибуля та ін.) [36], 68 тис. га яких представляла капуста [37].

Згідно інструкції використання – для капусти достатньо 2-4 обробок з інтервалом у 5-10 днів. Кількість препарату на 1 обробку – 3-4 літра [38]

Площа посівів цукрового буряка 226 тис га., інструкція з використання повторює інструкцію до капусти [39].

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Савич А.Я.						21	95
Перевір.	Воронцов О.О.					Кафедра БТМ		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Площа посівів цибулі складала 55,8 тис. га цибулі., інструкція з використання повторює інструкцію до капусти [37].

Згідно з інструкцією норми витрат за 1 обробку становлять: 35-70 мл/ 2-4л води [38].

Потреба сільськогосподарської промисловості у препараті Бітоксимаціліні

Таблиця 3.1

Сільсько господарськ а культура	Площі посівів, тис. га	Кількість препарату для однієї обробки 1 га поля, л/га	Кількість обробок за період вегетації	Сумарна кількість препарат у для 1 га поля, л/га	Необхідний об'єм препарату для обробки поля у період вегетації, м3
1	2	3	4	5	6
Капуста	68	3	3	9	612
Цукровий буряк	226,6	4	3	12	2719,2
Цибуля	55,8	3	3	9	502,2
					Всього: 3833,4

3.2. Розрахунок потужності виробництва.

Згідно даних інструкцій, форми препарату для захисту рослин від комах мають рідку консистенцію, та використовуються загалом розпилом. Загалом до України імпортуються такі препарати: Bacticide, Dipel, XenTari та ін. Бітоксимацілін виготовляється українською компанією БТУ. Експорт цього препарату складає 1.3 м3.

На 20% не задовольняються потреби ринку:

$$G_{\text{гп}} - 3833,4 * 0,20 = 766,6 \text{ м3}$$

У промислових масштабах найкращим продуцентом для отримання клітин є *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* H14. Синтезувальна здатність якого складає 9,38 г/л за 96 год культивування.

$$120 \text{ робочих днів} / 4,4 = 27 \text{ циклів}$$

$$V_{\Gamma} = 766,6 / 27 = 30 \text{ м}^3$$

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

Щоб забезпечити потреби у клітинах бактерії, їх кількість повинна становити 30 м³. Розрахуємо обсяг культуральної рідини, яку потрібно отримати за один цикл ферментації, а також визначимо кількість етапів підготовки посівного матеріалу.

Кількість робочих днів (Трд) буде 120. Таким чином, кількість цільового продукту на добу складатиме:.

Кількість продукту за один цикл ($V_{кр}$) становитиме:

$$120 \text{ робочих днів} / 4,4 = 27 \text{ циклів}$$

$$V_{\Gamma} = 766,6 / 27 = 30 \text{ м}^3$$

Коли ми визначили об'єм куральтуральної рідини за один цикл і знаємо коеф. заповнення K_3 , потрібно визначити V_f - геометричний об'єм ферментера:

$$V_f = V_{цк} / K_3 = 30 / 0,6 = 50 \text{ м}^3$$

Звіряючись з таблицею геометричних об'ємів ферментерів, найближчим за об'ємом є ферментер $V_f = 50 \text{ м}^3$

$$30 / 50 = 0,6$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За 1 виробничий цикл отримуємо 30 м³ культуральної рідини (див. п.1.3). Коли одержується культуральна рідина, то можливі втрати в результаті краплевиносу від 10 до 15%.

Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{роб.1} = V_{кр} * (1 + E_f) = 3 * 1,1 = 33 \text{ м}^3$$

Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює 33 м³. Вибраний коефіцієнт заповнення 0,6, геометричний об'єм ферментера становить:

$$V_f = 33 / 0,6 = 55 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{ст1} = 50 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{з1} = 33 / 50 = 0,66.$$

Коефіцієнт заповнення у потрібних нам межах для аеробних процесів (0,55-0,65), тобто геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Посівний матеріал для ферментера буде становити 10% від об'єму поживного середовища.

Для засіву $V_{роб.1} = 30 \text{ м}^3$ середовища необхідно приготувати

$$V_{пм1} = V_{роб.1} * X_f = 30 * 0,1 = 3 \text{ м}^3$$

з посівного матеріалу, де $X_f = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

А це означає, що об'єм ПС для ферментера буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} - V_{пм1} = 33 - 3 = 30 \text{ м}^3$$

Беручи до уваги, що під час отримання 3 м³ інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено через краплинонос через колектор відпрацьованого повітря, об'єм посівного матеріалу та поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} * (1 + E_{ф}) = 3 * 1,1 = 3,3 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту 3,3 м³ при коефіцієнті заповнення 0,6 отримується в інокуляторі об'ємом: $V_{па2} = 3,3 / 0,6 = 5,5 \text{ м}^3$

Беремо найближчий за об'ємом ферментер $V_{ст2} = 5 \text{ м}^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з2} = 3,3 / 5 = 0,66$. Коефіцієнт заповнення, (що ми уточнювали) є у вибраних межах для аеробних процесів (0,55-0,65), отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно. Необхідна кількість ПМ для інокулятора 10 % від об'єму ПС. Тому, задля засіву $V_{роб.2} = 3,3 \text{ м}^3$ необхідно приготувати:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} * X_{ф} = 3 * 0,1 = 0,3 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу}$$

Об'єм поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} - V_{пм2} = 3,3 - 0,3 = 3 \text{ м}^3$$

Врахуємо, що під час одержання 0,3 м³ (300 л) інокуляту в інокуляторі близько 10% культ. рід. можуть бути втрачені через краплинонос через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього, об'єм ПМ та ПС в інокуляторі буде:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} * (1 + E_{ф}) = 0,3 * 1,1 = 0,33 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту 0,33 м³ за коефіцієнта заповнення 0,6 отримується в посівному апараті об'ємом: $V_{па2} = 0,33 / 0,6 = 0,55 \text{ м}^3 = 550 \text{ л}$. Обираємо апарат $V_{ст3} = 500 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з.3} = 330/500 = 0,66$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, а це означає, що геометричний об'єм посівного апарату обрано вірно.

Кількість потрібного ПМ 10 % від об'єму ПС. Для засіву поживного середовища об'ємом 400 л необхідно:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} * X_{ф} = 300 * 0,1 = 30 \text{ л посівного матеріалу}$$

Що означає, що об'єм ПС в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} - V_{пм3} = 330 - 30 = 300 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 33 л посівного матеріалу в інокуляторі 10 % культуральної рідини буде. Це означає що об'єм ПМ та ПС в інокуляторі буде:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} * (1 + E_{ф}) = 30 * 1,1 = 33 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 33 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 отримується в інокуляторі об'ємом: $V_{ін2} = 33/0,6 = 55 \text{ л}$. Найближчий за об'ємом інокулятор $V_{ст4} = 50 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з.4} = 33/50 = 0,66$. Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, а отже геометричний об'єм інокулятора обрано вірно.

Посівний матеріал становить 10 % від об'єму ПС. Для засіву інокулятора необхідно підготувати:

$$V_{пм4} = V_{роб.3} * X_{ф} = 30 * 0,1 = 3 \text{ л}$$

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс4} = V_{роб.4} - V_{пм4} = 33 - 3 = 30 \text{ л}$$

Врахуємо, що під час одержання 27 л інокуляту в інокуляторі близько 10 % культ. рід. може бути втрачено через краплинонос, який відбувається через колектор повітря, яке було відпрацьовано. А отже об'єм ПС та ПМ в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.5} = V_{пм3} * (1 + E_{ф}) = 3 * 1,1 = 3,3$$

Об'єм інокуляту 4,84 л за коефіцієнта заповнення 0,6 отримується в інокуляторі об'ємом: $V_{ін2} = 3,3 / 0,6 = 5,5$ л

Найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{ст5} = 5$ л

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{з.5} = 3,3 / 5 = 0,66$. Коефіцієнт уточнення заповнення перебуває у необхідних межах, тому геометричний об'єм інокулятора обрано правильно.

Що означає об'єм ПС в інокуляторі буде становити:

$$V_{пм5} = V_{роб.3} * X_{ф} = 3 * 0,1 = 0,3 \text{ л}$$

А це означає, що поживне середовище в посівному апараті буде:

$$V_{пс5} = V_{роб.4} - V_{пм4} = 3 - 0,3 = 2,7 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу $V_{пм5} = 0,3$ л (300 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням бактерій в колбах, які будуть на качалках. Для цього будуть використовувати колби $V_{колб} = 750$ мл з $K_{зк} = 0,2$.

К-ть колб буде становити:

$$N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} * K_{зк}) = 300 / (750 * 0,2) = 2 \text{ колби}$$

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Bacillus thuringiensis var. Israelensis використовує як джерело вуглецю органічні речовини, а саме крохмаль. Тому, згідно цього і використовуючи онлайн базу даних KEGG був наведений шлях Ембдена-Мейєргофа для бактерії *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* [40].

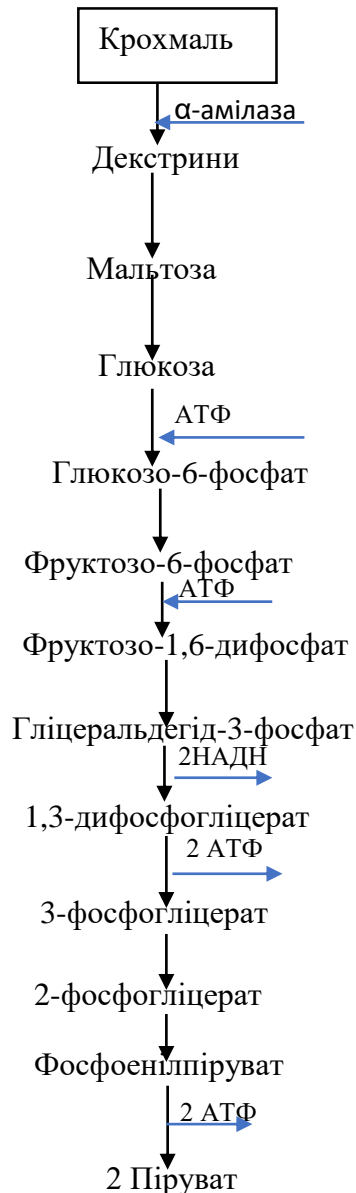
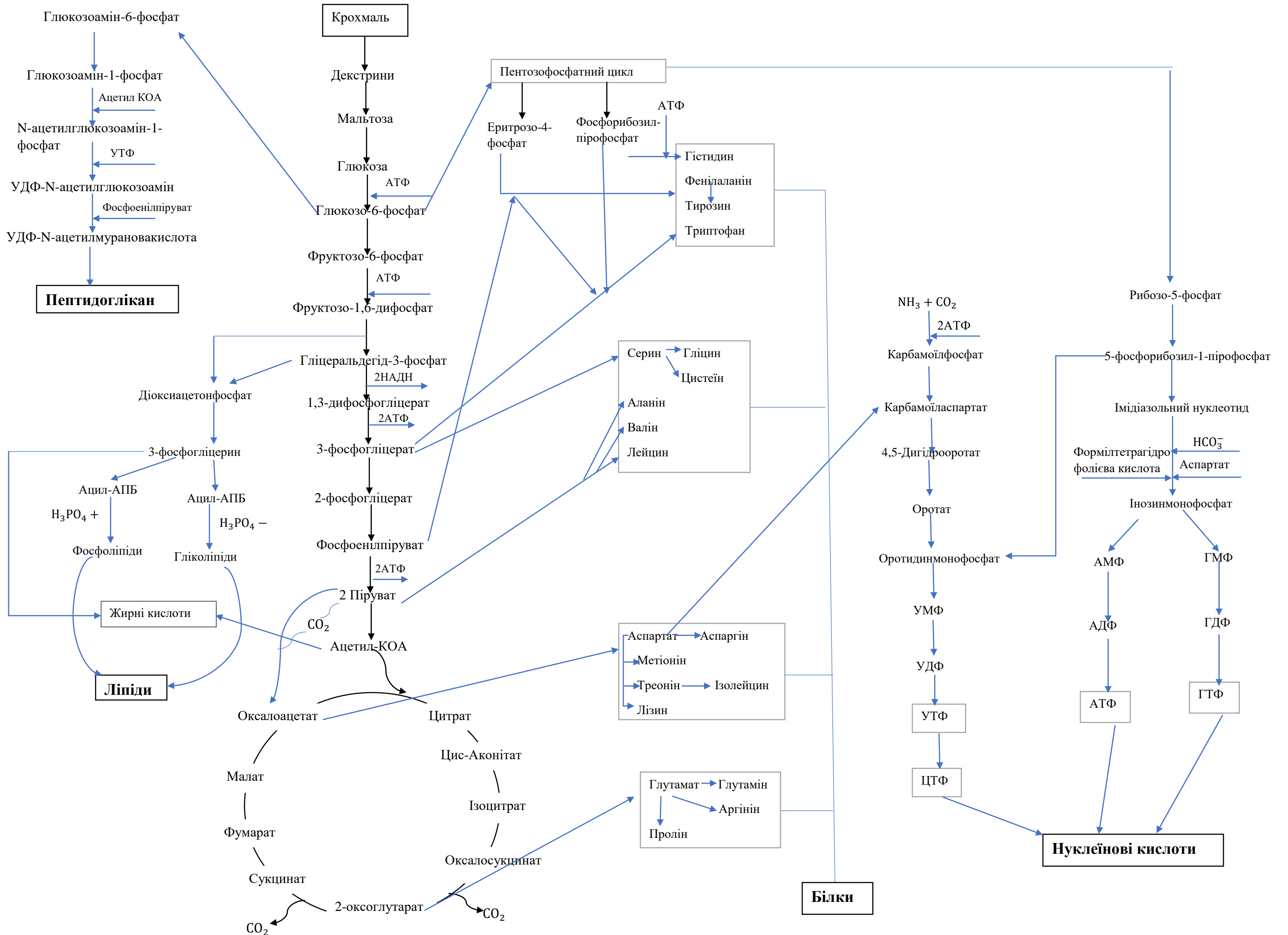


Рис. 4.1. Схема катаболізму крохмалю у *Bacillus thuringiensis var. Israelensis*

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Савич А.Я.				Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Воронцов О.О.						28	95
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт



РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* буде здійснюватися глибинним способом. Для бактерій цей спосіб є доволі оптимальним – цей процес легко піддається автоматизації та є менш трудомістким. Оптимальна температура росту мікроорганізму 30° та при рН 7, а також аерація. Щоб запобігти контамінації необхідно забезпечити асептичні умови задля унеможливлення потрапляння сторонніх мікроорганізмів до нашого.

Безперервний спосіб культивування не підходить – кристалічні білки утворюються під час стаціонарної фази росту [41], саме тому будемо використовувати періодичний спосіб культивування.

Отже, вирощування *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* проводять глибинним періодичним способом культивування із дотриманням асептичних умов та аерації.

Ферментер для культивування повинен бути оснащений мішалкою для підтримання оптимальних умов росту, а також сорочкою для підтримки достатньої температури та охолодження. Також будемо застосовувати барботер для підтримки аерації.

Ферментер обладнаний датчиком рН, температури, тиску та аерації, а також трубами для відбору та забору проб.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Bacillus thuringiensis var. Israelensis є факультативним аеробом, це означає, що ферментації буде проходити за безперервної подачі простерилізованого аераційного повітря через барботер.

Для стерилізації повітря використовують УФ-випромінювання та фільтрують через фільтри НЕРА, щоб позбутися великих часточок можливих мікроорганізмів.

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Савич А.Я.					30	95
Перевір.		Воронцов О.О.						
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

Підготовку стерильного стисненого аераційного повітря для біореакторів здійснюють наступним чином:

- Забір повітря з атмосфери здійснюється за допомогою вертикальної труби, яка містить повітрязабірник на висоті 2-3 м від даху будівлі.
- Для попередньої стерилізації від пилу, аерозолів, великий часток використовують глибинні фільтри
- Після цього повітря потряпляє на турбкомпресор, де піддається стисканню не менше 0,2 МПа, таке повітря має підвищену температуру
- Тому потім воно подається у водяний теплообмінник для охолодження
- Видалення конденсованої вологи у ресивері
- Для очищення повітря, що подається до усіх ферментерів цеху і видалення до 98% мікроорганізмів очищення проводять на головних фільтрах, які заповнюються набивним волокном
- Повітря, яке було очищене індивідуальними фільтрами, надходить через колектор і від головних фільтрів. В індивідуальних фільтрах застосовують тканину Петрянова на основі перхлорвінолового волокна.

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Мийні та дезінфікуючі застосовуються для обробки поверхні, рук персоналу та при прибиранні – звичайному та генеральному. Рекомендується чергувати засоби кожні 1-3 місяці, щоб бактерії не звикали до них.

Мийні та дезінфікуючі засоби

Таблиця 5.1

Назва миючого-дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття	Концентрація робочого розчину, %	Джерело
<p>Засіб дезінфекційний «Соліклор» («Solikloor»), (др.: натрієва сіль дихлоізоціанурової кислоти - 80,0-85,0%)</p>	<p>Поверхні приміщень та обладнання</p>	<p>В основному в концентрації з 0,01% до 0,3% за активним хлором в залежності від сфери застосування. Проти збудників, які можуть утворювати спори – в концентрації з 0,5% до 3,0% за активним хлором.</p>	<p>[42, 43]</p>
<p>Засіб дезінфікуючий «ДАНОКСИН» (др.: перкарбонат натрію-50-55%</p>	<p>Поверхні приміщень та обладнання</p>	<p>55%</p>	<p>[42, 44]</p>

тетраацетилетилендіамін-18-25%)			
Засіб миючий «Велідез» (др.: алкілдиметилбензиламонію хлорид - 18,0±2,0%, 2-пропанол - 10,0 ±1,0%)	Поверхні приміщень та обладнання	80%	[42, 45]

Опис мийних та дезінфікуючих засобів.

Препарат **Соліклор** володіє високими властивостями, що забезпечують знищення широкого спектра бактерій, включаючи грампозитивні і грамнегативні (такі як *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *MRSA*), а також збудників хвороб, таких як дизентерія, паратиф, спороутворюючі мікроорганізми роду *Bacillus* та сальмонельоз і інші. Крім того, він виявляє віруліцидну (включаючи аденовірусні, ентеровірусні, респіраторно-синцитіальні, ротавірусні, риновірусні), фунгіцидну (проти грибів роду *Candida* і дерматофітів, а також усуває цвіль) активність.

Для використання водних робочих розчинів Соліклор у таблетках рекомендується зазвичай у концентрації від 0,01% до 0,3% за активним хлором. Для боротьби зі спороутворюючими мікроорганізмами використовують концентрації з 0,5% до 3,0% за активним хлором.

Нормальна витрата робочого розчину становить 100 мл на квадратний метр поверхні. Методи застосування включають протирання, зрошення, заповнення (в тому числі в СІР мийках), замочування та занурення. Гранульована форма може використовуватися для очищення санітарно-технічного обладнання та дезінфекції біологічних рідин перед утилізацією [43].

Даноксин - це порошок, призначений для використання для дезінфекції перед стерилізацією та очищенням обладнання. Він має такі характеристики:

- Його робочі розчини володіють ефективними властивостями очищення, миття, емульгування, видалення жиру та нейтралізації запахів.
- Даноксин ефективний у видаленні біоплівки.
- Робочі розчини проявляють бактерицидну, віруліцидну (випробувався на вірусах поліомієліту), туберкулоцидну, фунгіцидну та спороцидну дію.
- При розчиненні активні речовини виділяють активний кисень [44].

Велідез з ензимами - це концентрат, призначений для дезінфекції та миття поверхонь, високорівневої дезінфекції та передстерилізаційного очищення робочого обладнання. Він містить комплекс ензимів - протеазу, амілазу, ліпазу, а також антикорозійний комплекс, і не містить окислювачів. Засіб легко розчиняється у воді.

Особливості включають наступне:

Робочі розчини мають хороші миючі, дезодоруючі, емульгуючі властивості, не пошкоджують різні поверхні та вироби, включаючи ті, що виготовлені з різних матеріалів, таких як кераміка, металокераміка, гума, скло.

Засіб володіє бактерицидними, туберкулоцидними, спороцидними, віруліцидними, фунгіцидними властивостями і здатний знищувати бактерії та віруси протягом 2 хвилин (застосовується 3% робочий розчин: 30 мл на 1,0 л води) [45].

Розрахунок ефективності використання дезінфікуючих та миючих засобів

Таблиця 5.2.

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчину, Е _{дз} , Грн/м ²
Соліклор	Миття та дезінфекція технологічного обладнання, поверхні приміщень (підлога, стіни, двері, крани)	0,5%	468	468	0,1	46,8
Даноксин	Поверхні, стіни, вікна, Двері, підлога	0,1%	760	760	0,1	76
Велідез	Підлога, стіни, стеля, двері, віконні, рами, меблі та лабораторні прилади	0,1%	510	510	0,1	51

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Інокулянт отримують у 5 етапів: в колбах на качалках (300 мл), в інокуляторах 3, 30, 300 л та 3 м³, а також в ферментері об'ємом 30м³.

Середовище для культивування:

Крохмаль – 15 г/л

Соєвий шрот – 25 г/л

CaCO₃ – 20 г/л

KH₂PO₄ – 1 г/л

K₂HPO₄ – 1 г/л

MnSO₄ · 7 H₂O – 0,01 г/л

$MgSO_4$ – 3 г/л

$FeSO_4$ - 0,01 г/л

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках на 300 мл

Стерилізація середовища буде здійснюватися в автоклаві. Ділимо середовище на такі композиції:

Композиція А: крохмаль та соєвий шрот стерилізують при 112°, тиск 0,05 МПа, 20 хв.

Композиція Б: $CaCO_3$ стерилізується окремо - 131°, 40 хв.

Композиція В: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 - стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Композиція Г: $MgSO_4$ – стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Композиція Д: $FeSO_4$, $MnSO_4 \cdot 7 H_2O$ - стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Крохмаль та соєвий шрот готуються окремо. Спочатку суспендуються у холодній воді, а потім розварюються (крохмаль - 60°, соєвий шрот - 80°), 30 хвилин.

$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ та $FeSO_4$ треба готувати у вигляді 1% розчинів, не можна зважити.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці 300 мл

Таблиця 5.3.

Компонент поживного середовища	Вміст г/л	Кількість для приготування 300 мл сер., г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	15	4,5	А	88

Соевий шрот	25	7,5		
Вода		88		
CaCO ₃	20	6,0	Б	24
Вода		24		
K ₂ HPO ₄	1	0,3	В	29,4
KH ₂ PO ₄	1	0,3		
Вода		29,4		
MgSO ₄	3	0,9	Г	50
Вода		50		
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0 1	0,003	Д	49
FeSO ₄	0,0 1	0,003		
Вода		49		
Усього				0,3

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

Вирощування інокуляту в інокуляторі 5 л

Композиція А: крохмаль та соєвий шрот стерилізують при 112°, тиск 0,05 МПа, 20 хв.

Композиція Б: CaCO₃ стерилізується окремо - 131°, 40 хв.

Композиція В: KH₂PO₄, K₂HPO₄ - стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Композиція Г: FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄ · 7 H₂O - стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Крохмаль та соєвий шрот готуються окремо. Спочатку суспендуються у холодній воді, а потім розварюються (крохмаль - 60°, соєвий шрот - 80°), 30 хвилин.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Vf = 5 л

Таблиця 5.4.

Компонент поживного середовища	Вміст г/л	Кількість для приготування 3 л сер., г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Крохмаль	15	45	А	880
Соєвий шрот	25	75		
Вода		880		
CaCO ₃	20	60	Б	240
Вода		240		
K ₂ HPO ₄	1	3	В	194
KH ₂ PO ₄	1	3		
Вода		194		
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,03	Г	1490
MgSO ₄	3	9		
FeSO ₄	0,01	0,03		
Вода		1340		
Конденсат		150		
Усього		5		3

Вирощування інокуляту в інокуляторі 50 л

Композиція А: крохмаль та соєвий шрот стерилізують при 112°, тиск 0,05 МПа, 20 хв.

Композиція Б: CaCO₃ стерилізується окремо - 131°, 40 хв.

Композиція В: KH₂PO₄, K₂HPO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄ · 7 H₂O - стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Крохмаль та соєвий шрот готуються окремо. Спочатку суспендуються у холодній воді, а потім розварюються (крохмаль - 60°, соєвий шрот - 80°), 30 хвилин.

Також до композиції В додаємо 6% HCl (приблизно 2 мл/л) до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Vf = 50 л

Таблиця 5.5

Компонент поживного середовища	Вміст г/л	Кількість для приготування 30 л сер.,	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Крохмаль	15	450	А	8800
Соєвий шрот	25	750		
Вода		7800		
Конденсат		1000		
CaCO ₃	20	600	Б	4400
Вода		3 900		
Конденсат		500		
K ₂ HPO ₄	1	30	В	14849
KH ₂ PO ₄	1	30		
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0 1	0,3		

MgSO ₄	3	90		
FeSO ₄	0,0 1	0,3		
Вода		13 349		
Конденсат		1500		
Усього				30

Вирощування інокуляту в інокуляторі 500 л

Композиція А: крохмаль та соєвий шрот стерилізують при 112°, тиск 0,05 МПа, 20 хв.

Композиція Б: CaCO₃ стерилізується окремо - 131°, 40 хв.

Композиція В: KH₂PO₄, K₂HPO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄ · 7 H₂O - стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Крохмаль та соєвий шрот готуються окремо. Спочатку суспендуються у холодній воді, а потім розварюються (крохмаль - 60°, соєвий шрот - 80°), 30 хвилин.

Також до композиції В додаємо 6% HCl (приблизно 2 мл/л) до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Vf = 500 л

Таблиця 5.6

Компонент поживного середовища	Вміст г/л	Кількість для приготування 300 л сер., г	Композиції	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	15	4500	А	88000

Соевий шрот	25	7500		
Вода		78 000		
Конденсат		10000		
CaCO ₃	20	6000	Б	44000
Вода		39 000		
Конденсат		5000	В	148494
K ₂ HPO ₄	1	300		
KH ₂ PO ₄	1	300		
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0 1	3		
MgSO ₄	3	900		
FeSO ₄	0,0 1	3		
Вода		133 494		
Конденсат		15000	1500	
Усього				300

Вирощування інокуляту в інокуляторі 5м3

Композиція А: крохмаль та соєвий шрот стерилізують при 112°, тиск 0,05 МПа, 20 хв.

Композиція Б: CaCO₃ стерилізується окремо - 131°, 40 хв.

Композиція В: KH₂PO₄, K₂HPO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄ · 7 H₂O - стерилізуємо при 131°, 40 хвилин.

Крохмаль та соєвий шрот готуються окремо. Спочатку суспендуються у холодній воді, а потім розварюються (крохмаль - 60°, соєвий шрот - 80°), 30 хвилин.

Також до композиції В додаємо 6% HCl (приблизно 2 мл/л) до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Vf = 5 мЗ

Таблиця 5.7

Компонент поживного середовища	Вміст г/л	Кількість для приготування 3мЗ сер., кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Крохмаль	15	45	А	880
Соевий шрот	25	75		
Вода		780		
Конденсат		100		
CaCO ₃	20	60	Б	440
Вода		390		
Конденсат		50		
K ₂ HPO ₄	1	3	В	1490
KH ₂ PO ₄	1	3		
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0	0,03		
	1			
MgSO ₄	3	9		
FeSO ₄	0,0	0,03		
	1			
Вода		1340		
Конденсат		150		
Усього				3мЗ

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу Vf = 50м3

Композиція А: крохмаль та соєвий шрот, CaCO₃ KH₂PO₄, K₂HPO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄ · 7 H₂O - стерилізуємо в УБС при 145°, 10 хвилин.

Крохмаль та соєвий шрот готуються окремо. Спочатку суспендуються у холодній воді, а потім розварюються (крохмаль - 60°, соєвий шрот - 80°), 30 хвилин.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері 50 м3

Таблиця 5.8

Компонент поживного середовища	Вміст г/л	Кількість для приготування 50м3 сер.,	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Крохмаль	15	450	А	28049
Соевий шрот	25	750		
CaCO ₃	20	600		
K ₂ HPO ₄	1	30		
KH ₂ PO ₄	1	30		
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0 1	0,3		
MgSO ₄	3	90		
FeSO ₄	0,0 1	0,3		
Вода		23841		
Конденсат		4208		
Усього				30

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Для регуляції культивування використовують 6%-і розчини HCl і NaOH . Щоб унеможливити випадання в осад фосфорних солей. Для регулювання рН у процесі культивування додають NaOH .



Рис. 5.1. – вакуум випарка [46]

5.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Задля виготовлення бактерицидного препарату у вигляді концентрату, використовують такі процеси:

1. Концентрування культуральної рідини
2. Мікробіологічний контроль

3. Маркування та фасування

1 етап – концентрування культуральної рідини

Концентрування культуральної рідини є процесом зменшення об'єму рідини, у якій вирощують мікроорганізми або клітини, зберігаючи при цьому їхні властивості.

Для цього використаємо концентрування вакуум-випаровуванням.

Вакуум-випаровування є одним із методів концентрування культуральної рідини з метою вилучення води та збереження живих мікроорганізмів.

Випарювання в умовах пониженого тиску, яке реалізується за допомогою вакуум-випарки, включає створення вакууму в апараті шляхом конденсації вторинної пари у спеціальному конденсаторі та видалення несконденсованих газів за допомогою вакуумного насоса. Цей метод дозволяє знизити температуру

кипіння розчину. Використання вакууму дозволяє збільшити різницю температур між нагрівальним агентом і розчином, зменшуючи відповідно поверхню теплообміну.

2 етап – мікробіологічний контроль

На цьому етапі перевіряють кількість живих клітин бактерії методом висівання їх на чашку Петрі.

3 етап – Фасування та маркування

Після завершення всіх стадій післяферментаційних процесів, концентрат розливають у каністри, фасують та маркують, наносячи етикетку.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрязабірник	1	Проточні повітрязабірники серії 5.903-20 і 5.903-2, які належать до типу А1І, встановлюються як горизонтально, так і вертикально. [47]
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючим матеріалом виступає поліестер, шв. Фільтр. 3 м ³ /год, Е = 80 %[48].
К – 3	Компресор	1	Компресор серії «ВКП F Industrial». Кількість циліндрів/ступенів стиснення 2/2 Продуктивність, вхід л/хв 500 Продуктивність, вихід л/хв: 330 Тиск нагнітання (мах), атм 10 Потужність приводного електродвигуна, кВт 3,0 Напруга живлення, 380 Маса (кг) 122 [49].

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Савич А.Я.				Розділ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Воронцов О.О.						46	95
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Продовження таблиці 6.1

ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Витрата: до 640 м ³ /год Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195 °С- +220 °С Нержавіюча сталь AISI 316 [50].
Р – 5	Ресивер	1	Виробник: ЗЕЛКО, Україна Робоче середовище: Повітря/азот Номінальний робочий тиск: 11,5 бар Габаритні розміри: Діаметр x Довжина 638 x 1800 мм [51].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Кількість повітря, м ³ /год: 7500 Необхідна теплова потужність, кВт (від -100С до +200С): 80 кВт [52].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтри повітряні касетні. Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; E>95% [53].
РЗ-8	Реактор - змішувач	1	Реактор-змішувач на 10 л: Технічні характеристики: • Підйомник для простоти відкриття реактора, очищення, заміни мішалки

Продовження таблиці 6.1

			<ul style="list-style-type: none"> • Сорочка на корпусі реактора (стінки реактора є трьохшаровими) з можливістю проведення реакцій при -90°C • Ректифікаційна система • Система для відбирання проб • рН електроди та інші • Форсунка для очищення обладнання на місці (clean in place - СІР) <p>[54]</p>
<p>ОВД-9</p> <p>ОВД-11</p> <p>ОВД-14</p> <p>ОВД-16</p> <p>ОВД-19</p> <p>ОВД-21</p> <p>ОВД-24</p> <p>ОВД-26</p> <p>ОВД-29</p> <p>ОВД-31</p> <p>ОВД-33</p> <p>ОВД-35</p> <p>ОВД-37</p> <p>ОВД-39</p> <p>ОВД-40</p>	<p>Об'ємно-ваговий дозатор</p>	<p>15</p>	<p>Дозатор марки ДВСВ-50. Дозатор з гравітаційним типом. Виробляє: Україна[55].</p>
<p>РЗ-10</p>	<p>Реактор - змішувач</p>	<p>1</p>	<p>Реактор-змішувач 5л: Технічні характеристики: Матеріал скла - GG-17 (ТЗ);</p>

Продовження таблиці 6.1

			<p>Матеріал рами – Нержавіюча сталь марки 304;</p> <p>Метод переміщення - Універсальні колеса з ножним гальмом;</p> <p>Місткість – 5л;</p> <p>Об'єм оболонки - 2л;</p> <p>Діапазон робочих температур -120-300°C;</p> <p>Ступінь вакуумізації – 0.098Мра;</p> <p>Швидкість перемішування - 0 - 600 об/хв;</p> <p>Діаметр валу перемішування (мм) – 8 мм;</p> <p>Потужність двигуна - 180 (Вт)</p> <p>Живлення, (Напруга / частота) - 220 В / 50 Гц;</p> <p>Розмір установки (мм*мм*мм) – 350*410*1250;</p> <p>Розмір упаковки (мм*мм*мм) – 1380*500*400;</p> <p>Маса брутто – 38 (кг)</p> <p>[56]</p>
<p>НВ-12</p> <p>НВ-17</p> <p>НВ-22</p> <p>НВ-27</p> <p>НВ-41</p>	<p>Насос</p> <p>відцентровий</p>	<p>7</p>	<p><u>Циркуляційний насос</u></p> <p><u>Grundfos</u></p> <p>Насос відцентровий герметичний , матеріал чугун.</p> <p>Продуктивність від 3,2 м³ /год,</p>

Продовження таблиці 6.1

<p>НВ-43 НВ-54</p>			<p>Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія[57]. <u>Циркуляційний насос Wilo Star- RS15/4-130</u> Насос відцентровий герметичний , матеріал сірий чавун Продуктивність від 4 м³ /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Німеччина [58]. <u>Циркуляційний насос Wilo Yonos Pico1.0 25/1-8</u> Насос відцентровий герметичний , матеріал чавун Продуктивність від 4,4 м³ /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Німеччина [59] <u>Циркуляційний насос Wilo Yonos MAXO 25/0,5-12</u> Насос відцентровий герметичний , матеріал Сірий чавун з покриттям KTL Продуктивність від 11,7 м³ /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Німеччина[60]</p>
<p>РЗ-13</p>	<p>Реактор - змішувач</p>	<p>1</p>	<p>Реактор-змішувач 100 л: Технічні характеристики: Тип резервуара за кількістю стінок: Двостінний</p>

Продовження таблиці 6.1

			<p>Тип резервуара за кількістю секцій: Односекційний</p> <p>Матеріал резервуара: Нержавіюча сталь</p> <p>Сорочка для обігріву або охолодження;</p> <p>Робота під тиском</p> <p>Термоізоляція;</p> <p>Гомогенізатор;</p> <p>Датчики для контролю ваги;</p> <p>Пульт керування нагріванням, охолодженням;</p> <p>[61]</p>
<p>P3-15 P3-34</p>	<p>Реактор - змішувач</p>	<p>2</p>	<p>Реактор-змішувач 50 л:</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> – теплообмінна (з вбудованими ТЕН) та теплоізолююча сорочки корпусу; – відкидна кришка корпусу з ручним приводом та газовими амортизаторами; - мішалка з плаваючими скребками; - Вакуум система; <p>Робочий тиск у корпусі, бар від – 0,7 до атмосферного</p> <p>у сорочці, бар атмосферне</p> <p>габаритні розміри, мм</p> <p>довжина 900</p>

Продовження таблиці 6.1

			ширина 1156 висота 1510 ±20 Маса, не більше, кг 215 [62]
РЗ-18	Реактор - змішувач	1	Реактор-змішувач 1000 л: Технічні характеристики: Шорсткість оброблення поверхонь контактувальних з продуктом - Ra 0,6, Потужність реактора, кВт 5.5 Потужність рамної мішалки, кВт 5.5 Частота обертання рамної мішалки, об/хв 70 Люк завантажувальний DN 400, шт. Оглядове вікно DN 50, шт. Габаритні розміри (ДД x Ш x В), мм 1400 x 1400 x 2400 Маса, кг 700 [63]
РЗ-20 РЗ-36	Реактор - змішувач	2	Реактор-змішувач на 500 л: Технічні характеристики: Модель: РМХ-500 Об'єм ємності: 500 л. Потужність електродвигуна: 0,37 кВт.

Продовження таблиці 6.1

			<p>Швидкість обертання номінальна: 0 - 300 об/хв.</p> <p>Швидкість обертання короткочасна (до 5 хв): до 600 об/хв.</p> <p>Кількість пропелерів: 1 шт.</p> <p>Діаметр пропелера: 350 мм.</p> <p>Матеріал пропелерів та валу: нержавіюча сталь AISI 304</p> <p>Маса мішалки: 12 кг</p> <p>[64]</p>
P3-23	Реактор - змішувач	1	<p>Реактор змішувач на 10000 л:</p> <p>Номінальний внутрішній тиск 6 бар/повний вакуум при температурі від -29 до 200 град.</p> <p>Зовнішня оболонка з м'якої сталі розрахована на розрахунковий тиск 7,5 бар. Пристрій має зварні верхню та нижню головки. 3- лопатева мішалка. Пристрій має монтажне кільце з м'якої сталі.</p> <p>[65]</p>
P3-25	Реактор - змішувач	1	<p>Реактор-змішувач на 5000 л:</p> <p>Має закріплену верхню частину та зварену нижню частину.</p> <p>Внутрішній номінальний максимальний тиск 2 бар і максимальна внутрішня температура 130°C. Мішалка на</p>

Продовження таблиці 6.1

			<p>зварній рамі з тефлоновими скребками на стінках обертається зі швидкістю 3,4 об/хв і приводиться в дію через коробку передач моделі Nord SK6382VF-90 L/6 потужністю 1,10 кВт/50 Гц/400 В/1375 об/хв. двигун. Тип з'єднань верхньої головки. Центральний нижній випуск DN50 затискного типу. Встановлюється на (5) ніжках з нержавіючої сталі</p> <p>[66]</p>
33-28	Збірник - змішувач	1	<p>Збірник-змішувач об'ємом 15л:</p> <p>Технічні характеристики:</p> <p>Хімічний реактор є ємністю з нержавіючої сталі, оснащений теплоізолюваною сорочкою нагріву, приводом обертання, вузлом ущільнення. Місткість реактора має герметичні вузли завантаження та вивантаження. Щит управління обладнаний кнопками запуску та вимірювачем-регулятором нагріву, кнопкою аварійної зупинки, зупинки пристрою, що перемішує, кнопками запуску та</p>

			та системою захисту управління двигуна. [67]
33-30		1	Збірник-змішувач об'ємом 150 л: Технічні характеристики: 1. Стійкий ПТФЕ на всіх ущільнювальних компонентах забезпечує тривалий термін експлуатації й експлуатації. 2. Весь скляний посуд виготовлений із високоякісного боросилікатного скла, який стійкий до нагрівання/холоду/корозії. 3. Широкий діапазон температурних операцій, від -120 °С до 300 °С. 4. Міцна неіржавка сталь, посилена тефлонова затяжка, підходить для широкого спектра в'язких матеріалів. 5. Рама з неіржавкої сталі SS304 з колесами та гальмом. [68]
33-32	Збірник - змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 1500л: Посудина об'ємом 1500 літрів має пласку верхню частину, прикріплену болтами, і нижню

			<p>частину, що приварюється. Внутрішній номінальний максимальний тиск 1 бар при максимальній внутрішній температурі 80°C. Сорочка має максимальний тиск 3 бар при максимальній температурі 143°C. Мішалка регулюється 0-320 об / хв. Має центральний нижній розряд. [69]</p>
33-38	Збірник - змішувач	1	<p>Збірник-змішувач об'ємом 800 літрів:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Циліндрична вертикально розташована ємність. <p>Матеріал деталей контактуючих з продуктом сталь AISI316L, не контактуючих з продуктом сталь AISI304.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Чистота обробки поверхні контактуючої з продуктом $Ra \leq 0,6$. • Чистота обробки поверхні не контактуючої з продуктом $Ra \leq 0,8$ <p>Встановлення та вимірювання існуючої температури продукту та теплоносія (°C). [70]</p>

Продовження таблиці 6.1

УБС-42	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації Olimpic FT: Мінімальна ємність: 4000 кг/год Максимальна ємність: 24 000 кг/год [71]
ІН-44	Інокулятор	1	Інокулятор за геометричним об'ємом 5 л: Технічні характеристики: швидкість обертання мішалки, об/хв - 20–1500 Температура, °С - 0–150 рН - 2–12 рО ₂ , % - 0–100 Тиск (опція), бар - (-0,5) - 2 Red/Ох-потенціал (опція), мВ -2000 – 2000 [72]
Ф-45 Ф-47 Ф-49 Ф-51 Ф-53	Індивідуальний фільтр очистки повітря	5	Стерилізуючі фільтри з політетрафторетилена. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999 %.[73].
ІН-46	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 50 л: Технічні характеристики: Стерильне проведення кисневих та безкисневих процесів Контроль температури, рН, тиску

Продовження таблиці 6.1

			<p>Необхідне контрольно-вимірвальне обладнання</p> <p>Система аерації</p> <p>Система видалення піни</p> <p>Адаптований для CIP/SIP</p> <p>Управління з PLC</p> <p>[74]</p>
ІН-48	Інокулятор	1	<p>Інокулятор за геометричним об'ємом 500 л:</p> <p>Технічні характеристики:</p> <p>Шв. Перемішування - 20–1500об/хв.</p> <p>Контроль температури, рН, тиску</p> <p>Необхідне контрольно-вимірвальне обладнання</p> <p>Система аерації</p> <p>Габарити реактора:</p> <p>1500x1135x3122</p> <p>Матеріал корпусу: сталь AISI 316 L</p> <p>[75]</p>
ІН-50	Інокулятор	1	<p>Інокулятор за геометричним об'ємом 5м3:</p> <p>Технічні характеристики:</p> <p>конічна нижня частина з кутом 60 °</p> <p>Очисна труба DN 40, з розпилювальною голівкою,</p>

			<p>перфорація 360 ° з тримачем розпилювальної голівки.</p> <p>CO₂-з'єднання G³/₄ “, приварене до труби для очищення, включаючи клапан CO₂</p> <p>Люк із напірними дверцятами 340 x 440 мм.</p> <p>Зварний сальник NW 10 DIN 11851.</p> <p>Лазерна зварена подвійна оболонка для охолодження з входом / виходом 2 x 1 " ET - G1 " (зовнішні різьби BSP)</p> <p>Стоячи на приварених ніжках труб із кріпильними отворами, включаючи регулювання висоти [76]</p>
ФР-52	Ферментер	1	<p>Ферментер за геометричним об'ємом 50м³:</p> <p>Ферментер об'ємом 50 м³ виготовлений з нержавіючої сталі SS316L, оснащений сорочкою, барботером та датчиками розчиненого кисню, піни, рН і температури [77]</p>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, персоналу, приготування та стерилізація поживних середовищ та титрувальних розчинів) та технологічний процес – підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез

ДР 1 – Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. – Підготовка персоналу (спеціальний одяг, миття рук та ін.)

ДР 1.2. – Підготовка приміщень (щоденне та генеральне прибирання)

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1) з найвищої точки даху $H = 3$ м.

ДР 2.2. Очищення від грубих домішок

Попередня очистка повітря здійснюється на фільтрі грубого очищення (Ф-2). Ця очистка проводиться з ефективністю не менше $E = 90\%$, він затримує частинки діаметром більше 50 мкм.

ДР 2.3. Компресювання

Задля подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері та покращеної аерації, повітря піддається стисканню у компресорі (К-3), нагрівається до $120-200^{\circ}\text{C}$, тиск становить 0,35 МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Повітря, що стисли (від ДР 2.3) піддається охолодженню в теплообміннику-осушувачі (Т-4) до температури $25-30^{\circ}\text{C}$ для видалення надлишкової вологи.

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Савич А.Я.			Розділ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О.О.					60	95
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Волога, яка може залишитися вважається зайвою і її видаляють за допомогою ресивера (Рс-5). Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 2.5. Нагрів повітря

Повітря нагрівається у теплообміннику-нагрівачі *МНТА-15* до температури, яка буде вища від температури культивування, приблизно до 35 °С, вологість повітря буде 40 %. Предед ТН встановлюють додаткові компресор та ресивер (зادля підготовки повітря для сушарки).

ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі

Повітря після нагріву очищується в головному фільтрі TRION Forever Filter®, фільтруюча поверхня має матеріали: алюмінієві пластини, ефективність очищення досягає близько 95%.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Повітря надходить до індивідуального фільтра ОМІ 04А.0570.Н, який складається зі скловолокна, продуктивністю 300 м³/год ефективність очищення на індивідуальному фільтрі досягає 99,99%. Повітря додають у ТП 5.5, 5.6., 5.7., 5.8, 6.1.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

ДР 3.1. Підготовка розчину 6% соляної кислоти

На підприємство кислота поступає у вигляді 36%. Для того, щоб отримати 6% розчин соляної кислоти, необхідно до 6 л 36% розчину додати 640 л води.

1 л – 36%

6% - x

$36/6 = 6.$

ДР 3.2. Підготовка і стерилізація розчину 6% гідроксиду натрію

ДР 3.2.1. Для інокулятора 30 л

(Інокулятори будуть зазначені у робочому об'ємі)

Гідроксид натрію має вигляд білих непрозорих кристалів. В колбу вносимо 30 л х 2 мл 6% гідроксиду натрію = 60 мл, 6% гідроксиду натрію. Розчин лугу стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, протягом 40 хв.

ДР 3.2.2. Для інокулятора 300 л

Гідроксид натрію має вигляд білих непрозорих кристалів. В колбу вносимо 300 л х 2 мл 6% гідроксиду натрію = 600 мл, 6% гідроксиду натрію. Розчин лугу стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, протягом 40 хв.

ДР 3.2.3. Для інокулятора 3м3

Гідроксид натрію має вигляд білих непрозорих кристалів. В колбу вносимо 3м3 х 2 мл 6% гідроксиду натрію = 6 л, 6% гідроксиду натрію. Розчин лугу стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, протягом 40 хв.

ДР 4 – Підготовка поживних середовищ

4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для колб на качалках 300 мл

На даному етапі необхідно отримати 300 мл поживного середовища, об'єм композиції 0.3 мл. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування посівного матеріалу наведений у таблиці 5.3.

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А для колб на качалках

Крохмаль – 4,5 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали при температурі 60° гарячою водою. Додавали 44 мл води.

Соєвий шрот – 7,5 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали, при температурі 80° гарячою водою. Додавали 44 мл води. Композиції після розварювання з'єднували та стерилізували в автоклаві при 112°, тиску 0,05 МПа, 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б колб на качалках

На технічних терезах зважують CaCO_3 – 6,0 г – суспендують окремо, додаючи 24 мл води, а потім у колбах з ватно-марлевым коробом стерилізують в автоклаві при 131° , 40 хв, 0,15 МПа.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В колб на качалках

K_2HPO_4 – 0,3 г та KH_2PO_4 – 0,3 г зважували на технічних вагах, додавали у колби з ватно-марлевым коробом. Додають 29,4 мл води та стерилізують в автоклаві 131° , 40 хвилин, 0,15 МПа.

ДР 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г колб на качалках

На технічних терезах зважують MgSO_4 – 0,9 г/л. Додають у колби з ватно-марлевым коробом, та додають 50 мл води, стерилізують в автоклаві 131° , 40 хвилин, 0,15 МПа.

ДР 4.1.5. Приготування і стерилізація композиції Д колб на качалках

На торсійних терезах зважують $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,003 г/л, FeSO_4 – 0,003, готують у вигляді 1% розчину. Додають у колби з ватно-марлевым коробом, та додають 49 мл води, стерилізують в автоклаві 131° , 40 хвилин, 0,15 МПа.

ДР 4.1.6. Змішування композицій колб на качалках

Змішування композицій від ДР 4.1.1., 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4., 4.1.5. Відсутність мікробіоти.

4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора на 3 л

Геометричний об'єм ферментера 5 л, потрібно отримати 3л середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування посівного матеріалу наведений у таблиці 5.4.

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А для інокулятора 3л

Крохмаль – 45 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали при температурі 60° гарячою водою. Додавали 440 мл води.

Соєвий шрот – 75 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали, при температурі 80° гарячою водою. Додавали 440 мл води.

Композиції після розварювання з'єднували та стерилізували в стерилізаторі, при 112°, тиску 0,05 МПа, 30 хв. Контроль мікробіоти.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б для інокулятора 3л

На технічних терезах зважують CaCO₃ – 60 г – суспендують окремо, додаючи 240 мл води, а потім стерилізують у стерилізаторі при 131°, 40 хв, 0,15 МПа. Контроль мікробіоти.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В для інокулятора 3л

K₂HPO₄ – 3 г та KH₂PO₄ – 3 г, зважували на технічних вагах, додавали у стерилізатор 194 мл води та стерилізують в стерилізаторі 131°, 40 хвилин, 0,15 МПа. Контроль мікробіоти.

ДР 4.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г задля інокулятора 3л

На технічних терезах зважують MnSO₄ · 7 H₂ O – 0,03 г/л, MgSO₄ – 9 г/л, та FeSO₄ – 0,03 г. Стерилізують в інокуляторі, додаючи 150 мл води, 131°, 40 хвилин, 0,15 МПа. Контроль мікробіоти.

4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища задля інокулятора на 30 л

Геометричний об'єм ферментера 50 л, потрібно отримати 30 л середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування посівного матеріалу наведений у таблиці 5.5.

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А для інокулятора 30 л

Крохмаль – 450 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали при температурі 60° гарячою водою. Додавали 3900 мл води.

Соєвий шрот – 750 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали, при температурі 80° гарячою водою. Додавали 3900 мл води.

Композиції після розварювання з'єднували та стерилізували в стерилізаторі, при 112°, тиску 0,05 МПа, 30 хв. Контроль мікробіоти.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б для інокулятора 30 л

На технічних терезах зважують CaCO₃ – 600 г – суспендують окремо, додаючи 3900 мл води, а потім стерилізують у стерилізаторі, при 131°, 40 хв, 0,15 МПа. Контроль мікробіоти.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції В для інокулятора 30 л

K₂HPO₄ – 30 г та KH₂PO₄ – 30 г, MnSO₄·7H₂O – 0,3 г, MgSO₄ – 90 г, FeSO₄ – 0,3 г, зважували на технічних вагах, додавали у інокулятор 13 349 мл води та стерилізують в інокуляторі гострою парою 131°, 40 хвилин, 0,15 МПа.

До композиції В додається 6% HCl (приблизно 2 мл/л) від ДР 3.1. до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH від ДР 3.2.1. Контроль мікробіоти.

4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища задля інокулятора на 300 л

Геометричний об'єм ферментера 500 л, потрібно отримати 300 л середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування посівного матеріалу наведений у таблиці 5.6.

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А для інокулятора 300 л

Крохмаль – 4500 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали при температурі 60° гарячою водою. Додавали 39 000 мл води.

Соевий шрот – 7500 г зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали, при температурі 80° гарячою водою. Додавали 39 000 мл води.

Композиції після розварювання з'єднували та стерилізували в стерилізаторі, при 112°, тиску 0,05 МПа, 30 хв. Контроль мікробіоти.

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б для інокулятора 300 л

На технічних терезах зважують CaCO_3 – 6000 г – суспендують окремо, додаючи 39 000 л води, а потім стерилізують в стерилізаторі, при 131°, 40 хв, 0,15 МПа. Контроль мікробіоти.

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В задля інокулятора 300 л

K_2HPO_4 – 300 г та KH_2PO_4 – 300 г, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3 г, MgSO_4 – 900 г, FeSO_4 – 3 г, зважували на технічних вагах, додавали у інокулятор 133 494 мл води та стерилізують в інокуляторі гострою парою 131°, 40 хвилин, 0,15 МПа.

До композиції В додається 6% HCl (приблизно 2 мл/л) від ДР 3.1. до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH від ДР 3.2.2. Контроль мікробіоти.

4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора на 3мЗ

Геометричний об'єм ферментера 5мЗ, потрібно отримати 3мЗ середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування посівного матеріалу наведений у таблиці 5.7.

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції А для інокулятора 3м3

Крохмаль – 45 кг зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали при температурі 60° гарячою водою. Додавали 390 л води.

Соєвий шрот – 75 кг зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали, при температурі 80° гарячою водою. Додавали 390 л води.

Композиції після розварювання з'єднували та стерилізували, при 112°, тиску 0,05 МПа, 30 хв. Контроль мікробіоти.

ДР 4.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б задля інокулятора 3м3

На технічних терезах зважують CaCO_3 – 60 кг – суспендують окремо, додаючи 390 л води, а потім стерилізують у стерилізаторі, при 131°, 40 хв, 0,15 МПа. Контроль мікробіоти.

ДР 4.5.3. Приготування і стерилізація композиції В для інокулятора 3м3

K_2HPO_4 – 3 кг та KH_2PO_4 – 3 кг, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03 кг, MgSO_4 – 9 кг, FeSO_4 – 0,03, зважували на технічних вагах, додавали у інокулятор 1780 л води та стерилізують в інокуляторі гострою парою 131°, 40 хвилин, 0,15 МПа.

До композиції В додається 6% HCl (приблизно 2 мл/л) від ДР 3.1. до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH від ДР 3.2.3. Контроль мікробіоти.

4.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера на 30м3

Геометричний об'єм ферментера 50м3, потрібно отримати 30м3 середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування посівного матеріалу наведений у таблиці 5.8.

ДР 4.6.2. Приготування і стерилізація композиції А для ферментера 30мЗ

Крохмаль – 450 кг зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали при температурі 60° гарячою водою.

Соєвий шрот – 705 кг зважували на технічних терезах та суспендували у холодній воді, а потім розварювали, при температурі 80° гарячою водою.

На технічних терезах зважують CaCO_3 – 600 кг, K_2HPO_4 – 30 кг та KH_2PO_4 – 30 кг, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 кг, MgSO_4 – 90 кг, FeSO_4 - 0,3, зважували на технічних вагах додавали 23841 л води та стерилізували в УБС гострою парою 145°, 10 хвилин. Контроль мікробіо чистоти.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру штаму *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* зберігають у пробірці у середовищі зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА), пересіви здійснюються кожні 3 місяці. Температура зберігання 2-4°. Відсутність контамінуючої мікробіоти.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що ми отримали пересівають на чашку Петрі, яка містить МПА задля отримання ізольованих колоній. Культивування в термостаті при $t = 30$ °С., 48 год. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані колонії із чашки Петрі (від ТП 5.2) пересівають у пробірки зі скошеним МПА. В пробірки пересівають ізольовані колонії, вони повинні знаходитися на відстані один від одного не менше як 1 см. Культивування проходить в термостаті при $t = 30$ °С (48 год). Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 300 мл з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) зливають простерилізовані композиції Б, В, Г, Д (від ДР 4.1.2.–4.1.5.), перемішують і розливають у качалочні колби по 150 мл об'ємом 750 мл ($K_3 = 0,2$). У пробірку яка містить робочу культуру *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* (від ТП 5.3) вноситься 5 мл фізіологічного розчину, суспендуються клітини, та відбирається одержана бактеріальна суспензія та вноситься у качалочні колби з ПС. Культивують на качалках при $t = 30\text{ }^\circ\text{C}$ (48 год), 150 об./хв. Відсутність сторонньої мікробіоти.

Після завершення культивування здійснюють відбір проб для проведення мікробіологічного контролю.

ТП. 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 3 л

В інокулятор об'ємом 3 л, де знаходиться композиція Г (від ДР 4.2.4), подають самопливом композицію А (від ДР 4.2.1), композицію Б (від ДР.4.2.2.) та композицію В (від ДР 4.2.3.) . Потім подають посівний матеріал (перетискуванням) від ТП 5.4 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату.

Культивування здійснюють протягом 48 год за температури $30\text{ }^\circ\text{C}$, перемішування середовища 150 об/хв. Кожні 3 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП. 5.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокулятор, який має об'єм 30 л, де знаходиться композиція В (від ДР 4.3.3), подають самопливом композицію А (від ДР 3.3.1) та композицію Б (від ДР.4.3.2.). Для досягнення оптимального рН для культивування продуценту у поживне середовище вносять 6% розчин NaOH (від ДР 3.2.1.). Потім подають посівний матеріал (перетискуванням) від ТП 5.5 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату. Додають повітря з ДР 2.4.

Культивування здійснюють протягом 48 год за температури 30 °С, перемішування середовища 150 об/хв. Кожні 3 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП. 5.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 300 л

В інокулятор об'ємом 300 л, де знаходиться композиція В (від ДР 4.4.3), за допомогою відцентрового насоса перекачують композицію А (від ДР 4.4.1) з реактора та композицію Б (від ДР 4.4.2). Для досягнення оптимального рН для культивування продуценту у поживне середовище вносять 6% розчин NaOH (від ДР 3.2.2.). Потім подають посівний матеріал (перетискуванням) від ТП 5.6 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату. Додають повітря з ДР 2.4.

Культивування здійснюють протягом 48 год за температури 30°С та перемішування середовища 150 об/хв. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП. 5.8. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 3м3

В інокуляторі об'ємом 3 м3, де знаходиться композиція В (від ДР 4.5.3), за допомогою відцентрового насоса перекачують композицію А (від ДР 4.5.1) з реактора та композицію Б (від ДР 4.5.2). Для досягнення оптимального рН для культивування продуценту у поживне середовище вносять 6% розчин NaOH (від ДР 3.2.3.). Потім подають посівний матеріал (перетискуванням) від ТП 5.7 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату. Додають повітря з ДР 2.4.

Культивування здійснюють протягом 48 год за температури 30°С та перемішування середовища 150 об/хв. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30м³

В ферментері об'ємом 30м³ подають композицію А (від ДР.4.6.2). Потім подають посівний матеріал (перетискуванням) від ТП 5.4 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату. Додають повітря з ДР 2.4. Культивування здійснюють 96 години, при температурі 30°, 150 об./хв. Як піногасник використовувався силікон КМ72FS. Відсутність контамінуючої мікробіоти.

ЗВ 1. Знешкодження відходів

ЗВ 1.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи (промивні води, миючі засоби і тп) знешкоджуються ультрафіолетовим датчиком та зливаються у міську каналізацію.

ЗВ 1.2. Знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи (повітря після культивування від ТП 5.5.-6.1.) спалюють у котельні та очищують біоабсорбером.

ЗВ 1.3. Знешкодження твердих відходів

Пакування сортують та віддають сторонній компанії задля реалізації вторсировини.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кт 2.3 Компресування повітря	Повітря, що було стиснене, тиск	Технічний манометр	Повітря після компресування	P=0,5 МПа
Кт 2.4 Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості	Повітря, що було охолоджене, вологість температура	Психрометричний метод, термометр технічний	Після охолодження повітря та видалення з нього вологи	t=19°C, W=60%
Кт 2.5 Нагрівання повітря	Повітря, що було підігріте, температура	Технічний термометр	Опісля нагріву повітря	t=30°C
Кт 2.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Повітря, що було очищене, ступінь цього очищення	Перевірка ступеню очищення згідно інструкції фільтру	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	E=99,99998 %
Кх 3.1 Приготування 6% розчину соляної к-ти	Концентрація соляної к-ти	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=6%

НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ				
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Савич А.Я.			
Перевір.	Воронцов О.О.			
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			
Розділ 8. Контроль виробництва			Літ.	Арк.
				72
			Кафедра БТМ	
			Аркушів	95

Кх 3.2 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	Концентрація NaOH, температура, час	Хімічний метод, технічний, термометр, таймер,	Концентрацію визначають після приготування розчину.	C=6%, t=131°C, T – 40 хв.
Кт, 4.1.1.1, 4.2.1.1., 4.3.1.1, 4.4.1.1, 4.5.1.1, 4.6.1.1 Приготування композиції А - крохмалю	Композиція А, температура, час	Термометр, таймер	Температура визначається безперервно під час приготування	t=60°C , τ=10 хв,
Кт, 4.1.1.2, 4.2.1.2., 4.3.1.2., 4.4.1.2, 4.5.1.2, 4.6.1.2 Приготування композиції А – соєвого шроту	Композиція А, температура, час	Термометр, таймер	Температура визначається безперервно під час приготування	t=80°C , τ=40 хв,
Кт 4.1.1.3 Стерилізація композиції А задля вирощування інокуляту у колбах на качалках	Композиція А, температура, тиск, час	Термометр, таймер, манометр	P та та t визначається під час стерилізації	t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв,
Кт, 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б задля вирощування інокуляту у	Композиція Б, температура, тиск, час	Термометр, таймер, манометр	P та та t визначається під час стерилізації,	t=131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв,

колбах на качалках				
Кт, 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В задля вирощування інокуляту у колбах на качалках	Композиція В, температура, тиск, час	Термометр, таймер, манометр	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації	t=131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв,
Кт, 4.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція Г, температура, тиск, час	Термометр, таймер, манометр	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації	t=131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв,
Кт, 4.1.5 Приготування та стерилізація композиції Д задля вирощування інокуляту у колбах на качалках	Композиція Д, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації	t=131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв,
Км, 4.1.6 Змішування композицій А,Б,В,Г,Д для колб на качалках	Композиції А,Б,В,Г,Д, стерильність	Технічний мікробіологічний контроль	Мікробіологічний метод контролю	Відсутність контамінуючої мікробіоти

Кт, Км 4.2.1.3, 4.3.1.3, 4.4.1.3, 4.5.1.3, 4.6.1.3 Стерилізація композиції А	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр, технічний мікробіологічний контроль	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=112°C, P=0,05 МПа, τ=30 хв, відсутність контамінуючої мікробіоти
Кт, 4.2.2, 4.3.2, 4.4.2, 4.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Термометр, манометр, таймер, мікробіо контроль	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутня контамінуюча мікробіота
Кт, 4.2.3, 4.3.3, 4.4.3, 4.5.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність, тиск	Термометр, манометр, таймер, мікробіо контроль	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутня контамінуюча мікробіота
Кт, Км 4.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г для вирощування інокуляту в інокуляторі Зл	Композиція Г, тиск, температура, час, стерильність	Термометр, манометр, таймер, мікробіо контроль	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ= 40 хв, відсутня контамінуюча мікробіота
Кт, 4.6.2 Приготування та стерилізація композиції Б для ферментеру 50 м3	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр, таймер	Р та та t визначається безперервним методом під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=145°C, τ= 10 хв, відсутня контамінуюча мікробіота

Кт, Км 5.1 Підтримка колекційної культури	Кол. культура, мікробіологічна чистота, температура	Холодильник	Мікробіо контроль	t=4°C, відсутня стороння контамінуюча мікробіота
Кт, Км 5.2 Отримання робочої культури <i>Bacillus thuringiensis var. Israelensis</i>	Пересіяна культура, чашки Петрі з м'ясопептонним агаром, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=30°C, τ=48 год, відсутність сторонньої контамінуючої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах	Пересіяна культура, пробірки Петрі зі скошеним м'ясопептонним агаром, тривалість її вирощування, t, мікробіологічна чистота культури	Мікроскоп, термостат, мікробіо контроль	Мікробіо контроль опісля вир. культ.	t=30°C, τ=48 год, відсутність сторонньої контамінуючої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури температура, швидкість перемішування	Технічні термометр, мікробіологічний контроль таймер, тахометр,	Опісля вирощування інокуляту у колбах	t=30°C, τ=48 год, ω=150 об/хв, відсутня стороння мікробіота

Кт, Кх, Км 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 5 л	Мікробіологічна чистота культури посівний матеріал, тривалість культивування, температура,	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіо контроль	Під час вирощування інокуляту і у кінці процесу культивування	t=30°C, τ=48 год, ω=150 об/хв, відсутня стороння мікробіота
Кт, Кх, Км 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л	Температура, посівний матеріал, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, рН	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль, рН-датчик	Під час вирощування інокуляту і у кінці процесу культивування	t=30°C, τ=48 год, ω=150 об/хв, рН – 7, відсутня стороння мікробіота
Кт, Кх, Км 5.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 500 л	рН, посівний матеріал, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота культури,	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль, рН-датчик	Під час вирощування інокуляту і у кінці процесу культивування	t=30°C, τ=48 год, ω=150 об/хв, рН – 7, відсутня стороння мікробіота
Кт, Кх, Км 5.8 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 5м3	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, мікробіо чист, рН	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль, рН-датчик	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=30°C, τ=48 год, ω=150 об/хв, рН – 7, відсутня стороння мікробіота
Кт, Кх, Км 6.1 Виробниче культивування	Тривалість культивування культ. рід., температура, , рН	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний	Мікробіо контроль проводиться кожні 8 год	t=30°C, τ=96 год, ω=150 об/хв, рН – 7, відсутня стороння мікробіота

		контроль, рН-датчик		
--	--	---------------------	--	--

8.2. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Мікробіо контрол стерильності ПС здійснюють розсіванням проби стерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем: МПА – для виявлення бактерій та КДА для грибів та дріжджів.

Пряме мікроскопіювання. Для контролю стерильності беруть пробу та роблять препарат розчавлена крапля (стерилізують скельця, фламбувають петлю та наносять на скельце воду разом із досліджуваною культурою). За доп. світлового мікроскопа перевіряють наявність сторонніх мікроорганізмів спостереженням. Якщо сторонніх мікроорганізмів немає в 10 полях зору, поживне середовище чисте.

Підготовка чашок Петрі. У попередньо простерилізовані чашки Петрі розливають біля 20-30 мл розплавленого поживного середовища. Чашки залишаються на поверхні задля розподілу агару (рівномірного) та витримують протягом 2-3 діб за температури 30 °С, кришки повинні бути внизу.

Для посіву, за допомогою стерильної піпетки беруть 0,1 мл проби простерилізованого поживного середовища і наносять на поверхню відповідного поживного середовища. За допомогою шпателя Дригальського потрібно рівномірно розподілити пробу по поверхні середовища. Чашки які містять посіви завертаються у папір та поміщають у термостат задля інкубації при температурі біля 32-34 °С протягом 1-2 діб [78]. На поверхні поживних середовищ потрібно візуально визначити відсутність ознак росту будь-яких мікроорганізмів.

Мікробіологічний контроль чистоти культури

1. Забір проб: Забрати пробу з виробничої культури Vti за допомогою стерильних інструментів та перенести її до стерильної пробірки з поживним середовищем, наприклад, суспензією поживного агару.

2. Інкубація: Інкубувати пробірку з пробою при оптимальних умовах для Vti (такі як температура 30°, рН – 7).

3. Спостереження за зростанням колоній: Спостерігати за зростанням колоній на поживному середовищі. Vti має специфічний зовнішній вигляд, що дозволяє легко визначити, чи присутня вона в пробі.



Рис. 8.1 – колонії Vti на агаризованому середовищі [79]

4. Оцінка результатів: Оцінити результати мікробіологічного контролю та порівняти їх з встановленими стандартами для чистоти виробничої культури Vti.

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі, з невеличким збільшенням (до 1000 разів). Використовують стерильну мікробіологічну петлю, щоб перенести культури на скельце та фарбують їх метиленовим синім. Після цього

починають досліджувати культуру під мікроскопом. Культури мають паличкоподібну форму. Розмір бактерії: ширина 1,0—1,2 мкм та довжина 3,0—5,0 мкм. У бактерії наявні джгутики у формі перитрихів (тобто, по всій довжині бактерії) [27]. Грам позитивна бактерія. [10]

8.3. Визначення концентрації цільового продукту δ -ендотоксину:

Особливістю бактерії *Bacillus thuringiensis* є те, що вона може виробляти білкові токсини – дельта-ендотоксин один із них. Токсини представлені CRY та CYT білками, які специфічно зв'язуються з рецепторами у шлунку комах та знищують їх. CRY кристали містять дельта ендотоксини, тоді як CYT кристали містять цитолітичні білки, які можуть бути шкідливі для клітин комах.

Білки активуються коли потрапляють у шлунок комах, зазвичай при нейтральному або кислому рН [80].

Для визначення концентрації дельта ендотоксину використовують метод ВЕРХ.

Виділення токсинів.

Ліофілізовані кристали (отримані після процесу лізису) (200 мг) суспендували у 4 мл води та інкубували при 70°C протягом години. Після охолодження, додавали 2-меркапетанол с утворенням 2% розчину та доводили рН до 10 з допомогою 2 м- NaOH. Кристали центрифугували при 10000 g протягом 30 хвилин. Супернатант хроматографували на колонці 2,5×100 см Sephacryl S-300 (Pharmacia). Токсини осаджували шляхом зниження рН до 4,4 за допомогою 4 м –HCl. Осадок збирали центрифугуванням при 10000 g 10 хвилин та розчиняли у 100 мМ HCl, рН 8 [81].

8.4. Визначення джерела вуглецю та крохмалю.

При культивуванні як джерело вуглецю використовували крохмаль.

Метод.

Щоб клітини могли поглинути крохмаль він гідролізується до глюкози, саме тому для визначення використовується глюкозооксидазний метод.



За принципом дії глюкозооксидаза окиснює глюкозу до глюконової кислоти та перекису водню. Перекис водню реагує з хромогенним реактивом з утворенням кольорового продукту.

Культуральна рідина піддається центрифугуванню при швидкості 10000 обертів за хвилину протягом 20 хвилин. Після цього до 1 мл отриманого супернатанту додається 3 мл ензимно-хромогенного реагенту. Реактив готується наступним чином: у мірну колбу об'ємом 100 мл вноситься 80-90 мл ацетатного буфера (з концентрацією 0,25 моль на літр і рН=4,8), в якому розчиняються 2 мг глюкозооксидази та 1 мг пероксидази. Потім додається 1 мл 1% розчину о-толідину в абсолютному спирті, а об'єм розчину доводиться до мітки ацетатним буфером. Після додавання реактиву до дослідного зразка отриману суміш перемішують, і через 20 хвилин вимірюється оптична густина при довжині хвилі 625 нм. Порівняння проводиться за стандартним розчином глюкози. [82].

Згодом концентрацію глюкози визначають за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{D_{\text{досл.}} \cdot C}{D_{\text{ст}}}$$

де $D_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{ст.}}$ – оптична густина розчину стандартного зразка глюкози; C – концентрація глюкози в розчині стандартного зразка [48].

При культивуванні як джерело азоту використовували соєвий шрот

Для визначення азоту використовувався мідний метод (через наявність амінокислот у соєвому зерні, що дозволяє визначити саме амінний азот).

Метод.

10 мілілітрів фільтрату культуральної рідини переливають у мірну колбу об'ємом 25 мілілітрів та додають дві краплі тимолфталеїну та розчину NaOH до утворення блідо-синього забарвлення. Потім додають 10-15 мілілітрів суспензії ортофосфату міді у боратному буфері та розбавляють дистильованою водою. Збовтують і центрифугують. З колби відбирають 5 мілілітрів фільтрату, до якого додають 0,5 мілілітра 80% оцтової кислоти та 0,2 грама калій йодиду. Виділений йод відтитрують 0,01 нормальним розчином тіосульфату натрію та додають декілька крапель крохмалю до зникнення синього забарвлення. Результат обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(a - b) \cdot 0,28}{n},$$

де X - концентрація амонійного азоту у міліграмах на літр; a - об'єм 0,01 нормального розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування проби для аналізу, у мілілітрах; b - об'єм 0,01 нормального розчину тіосульфату натрію, який був витрачений на титрування контрольної проби, у мілілітрах; n - об'єм досліджуваного розчину, взятий для аналізу, у мілілітрах [83].

8.5. Оцінка біологічної дії.

Для визначення біологічної активності продукту застосовують перевірку цього ж продукту на личинках комах. Загалом, саме цей біоінсектицид перевіряють на комарах *Aedes aegypti*. Тестування проводять із застосуванням різних концентрацій препарату задля перевірки яка доза виявиться летальною. При концентрації 0,01 мкг/л і нижче всі личинки комарів залишились живі. При концентрації 0,25 мкг/л і вище препарат вже знищував 100% личинок. Кількість вбитих личинок перевіряли після обробки різними концентраціями після 24 год [80].

При дослідах на сарані, препарат проявляв токсичну дію протягом 2-7 днів після застосування. Досліди на сарані проводили на дорослих особинах [84].

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

9.1 Аналіз технологічної схеми проектованого біотехнологічного виробництва.

Згідно схеми біотехнологічного виробництва маємо місце емісії відходів:

- Рідких – промивна вода та залишки миючих засобів після миття обладнання, випарена волога після вакуум-випарки, залишки рідкого продукту після фасування.
- Твердих – коробки, макулатура та інші паперові відходи
- Газоподібних – повітря після культивування

9.2 Способи знезараження води:

Промивні води збираються у прийомний резервуар де розташований ультрафіолетовий датчик Emaux Nano Tech UV87 Ozon [85]. Промивні води піддаються ультрафіолетовій обробці (для ультрафіолетового датчика встановлюється спеціальна прозора труба, задля забезпечення пропускання УФ-випромінювання), задля того щоб знищити залишки клітин бактерій. Враховуючи, що підприємство розташоване у місці – відходи будуть зливатися у каналізацію. Відходи не містять у собі радіоактивних викидів або надто токсичних речовин, тому не піддаються додатковій очистці.

9.3 Способи знезараження повітря:

Тривалість процесу отримання посівного матеріалу складає 48 год, а виробничого біосинтезу – 96 год, а для аерації середовища використовується стерильне повітря, яке має швидкості аерації – 1 л/лПС·хв і у виробничому приміщенні встановлено 5 ферментаційних апаратів (4 посівні апарати об'ємом 5л, 50 л, 500 л, 5м³ і ферментер 50 м³ , коефіцієнт заповнення усіх апаратів дорівнює 0,6).

					НУХТ БТЕК 04.03.49 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Савич А.Я.			Розділ 9. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О.О.					84	95
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

приблизний об'єм відпрацьованого повітря за 1 цикл ферментації буде становити: $(5+50+500+5000) \times 0,6 \times 48 \times 60) + (50000 \times 0,6 \times 96 \times 60) = 182\,399\,040$ л (182399,04 м³)

Способи незараження повітря:

Для нашого підприємства вигідніше всього спалювати повітря у котельні задля знищення можливих клітин бактерій. Використовуємо промислову котельню підприємства. Задля того щоб не забруднювати оточуюче середовище газами, можемо використати біоабсорбер або звичайний абсорбер.

9.4 Способи незараження твердих відходів:

Відходи нашого підприємства є нетоксичними та не наносять великої шкоди оточуючому середовищу. Аналізуючи всі етапи виробничного процесу можемо сказати, що ми маємо відходи у вигляді коробок для транспортування, пластикових контейнерів для зберігання матеріалів, а також мішків.

Способи незараження твердих відходів:

Наявні тверді відходи розділяють по матеріалу з якого вони складаються, а потім розділяють по фракціям. Підприємство заключає контракт із фірмою та передає тверді відходи підприємства задля реалізації вторсировини (повторного використання або реутилізації).

Список використаної літератури:

1. Яку шкоду приносять комахи [Режим доступу:] <https://selector.com.ua/archives/13154>
2. Захист культур від попелиці [Режим доступу:] <http://surl.li/heghe>
3. Dambach, P., Louis, V.R., Kaiser, A. et al//Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso//Parasites 7, 371 (2014). [Режим доступу:] <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-371>
4. Комарі і все про них [Режим доступу:] <https://nasekomym.net/uk/komari-i-vse-pro-nyh/>
5. Brigitte Poulin, Gaëtan Lefebvre, Samuel Hilaire, Laurence Després, //Long-term persistence and recycling of *Bacillus thuringiensis israelensis* spores in wetlands sprayed for mosquito control, //Ecotoxicology and Environmental Safety, - Volume 243, 2022. [Режим доступу:] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651322008442>
6. Комахи шкідники рослин — знайомимося ближче з ворогами саду [Режим доступу:] <https://zelenasadyba.com.ua/sad-i-gorod/komahy-shkidnyky-roslyn.html>
7. Шкідники під контролем [Режим доступу:] <https://www.syngenta.ua/news/zer-novi/shkidniki-pid-kontrolem>
8. delta endotoxin, N-terminal domain [Режим доступу:] <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF03945/>
9. Philip R. Watkins, Joseph E. Huesing та ін.//Insects, nematodes, and other pests//Plant Biotechnology and Agriculture - Academic Press, 2012. [Режим доступу:] <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/delta-endotoxin>

10. *Bacillus Thuringiensis* Is Used To Control [Режим доступу:] <https://androbose.in/bacillus-thuringiensis/>
11. Зображення, delta endotoxin [Режим доступу:] <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF03944/>
12. Delta-Endotoxin (Cry) — Cry-токсин [Режим доступу:] <http://xn--80aabqbqbnift4db.xn--p1ai/antigen-item/Delta-Endotoxin-Cry/>
13. Yan Wu, Cheng-Feng Lei та ін.//Novel *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Active against *Locusta migratoria manilensis*//Applied and Environmental Microbiology – 2011 [Режим доступу:] <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02462-10>
14. Gonzalez-Vazquez MC, Vela-Sanchez RA та ін.//Importance of Cry Proteins in Biotechnology: Initially a Bioinsecticide, Now a Vaccine Adjuvant// Life (Basel) - 2021[Режим доступу:] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8541582/>
15. Syed-Rehan A. Hussain, Álvaro M. Flórez та ін.//Characterization of a Mutant *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin With Enhanced Stability and Toxicity//Rev. colomb. biotecnol – 2011 [Режим доступу:] http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752011000200013
16. 1CBY [Режим доступу:] <https://www.rcsb.org/structure/1cby>
17. Gustavo, de la Riva, Adang, Mike//Expression of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin genes in transgenic plants// Biotecnologia Aplicada, 1996 [Режим доступу:] https://www.researchgate.net/publication/264156917_Expression_of_Bacillus_thuringiensis_delta-endotoxin_genes_in_transgenic_plants
18. M. Pujol, Y. Coll, J. Alfonso та ін.//Genetic Engineering of Cuban Rice Cultivars: Present and Perspectives//Developments in Plant Genetics and Breeding, Elsevier, Volume 5 - 2000, [Режим доступу:] <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/delta-endotoxin>

19. W.T. Godbey//BIOTECHNOLOGY AND ITS APPLICATIONS – 2021, ст. 2 [Режим доступу:] <https://ncert.nic.in/textbook/pdf/lebo112.pdf>
20. *Bacillus thuringiensis israelensis* [Режим доступу:] <https://www.arbico-organics.com/category/bti-bacillus-thurengiensis-israelensis>
21. Biotech Bacticide AS 100 mL Biolarvicides [Режим доступу:] <https://www.indiamart.com/proddetail/biotech-bacticide-as-100-ml-biolarvicides-21365442830.html>
22. Зображення Biotech Bacticide AS 250 mL Biolarvicides [Режим доступу:] <https://www.indiamart.com/proddetail/biotech-bacticide-as-250-ml-biolarvicides-21365443062.html?pos=1&pla=n>
23. Лепідоцид® Біологічний інсектицид (Віона, Ukraine) [Режим доступу:] https://hectare.ua/internet-magazin/product/view/insektitsidi/5485?gclid=Cj0KCQjwqc6aBhC4ARIsAN06NmOReLEflmoFH_8LJg81pzNdU6eKj6R8eDVVLXJpR4ioyEBj1andAT0aAqfBEALw_wcB
24. Битоксибациллин БТУ-Р 35 мл [Режим доступу:] <https://greendecor.com.ua/dlya-rasteniy/zaschita/vrediteli/bitoksibatsillin-35ml.html>
25. AquaBac 200G Bti Granular Biological Mosquito Insecticide, Becker Microbial [Режим доступу:] <https://www.forestrydistributing.com/aquabac-200g-bti-granular-biological-mosquito-insecticide-becker-microbial>
26. Kreig A, Lysenko O.//Toxine und Enzyme bei einigen Bacillus-Arten unter besonderer Berücksichtigung der *B. cereus-thuringiensis*-Gruppe//Zentralbl Bakteriol Naturwiss. [Режим доступу:] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/112804/>
27. Rabinovitch, Leon & Vivoni, Adriana та ін.//*Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and

- Molecular Aspects.//*Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol – 2017. [Режим доступу:][https://www.researchgate.net/publication/318152732_Bacillus_thuringiensis_Characterization Morphology Physiology Biochemistry Pathotype Cellular and Molecular Aspects](https://www.researchgate.net/publication/318152732_Bacillus_thuringiensis_Characterization_Morphology_Physiology_Biochemistry_Pathotype_Cellular_and_Molecular_Aspects)
28. The Microbial World: *Bacillus thuringiensis* [Режим доступу:]<http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/bt.htm>
29. Зображення *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* [Режим доступу:]<https://www.bigtimegardens.com/product/bacillus-thuringiensis/>
30. Зображення *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* у чашках Петрі [Режим доступу:]<https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-022-00553-3>
31. Jakub Baranek, Adam Kaznowski, Edyta Konecka, Samir Naimov//Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests//Journal of Invertebrate Pathology – 2015 [Режим доступу:]<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201115001202>
32. Wafa Jalloulia, Fatma Driss//Review on biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* since 1990: Focus on bioprocess parameters//Process Biochemistry – 2020, ст.6 [Режим доступу:]<https://sci-hub.se/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511320303871>
33. *Bacillus thuringiensis* DSM 2046 is a mesophilic human pathogen that was isolated from mediterranean flour moth. [Режим доступу:] <https://bacdive.dsmz.de/strain/1006>

34. Підбито підсумки використання ЗЗР українськими аграріями: статистика [Режим доступу:] <https://superagronom.com/news/13405-pidbito-pidsumki-vikoristannya-zzr-ukrayinskimi-agrariyami-statistika>
35. Біоінсектицид Бітоксисабацилін-БТУ (БТУ-Центр) 1864 [Режим доступу:] <https://superagronom.com/pesticidi-insekticidi-i-akaricidi/bitoksibacilin-btu-id18652>
36. Овочі в умовах війни: планове виробництво, посівні площі, залишки [Режим доступу:] <https://kurkul.com/spetsproekty/1282-ovochi-v-umovah-viyni-planove-virobnitstvo-posivni-ploschi-zalishki>
37. Державна служба статистики України (ПДФ-файл) [Режим доступу:] <https://www.ukrstat.gov.ua/>
38. Бітоксисабацилін - бту®-р для захисту рослин від шкідників (жуків, кліщів), фасування 0,5л [Режим доступу:] <https://zhyvazemlia.com/ua/td0035143-b-toksibacil-n-btu-bitoxibacilin-btu-ks-sc-b-opreparat-fasuvannya-0-5l-ua>
39. У 2021 році зібрали на 16% більше цукрових буряків [Режим доступу:] <https://www.epravda.com.ua/news/2022/01/9/681248/>
40. Онлайн база даних KEGG [Режим доступу:] https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bti00010
41. C. S. Richardson, D. Upadhyay, S. Mandjiny, and L. Holmes//Effect of Environmental Factors on Growth Kinetics of Biocontrol Agent *Bacillus thuringiensis* Bacterium using 2L and 5L A+ Sartorius Stedim Biostat® Fermentation Systems//EJFOOD, European Journal of Agriculture and Food Sciences Vol. 2, No. 6 - 2020, ст.1 [Режим доступу:] file:///C:/Users/asus/Downloads/editor_in_chief,+EJFOOD_168.pdf

42. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2023 р [Режим доступу:] <http://surl.li/ufhtt>
43. СОЛІКЛОР (ТАБЛЕТКИ) [Режим доступу:] <https://interdez.com.ua/product/soliklor-tabletki-baltiachemi-kiev>
44. Даноксин концентрат, засіб для дезінфекції, передстерилізаційного очищення та стерилізації, 1 кг [Режим доступу:] <http://surl.li/tpdjb>
45. Велідез (з ензимами), 1 л [Режим доступу:] <https://hlorka.in.ua/p1798480518-velidez-enzimami.html>
46. ВАКУУМ-ВИПАРНІ УСТАНОВКИ [Режим доступу:] <https://www.kmbp.com.ua/produkt-siya/rishennia-dlia-molochnoi-promyslovosti/vakuum-viparni-ustanovki>
47. АІІ серії 5.903-20 і 5.903-2 [Режим доступу:] <https://prom.ua/ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html>
48. Фільтруючий матеріал G4 від NEW FILTER [Режим доступу:] <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>
49. Поршневий компресор ВКП F АВ 515-10-200 [Режим доступу:] <https://kompressor.kiev.ua/katalog/porshnevye-kompressory/vkp-f-seriya-industrial76/kompressor-vkp-f-ab-515-10-200.html>
50. Теплообмінники для котлов, вентиляції, кондиціонування [Режим доступу:] <https://termoprom.com.ua/teploobmenniki-poznacheniyu/teploobmenniki-dlya-kotlov-ventilyacii-kondicionirovaniya>
51. Ресивер повітряний горизонтальний (500 літрів, 11,5 Бар) синій ПЗГ 500-600-11-02 [Режим доступу:] <https://energopak.com/kompresorna-tehnika/resiveri/resiver-povitryaniy-gorizontalnyy-500-litriv-11-5-bar-siniy-pzg-500-600-11->

[02/?gclid=CjwKCAiAvJarBhA1EiwAGgZl0ATjKEQmFypG9zKRGsw4kUv_YNltTUOT4PF2o9QKs6H6jHQ3V52MxoCjpAQAvD_BwE](https://www.galactic.kiev.ua/?gclid=CjwKCAiAvJarBhA1EiwAGgZl0ATjKEQmFypG9zKRGsw4kUv_YNltTUOT4PF2o9QKs6H6jHQ3V52MxoCjpAQAvD_BwE)

52. Система підігріву повітря [Режим доступу:]
https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php
53. Повітряні фільтри карманні, клас фільтрації F9 [Режим доступу:]
<https://ventfilter.kiev.ua/goods/vozdushnye-filtry-karmannye-klass-filtratsii-f9/>
54. Реактор miniPilot [Режим доступу:]
<https://dlu.com.ua/%D0%A0%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80-miniPilot-1>
55. Комбінований дозатор [Режим доступу:] <https://sweda.com.ua/ua/produksiya/kombinirovannyi-dozator/>
56. Скляний хімічний реактор на 5 л с сорочкою [Режим доступу:]
<https://ukrchemgroup.com/ua/p1387839012-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html>
57. Насос Grundfos UPS [Режим доступу:] <https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionny-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html>
58. Циркуляційний насос Wilo Star-RS15/4-130 (4063802) [Режим доступу:]
<https://modernsys.com.ua/uk/tsirkulyatsionnyj-nasos-wilo-star-rs15-4-130-ru.html>
59. Циркуляційний насос Wilo Yonos Pico1.0 25/1-8 (4248086) [Режим доступу:]
<https://modernsys.com.ua/uk/cirkulyacionny-nasos-wilo-yonos-pico1.0-25-1-8.html>
60. Циркуляційний насос Wilo Yonos MAXO 25/0,5-12 (енергозберігаючий) (2120641) [Режим доступу:] <https://modernsys.com.ua/uk/tsirkulyatsionnyj-nasos-wilo-yonos-maxo-25-0-5-12-energoberegayushchij-ru.html>
61. Реактор 100 літрів [Режим доступу:] <https://prom.ua/ua/p1016484249-reaktor-100-litrov.html>

62. Реактор РГС 50 л GMP [Режим доступу:] <https://promvit.com.ua/reaktor-rgs-50-l-gmp/>
63. Реактор хімічний з нержавіючої сталі з мішалкою та сорочкою 1000 літрів [Режим доступу:] <https://stprom.com.ua/ua/p1723667546-reaktor-himicheskij-nerzhaveyuschej.html>
64. ХІМІЧНИЙ РЕАКТОР 500 Л. ІЗ МІШАЛКОЮ. [Режим доступу:] <https://npro-gidromash.com.ua/ua/p1735059994-himicheskij-reaktor-500.html>
65. 10000-літровий реактор Pfaudler, модель SE10000, вертикальний скляний реактор [Режим доступу:] <https://perryvidex.eu/category/reactors/kettle-glass-lined-reactors-europe-over-5-000-litres>
66. 5000 ЛІТРІВ, ВНУТРІШНІЙ 2 БАРИ, КОЖУХ 2 БАРІВ, РЕАКТОР З НЕРЖАВІЮЧОЇ СТАЛІ [Режим доступу:] <https://perryvidex.eu/product/5000-ltr-2-bar-int-2-bar-jkt-110-agi316l-HG62398>
67. ЛАБОРАТОРНИЙ РЕАКТОР 15 Л [Режим доступу:] <https://khimmix.ua/ru/himicheskije-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l>
68. Скляний реактор із сорочкою s212 об'єм 150 літрів, змішувальний реактор [Режим доступу:] <https://hms-ua.com/ua/p1445473620-steklyannyj-reaktor-rubashkoj.html>
69. 1500 Litre, 1 Bar Internal, 3 Bar Jacket, Stainless Steel Reactor Process Vessel [Режим доступу:] <https://perryvidex.eu/category/reactors/stainless-steel-reactor-europe-0-4-999-litres>
70. Реактор 800 літрів з гомогенізатором [Режим доступу:] <https://prom.ua/ua/p1151912492-reaktor-800-litriv.html>
71. Sterilizers and Pasteurizers [Режим доступу:] <https://www.cft-group.com/technology/sterilizers-and-pasteurizers/>

72. Biostat® Cplus [Режим доступу:] <https://sartorius.com.ua/ru/fermentyory-i-bioreaktory/sterilizuemye-na-meste-fermentery-bioreaktory-cip/biostat-cplus/>
73. Стерилізуючі фільтри для газів [Режим доступу:] <http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuyushh%D1%96dlya-gaz%D1%96v>
74. LIQUID PHASE BIOREACTORS – FERMENTER – FERMENTER [Режим доступу:] <https://ur0.jp/q90em>
75. Біореактори з нержавіючої сталі, що виготовляються на замовлення. [Режим доступу:] <http://surl.li/ufhup>
76. CCT-SHP3-5000DE: Циліндрично-конічний універсальний ферментер 5000/6500 літрів 3.0 бар (неізолюваний / ізолюваний) [Режим доступу:] <https://eshop.czechminibreweries.com/uk/product/cct-shp3-5000de/>
77. Апарати із змішуючим пристроєм [Режим доступу:] https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvom_ua.php
78. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв//конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. /В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
79. Figure 1a: Culture of VCRC B17 strain. [Режим доступу:] https://jvbd.org/viewimage.asp?img=JVectorBorneDis_2017_54_2_187_211702_f1.jpg
80. Kavita Nair, Roda Al-Thani, Samir Jaoua//*Bacillus thuringiensis* strain QBT220 pBtoxis plasmid structural instability enhances δ -endotoxins synthesis and bioinsecticidal activity, //Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 228, -

- 2021, [Режим доступу:] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651321010873?via%3Dihub>
81. Identification of Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis* by High Performance Liquid Chromatography Free//Takashi Yamamoto/Microbiology society [Режим доступу:] <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-129-8-2595?crawler=true#R10>
82. Методичні вказівки для підготовки до практичних занять з біологічної хімії (для студентів медичних факультетів). Частина 2. Біохімія гормонів. Обмін вуглеводів і ліпідів / О. А. Наконечна, С. О. Стеценко. – Харків: ХНМУ, 2017. – 98 с.
83. Буценко Л.М., Красінько В.О.//Технологія мікробного синтезу лікарських засобів лабор. практикум.
84. Wu Y, Lei C, Yi D, Liu P, Gao M.2011.Novel *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Active against *Locusta migratoria manilensis* . *Appl Environ Microbiol*77:.<https://doi.org/10.1128/AEM.02462-10> [Режим доступу:] <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.02462-10>
85. Ультрафіолетова установка Emaux Nano Tech UV87 Ozon [Режим доступу:] <https://aquapolis.ua/ua/ultrafioletovaja-ustanovka-emaux-nt-uv87-to.html>