МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет)_____

Кафедра _____

«До захисту в ЕК» **«До захисту допущено»**

Директор інституту (декан факультету) Завідувач кафедри

_____ _____Грегірчак.Н._____ _____ _____Пирог.Т.П_____
(підпис) (прізвище та ініціали) (підпис) (прізвище та ініціали)

«___» _____ 20__ р. «___» _____ 2020__ р.

Кваліфікаційна робота

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерії»
(шифр та назва напряму підготовки (спеціальності)

освітньо-професійної програми_____

на тему: Одержання Поліміксобактерину культивуванням *Bacillus polymyxa*_____

Виконав: Здобувач__IV__ курсу, групи_2_ Мальцева Анна Вячеславівна
(прізвище та ініціали)

Керівник Сулейко Тетяна Леонідівна _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Консультанти _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Студент_____
(підпис)

Київ – 2020 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю .
Кафедра біотехнології і мікробіології .
Освітній ступінь бакалавр .
Напрям підготовки _____
(шифр і назва)
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія» .
(шифр і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНИЙ ПРОЕКТ (РОБОТУ) ЗДОБУВАЧА

Мальцевої Анни Владиславівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) Одержання Поліміксобактерину культивуванням Bacillus polymyxa
керівник проекту (роботи) Сулейко Т.Л. ,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-кс
2. Строк подання здобувачем проекту (роботи) 01 червня 2020 року .
3. Вихідні дані до проекту (роботи) Штам культури продуцента Bacillus polymyxa, поліміксобактерину, об'єм ферментера 1м^2

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань які потрібно розробити) Розділ 1 Характеристика цільового продукту, Розділ 2 Обгрунтування вибору та характеристика біологічного агента, Розділ 3 Техніко-економічне обгрунтування, Розділ 4 Біосинтез цільового продукту, Розділ 5 Обгрунтування вибору технологічної схеми, Розділ 6 Матеріальний баланс,Розділ 7 Специфікація обладнання, Розділ 8 Опис технологічної схеми, Розділ 9 Контроль виробництва, Розділ 10 Автоматізація ділянки

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)Технологічна схема – 2 аркуши А1,А2, Апаратурна схема – 3 аркуши А1, Схема автоматизації – 1 аркуш А1

6. Консультанти розділів проекту (роботи)

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко Олег Миколайович доцент, ктн., кафедра автоматизації та комп'терних технологій систем управління	23.03.2020	24.04.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року .

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційного проекту (роботи)	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	19.03-23.03	
2	Характеристика вибору та характеристика БА	25.03-9.04	
3	Технікр-економічне обгрунтування	30.04-15.04	
4	Біосинтез цільового продукту	16.04-11.05	
5	Обгрунтування вибору технологічної схеми	21.04-17.05	
6	Матеріальний баланс	13.04-15.05	
7	Специфікація обладнання	14.04-17.05	
8	Опис технологічної схеми	10.04-20.05	
9	Контроль виробництва	18.04-21.05	
10	Автоматизація ділянки ферментера	19.04-18.04	

Здобувач _____ Мальцева А.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник проекту (роботи) _____ Сулейко Т.Л.

(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект де розробленно технологічну та апаратурну схему синтезу біопрепарату Поліміксобактерину на основі використання штаму *Peanibacillus polymyxa* КВ, який у порівнянні з іншими відомими препаратами, що розщеплюють важкорозчинні фосфати є ефективнішим та економічно вигіднішим. Також розробленно післяферментаційні процеси очищення препарату поліміксобактерин. Технологічна схема біосинтезу Поліміксобактерину включає допоміжні роботи (приготування і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез).

Дипломний проект складається з вступу та десяти розділів, списку використаних джерел 34 найменувань, апаратурної та технологічної схеми (формату А1,А2), та схеми біосинтезу ростового субстрата.

Загальний обсяг роботи - 127 сторінка, містить 4 рисунків та 16 таблиць.

Ключові слова: Поліміксобактерин, *Peanibacillus polymyxa* КВ, фосфатмобілізуючі бактерії, ферментер, біодобрива.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ…….....2

ВСТУП……7

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ……9

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА…….…..11

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування……...…11

2.2. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента……20

2.3.Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента…….21

2.4. Таксономічний статус біологічного агента…….....22

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ……...….23

3.1 Потреба у цільовому продукті……...23

3.2. Розрахунок потужності виробництва……..24

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера ……..24

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу…….……25

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ……...28

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *P. polymyxa*……..28

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт……..31

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ…….39

5.1. Обгрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу…….39

5.1.1. Обґрунтування способу культивування *Paenibacilus polymyxa* КВ……..40

5.1.2. Обгрунтування вибору типу ферментера…….……40

5.2. Обгрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезинфікуючих засобів для культивування *Paenibacillus polymyx* КВ – продуцента бактеріального добрива ……...41
5.2.1. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів……...43
5.2.2 Засоби для миття обладнання, інвентарю…….. ……..43
5.2.3 Засоби для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон та дверей.....45
5.2.4. Обладнення стадії підготовки обладнання і комунікацій…….48
5.3. Обгрунтування стадій підготовки аераційного повітря…….....49
5.4 Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища……..50
5.4.1 Стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках……51
5.4.2. Стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі ……51
5.4.3. Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу в інокуляторі…….52
5.4.4. Стерилізація поживного середовища для культивування в ферментері
5.5. Обгрунтування вибору та підготовка піногасника…….52
5.6 Обгрунтування вибору стадій виділення та очищення цільового продукту…….53
5.6.1 Обгрунтування способу концентрування……..54
5.6.2. Обгрунтування способу сушіння……..54
5.6.3 Обґрунтування способу пакування……55
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ПАРТІЮ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ……...57
6.1. Розрахунок виробничих циклів……..……58
6.2 Розрахунок об’ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу…….……..59

6.3. Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу……..….71
6.4. Уточнюючий розрахунок технологічного обладнання……..…78
6.4.1. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 1 м^3…….……..78
6.4.2. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів та збірників для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті …….….....78
6.5. Розрахунок кількості реакторів – змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища……79
6.5.1. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів та збірників для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі ……..……..…….79
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ……..82
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ…….……86
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА…….97
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ……..……124
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ……....126
ДОДАТКИ……127

ВСТУП

При вирощуванні сільськогосподарських культур є важлива задача яка стосується покращення живлення кореневої системи рослин, пришвидшенню їх росту та збільшення продуктивності. Відомо що одним з найважливіших елементів для рослин є фосфор, оптимальний вміст цього елементу для рослинної клітини - передумова для підтримання основних фізіологічних та біохімічних процесів. Збільшити кількість доступного фосфору для рослин можна двома способами: внесенням мінеральних добрив, або внесенням бактеріальних добрив [1].

Перспективним є використання біологічних добрив, адже вони мають безліч переваг порівняно над мінеральними. Зокрема, органічні добрива у не переробленому вигляді наносять більшої шкоди ґрунту, забруднюючи його і ґрунтові води. Тоді як біодобрива зовсім не приносять шкоди екосистемі., є економічно вигідніші у застосування та виготовлення [2].

Поліміксобактерин трансформує важкорозчинні мінеральні та органічні сполуки фосфору в доступну для рослин форму, а також продукує фізіологічно активні речовини (ауксини, цитокініни і гібереліни), які підвищують показники росту [3].

При активації росту і розвитку зростає фосфорне живлення рослин, що забезпечується розростанням кореневої системи рослин та збільшенням її абсорбуючої активності. Саме мікроорганізми перетворюють недоступні для сільськогосподарських культур сполуки в мобільні, оптимальні для метаболізму, що сприяє, знову ж таки, покращенню росту і розвитку рослин.

Актуальність.

На сьогодні актуальною проблемою є збільшення продуктивності сільськогосподарських угідь. Такого ефекту можна досягти за рахунок більш раціонального використання природного потенціалу мікробно-рослинних взаємодій за використання біологічного добрива Поліміксобактерин, в основі якого є бактерії *Paenibacillus polymyxa* КВ. Використання даного добрива призводить до покращення продуктивності сільськогосподарських культур,

стійкості до несприятливих умов зовнішнього середовища, покращують якість зерна.

Новизною даної роботи є покращення технологічного виробництва шляхом спрощення способу культивування штаму *Paenibacillus polymyxa* КВ на середовищі нового складу та отримання більшої концентраці КУО на 1 мл, а саме 5×10^9 порівняно з попередніми розробками, де кількість колоній утворюючих одиниць в 1мл на більш дорогому та складному середовищі складало біля $2\text{-}2{,}2\times10^8$ [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Поліміксобактерин - біопрепарат який застосовується для бактеризації насіння пшениці ярої та озимої з метою покрашення фосфорного живлення рослин, підвищення продуктивності та захисту рослин від фітопатогенних грибів.

Характер біологічної дії препарату. Механізм дії препарату пов'язаний із властивістю бактерії *Paenibacillus polymyxa* КВ продукувати органічні кислоти а також фермент фосфатазу, що забезпечує розчинення важкорозчинних мінеральних і органічних фосфатів ґрунту, внаслідок чого рослини в процесі свого розвитку одержують додаткове живлення фосфором із ґрунтових резервів, а також продукувати стимулятори росту рослин та вітаміни багатьох груп особливо групи В.

Бактерії *P.polymyxa* КВ резистентні до ряду пестицидів, які застосовуються у технологіях вирощування пшениці.

Сфера застосування – сільське господарство. Застосовується у технологіях вирощування пшениці шляхом, який називаєтьсябактеризації насіння.

Біологічна та господарська ефективність. Поліміксобактерин призначений для поліпшення кореневого живлення. Застосування поліміксобактерину допомагає підвищенню урожайності пшениці на 10–15% зі збільшенням вмісту протеїну в зерні до 2%.

Витрати препарату на один гектар насіння пшениці складають 150 мл, на одну тонну – 600 мл.

Тип упаковки. Поліетиленові каністри об'ємом 5,10 л та флакони поліетиленові об'ємом 1,2 л.

Рис.1.1. Препарат. Поліміксобактерин

Застереження. Насіння, яке оброблено препаратом має бути захищеним від попадання прямого сонячного проміння для збереження бактерій.

Термін зберігання. Препарат зберігають у темному сухому приміщенні, або в холодильній камері за температури +4°С протягом 3 місяців. Підвищення температури зберігання вище +10ºС небажане, оскільки може призвести до зменшення терміну придатності препарату.

Протипоказання. Протипоказань до застосування не встановлено. Препарат у рекомендованих дозах не має побічної дії на рослини.

Препарат не має токсичної дії на людину (біологічно безпечний) [5].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обгрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Особливе значення в останні роки набули дослідження, направленні на створення та використання біопрепаратів на основі мікроорганізмів, здатних до трансформації важкорозчинних сполук фосфору. Пояснюється це зниженням інтенсивності землеробства України, стрімким зменшенням застосування мінеральних фосфорних добрив, що може бути причиною зниження рухомих сполук фосфору в ґрунтах.

Мобілізація фосфатів відбувається і в результаті утворення мікроорганізмами різних органічних кислот, кетокислот при бродінні або неповному окисленні вуглеводів. Фосфати перетворюються на розчинні форми і в результаті діяльності нітрифікуючих бактерій, які утворюють азотну кислоту, та бактерій, що окислюють сірку [6].

Застосування фосформобілізуючих мікробіологічних препаратів заміняє 50-60 кг/га фосфорних добрив. Вміст активного, рухомого фосфору в грунті збільшується на 20-30% та сприяє підвищенню врожайності зернових культур на 8-12%, водночас збільшує вміст протеїну в зерні до 3%.

Особливістю фосфорного живлення інокульованих рослин є здатність використовувати елементи живлення з нижніх шарів ґрунтового профілю, куди проникає їх коренева система. При цьому фосфор переміщується також у верхній шар ґрунту і залишається в ньому з пожнивно-кореневими рештками, його в подальшому можуть використати наступні культури.

В основі Поліміксобактерину є бактерія *Paenibacillus Polymyxa* КВ, що активно продукує β-індолілоцтову кислоту, гіберелінову кислоту та вітаміни B_1 , B_6.

Крім того, синтезує рістстимулюючі речовини: вітаміни B_{12} рибофлавін, біотин, пантотенову кислоту, індолілоцтову кислоту, ауксини, гібереліни та цитокіни , які активізують ферметну активність інокульованих рослин, забезпечують додаткове мінеральне живлення, продукують біологічно активні речовини. Ці механізми дії препарату призводять до покращення елементів структури врожаю (продуктивності) сільськогосподарських культур, стійкості до несприятливих умов зовнішнього середовища, покращуються якісні показники зерна, що призводить до підвищення урожайності і вказують на економічну ефективність застосування мікробних препаратів [7].

Таблиця 2.1

Особливості Поліміксобактерину за допомогою Paenibacillus polymyxa KB, Bacillus megaterium IMB B-7168, Bacillus subtilis 5-RK

Біологічний агент	Склад поживного середовища г/л	Концентрація цільового продукту, КУО/г	Тривалість культивування, год	pH	Використана література
Paenibacillus polymyxa KB	Меляса-40 Кукурудзяний екстракт-20 Вермикуліт-0,4 K_2HPO_4-0,5 KH_2PO_4-0,5 $MgSO_4$-0,5 NaCl-0,5 $CaCO_3$-10,5	5×10^9	36	7,2-8,4	[7]

Продовження таблиці 2.1

Bacillus megaterium IMB B-7168	кукурудзяний екстракт – 7 дріжджі пекарські – 0,5 $C_6H_{12}O_6$ – 12 $(NH_4)_2SO_4$ - 1,0 фосфат калію триводний – 0,35 $MgSO_4$ - 0,2 $CaCO_3$ – 1	$1,0 \times 10^9$	72	6,5-7,5	[8]

Закінчення таблиці 2.1

Bacillus subtilis 5-RK	$(NH_4)_2SO_4$ - 0,5 $MgSO_4$- 0,2 $K2SO_4$ - 0,2 $Ca_3(PO_4)_2$ -2,0 $C_6H_{12}O_6$ -10,0 дріжджовий екстрак - 2мл	$5x10^8$	48	6-7	[9]

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування Paenibacillus polymyxa KB, Bacillus megaterium IMB B-7168, Bacillus subtiliis 5-RK

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	*Джерело інформації
Paenibacillus polymyxa KB	Меляса-40	61	2,4	1
	Кукурудзяний екстракт-20	139	2,8	3
	Вермикуліт-4	20	0,08	1
	K_2HPO_4-0,5	192	0,096	2
	KH_2PO_4-0,5	55	0,028	2
	$MgSO_4$-0,5	14	0,007	2
	NaCl-0,5	14,20	0,007	2

Продовження таблиці 2.2.

	$CaCO_3$-10,5	3,74	0,040	1
	Вартість 1 л середовища –5,52			
Bacillus megaterium ІМВ В-7168	Кукурудзяний екстракт-7	139	0,973	3
	Дріжджі пекарські- 0,5	34	0,017	1
	$C_6H_{12}O_6$ – 12	40	0,48	1
	$(NH_4)_2SO_4$ - 1,0	24	0,024	1
	фосфат калію триводний – 0,35	58	0,0203	1
	$MgSO_4$ - 0,2	14	0,003	1

Закінчення таблиці 2.2

	$CaCO_3$ – 1	3,74	0,004	1
	Вартість 1 л середовища –1,52			
Bacillus subtilis 5-RK	$(NH_4)_2SO_4$ - 0,5	24	0,012	1
	K_2SO4 – 0,2	58	0,012	1
	$MgSO_4$- 0,2	14	0,003	1
	$Ca_3 (PO_4)_2$ -2,0	12,80	0,026	1
	$C_6H_{12}O_6$ -10,0	40	0,4	1
	дріжджовий екстрак - 2мл	1479	2,96	1
	Вартість 1 л середовища – 3,41			

Примітка.* – Ціни наведено станом на травень 2020

1.https://prom.ua; 2. https://flagma.ua; 3. https://agro-smart.com.ua/ ; 4. https://norim.com.ua/

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г при культивуванні *Paenibacillus polymyxa KB, Bacillus subtilis* 5-RK, *Bacillus megaterium* IMB B-7168

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, КУО/г	Тривалість культивування, год	Умовна вартість цільового продукту, грн/г
Paenibacillus polymyxa KB	5,52	5×10^{9}	36	0,1533
Bacillus megaterium IMB B-7168	1,52	$1,0\times10^{9}$	72	0,0211
Bacillus subtilis 5-RK	3,41	$5x10^{8}$	48	0,0710

2.2. Морфолого – культуральні ознаки *Paenibacillus polymyxa*

Paenibacillus polymyxa - це анаеробна азотфікуюча грампозитивна бактерія, яка має форму стрижня, розміром 0,6 на 3,0 мкм і виробляє блідні колонії на агарі.

Paenibacillus polymyxa є хемоорганогетеротроф, який може фіксувати атмосферний азот і є факультативним анаеробним. Як факультативний анаероб, він може виконувати аеробне дихання в присутності кисню або перейти на ферментацію, коли рівні кисню є низькими. Він може використовувати різні джерела органічного вуглецю, такі як глюкоза, сахароза, мальтоза та арабіноза, і можуть виробляти ряд метаболітів, таких як ацетоін, лактат та етанол. Він є також мезофілом, який оптимально зростає близько 30°C, а оптимальний pH становить 4-7.

P. polymyxa також має здатність виробляти газ H_2 як побічного продукту під час ферментативного процесу, на який впливають як pH, так і температура. Цей ферментативний процес, званий acetogenesis, дає ацетат, водень і CO_2, який може бути використаний як попередники метаногенів для отримання метану . P. polymyxa має унікальну здатність синтезувати антибіотики протигрибкові сполуки. Три з цих сполук включають полімксин, панібацилін і фузарицидін [11].

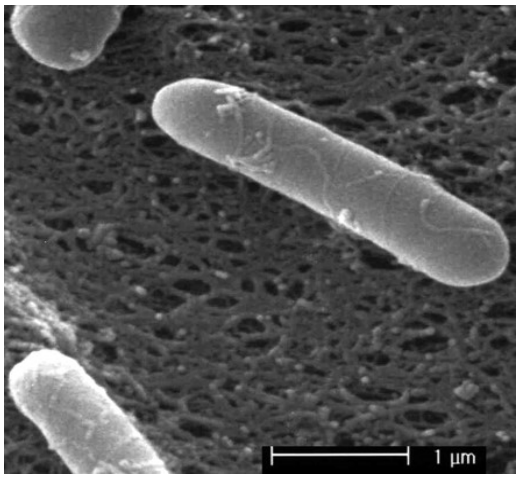

Рис.2.1. Paenibacillus polymyxa зображення під електроним мікроскопом

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки

За типом живлення факультативний анаероб, також може виконувати аеробне дихання в присутності кисню або перейти на ферментацію, коли рівні кисню є низькими. Він може використовувати різні джерела органічного вуглецю, такі як глюкоза, сахароза, мальтоза та арабіноза, і можуть виробляти ряд метаболітів, таких як ацетоін, лактат та етанол . Це також мезофіл, який оптимально зростає близько 30 ° C, а оптимальний pH становить 4-7. P.polymyxa також має здатність виробляти газ H_2 як побічного продукту під час ферментативного процесу, на який впливають як pH, так і температура . Цей ферментативний процес, званий acetogenesis, дає ацетат, водень і CO_2, який може бути використаний як попередники метаногенів для отримання метану. P.polymyxa має унікальну здатність синтезувати антибіотики та протигрибкові сполуки. Широкий спектр можливостей цієї бактерії - фіксувати азот, виробляти гормони, які сприяють росту рослин, виробляють гідролітичні ферменти та виробляють антибіотики проти шкідливих рослинних та людських мікроорганізмів. Це також може допомогти рослинам у поглинанні фосфору та підвищувати пористості грунту. Ця бактерія відіграє роль у функціонуванні екосистеми та потенційній ролі в промислових процесах [12].

У сільськогосподарських екосистемах *P. polymyxa* може сприяти росту рослин за допомогою трьох механізмів. Першим механізмом є вироблення гормонів, таких як цитокініни, ауксини, етилен і гібербеліни. Ці сполуки збільшують розширення кореня та зростання рослин. Другий механізм - виробництво антибіотиків та сприяння імунітету ризосфери. Третій механізм - здатність фіксувати азот бактерії, яка може утворювати форму азоту (аміак NH_3), який можна застосовувати рослинами з атмосферного N_2 . Крім того, флюктурація грунту та пористість поліпшуються через органічні сполуки, що виділяються з P polymyxa в грунт.

Широкий діапазон застосувань *P. polymyxa* у промисловості обумовлений вторинними метаболітами, виробленими цією

бактерією. Антимікробні сполуки ефективні проти широкого спектру грампозитивних і грамнегативних бактерій, тому бактерії можуть бути використані при біозахисту харчових продуктів та медичних застосувань. Метаболіти, такі як поліміксин Е1 та лантибіотик, також зменшують колонізацію патогенів у личинок птиці та креветок. Інша область застосування метаболітів, що продукуються бактерією, - біофрокуляція, викликана метаболітами, такими як 2,3-бутандіол (BDL). Бактерію також використовують для розділення гематиту, піриту та халькопірозу . Інші галузі промислового застосування *P. polymyxa* - очищення та ферментація відходів і водопровідної води [12].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Paenibacillus на початку був класифікований під родом Bacillus, поки він не створив свій род в 1993 році. Різниця була зроблена з використанням порівняльного аналізу послідовності гена 16S рРНК трьох різних бактерій, які показали достатню філогенетичну відстань від Bacillus subtilis, та змогли створити новий рід [12].

Домен - *Bacteria*

Тип - *Firmicutes*

Клас - *Bacilli*

Порядок - *Bacillales*

Сім'я - *Paenibacillaceae*

Рід - *Paenibacillus*

Вид - *Paenibacillus polymyxa*

РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Сучасне аграрне виробництво спрямоване на екологізацію природокористування на основі розширеного відтворення родючості ґрунту за умов дотримання безпеки довкілля і вирощеної продукції [13].

Раціональне застосування біодобрив і біостимуляторів забезпечує одержання екологічно безпечної продукції, накопичення органічної речовини грунту, знижує втому грунту, покращує його структуру, що сприяє підвищенню родючості [14].

Таблиця 3.1

Вихідні дані для розрахунку річної потреби у бактеріальному добриві поліміксобактерин на основі штаму бактерії *Paenibacillus polymyxa* КВ [15].

Сільсько-господарська культура	Площі посівів, тис. га	Об'єм препарату для обробки 1 т, л/т	Кількість посівного матеріалу 1 га, т	Необхідний об'єм препарату для обробки, л
Кукурудза	245,4	0,5	0,02	2454
Пшениця	80,1	0,5	0,3	12015
Соняшник	72,3	0,5	0,005	180,75
Цукрові буряки	63,74	0,5	0,002	63,74
				Всього 14 713,5 14,7 м^3

Проаналізувавши біодобрива, що використовуються з метою трансформації важкорозчинних фосфатів, які на даний час представлені на ринку України часто використовуються:

Біофосфорин,Поліміксобактерин,Альбобактерин. Згідно даних наведених у *табл. 3.1* для задоволення 35% потреби необхідно виробити майже 14 713,5 л препарату.

Враховуючи, що потреба в препараті поліміксобактерин сезонна (весняні сільськогосподарські роботи), а термін зберігання препарата не дуже великий усього три місяці, тому необхідно за мінімальний термін отримати необхідну кількість препарату.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно з літературними даними концентрація бактерії *Paenibacillus polymyxa KB* в препараті Поліміксобактерин становить – $5 \cdot 10^9$ КУО.

Потужність виробництва препарату біодобрива Поліміксобактерин

$$Gгп = 14,7 \times 0,35 = 5,1 \text{ м}^3$$

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

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації.

Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 30 кількість продукту на добу (Vд) становитиме:

$$Vд = Gгп / Трд = 5,1/30 = 0,17 \text{м}^3$$

Кількість продукту за цикл становить:

$$Vкр = (К1 \cdot Vд \cdot Тцф)/24$$

$$Vкр = (1,1 \cdot 0,17 \cdot 45)/24 = 0,35 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

Тцф =45 год.

де Тцф –цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (36 год) та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація апарату (1 год),

охолодження апарату (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

К1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій. Приймаємо К1 = 1,1.

$$Vг = Vкр/Кзап = 0,35/0,6=0,6 м^3,$$

де Кзап = 0,6 – коефіцієнт заповнення.

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

$$V_{роб1} = Vкр/(1-Еф) = 0,35/(1-0,1)= 0,3 м^3$$

геометричний об'єм ферментера має становити:

$$Vг = Vцк/Кзап = 0,3/0,6=0,5м^3,$$

де Кзап = 0,6 – коефіцієнт заповнення.

Знаходимо найближчий за геометричний об'ємом ферментер Vф = 0,7 $м^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

Кзап = Vцк/ Vф = 0,3,/0,6= 0,6 що не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65).

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер Vсф = 0,7 $м^3$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з геометричним об'ємом Vф = 0,7 $м^3$.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Отже кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$Vпс1= Vроб1/(1+Хф) = 0,3/(1+0,1) = 0,28м^3,$$

де Хф=0,1 – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$Vпм1= Vроб1 – Vпс1=0,3-0,28=0,02 м^3.$$

Для одержання 0,02 $м^3$ інокуляту в посівному апараті треба врахувати втрати краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які можуть становити 10%.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$Vроб2 = Vпм1/(1-Епа) = 0,02 / (1-0,10) = 0,02 м^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для посівного апарата становить 10% від об'єму поживного середовища.

Отже кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$$Vпс2 = Vроб2 / (1+Хпа) = 0,02/(1+0,1)=0,01 м^3,$$

де Хпа=0,1 – доза посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$Vпм2= Vроб2 – Vпс2=0,02-0,01 = 0,01 м^3 = 10$ л.

Кількість інокуляту $Vроб2=0,1 м^3$ можна одержати під час культивування у посівному апараті геометричний об'ємом

$Vпа2 = Vроб2/Кзап=0,02/0,6=0,03м^3$.

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер Vсф=0,06 м3 або 60 л .

Отже кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитеме:

$$Vроб3= Vпм2/(1-Еін) = 30/(1-0,10)=3,3 л.$$

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

Отже кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$Vпс3 = Vроб3/(1-Хін) =3,3/(1+0,1)=3$ л.

де Хін =0,1 – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Отже кількість посівного матеріалу для інокулятора становить

$Vпм3= Vроб3 – Vпс3=3,3-3 =0,3$ л.

Кількість інокуляту Vроб3=3,3 л можна одержати під час культивування в інокуляторі об'ємом Vін= Vроб3/Vзап= 3,3/0,6= 5,5 л

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $Vсф= 0,01м^3$ або 10 л

Для одержання 5,5 л посівного матеріалу в інокуляторі треба врахувати втрати краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10% до 15%

Отже кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитеме:

$$V_{роб4} = V_{пм3}/(1-Е_{ін}) = 0,3/(1-0,10)=0,3 \text{ л.}$$

Отже кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$V_{пс4} = V_{роб4}/(1-Х_{ін}) =0,3/(1+0,1)=0,27$ л.

де $Х_{ін} =0,10$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить:

$V_{пм4}=V_{роб4}-V_{пс4}=1,2-1=0,2$ л

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм4} =0,2$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці.

Використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб}=750$ мл та коефіцієнтом заповнення $К_{зк}=0,2$.

Отже кількість колб для одержання посівного матеріалу становить:

$N_{колб} = V_{пм3}/(V_{колб}\cdot К_{зк})=200/(750\cdot 0,2)=2$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 2 качалочних колби.

Зробимо висновок, що для процесу отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу препарату поліміксобактерин у ферментері об'ємом 1 $м^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 3 етапи.

РОЗДІЛ 4 БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму глюкози у *Paenibacillus polymyxa*

Джерелом вуглецю і енергії (ростовим субстратом) у поживному середовищі для *P. polymyxa* КВ є меляса яка містить у собі сахарозу.

Згідно з Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes катаболізм сахарози у *P. polymyxa* M1 проходить за шляхом Ембдена-Мейєргрофа-Парнаса (звичайний гліколіз). Сахароза за допомогою сахарозо специфічної фосфотрансферази (КФ 2.7.1.211), фосфорилюється до Сахарози-6-фосфату, що потім розпадається за допомогою 2- β-фруктофуранозидази [КФ 3.2.1.26] до Глюкози-6-фосфату та Фруктозу, остання фосфорилюється за участю 3 - фруктокінази [КФ 2.7.1.4] обидві фосфорильовані вуглеводи у подальшому включається у гліколіз.

Фосфофруктокіназа 1 (К .2.7.1.11) каталізує перетворення фруктозо-6-фосфату на фруктозо-1,6-дифосфат (зворотне перетворення каталізує фруктозо-1,6-біфосфатаза 2 (КФ 3.1.3.11) ,а у подальшому фуктозо-біфосфатальдолаза клас 2 (КФ 4.1.2.13) перетворює його на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат, а останній перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат за участі триозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1)

Гліцеральдегід-3-фосфат через ряд послідовних реакцій за участі гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази(КФ 1.2.1.12), фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат, а далі на 2-фосфогліцерат за участі 2,3-біфосфатзалежної фосфогліцератмуази (КФ 5.4.2.11), фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 2-фосфогліцерат, він через енолазу (КФ4.2.1.11) перетворюється на фосфоенолпіруват і в кінці на піруват за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

Заключною стадією гліколізу є утворення пірувату, що через ацетил-КоА до циклу трикарбонових кислот і так далі [16].

Схема катаболізму декстрану через гліколіз наведено на *рис.4.1.*

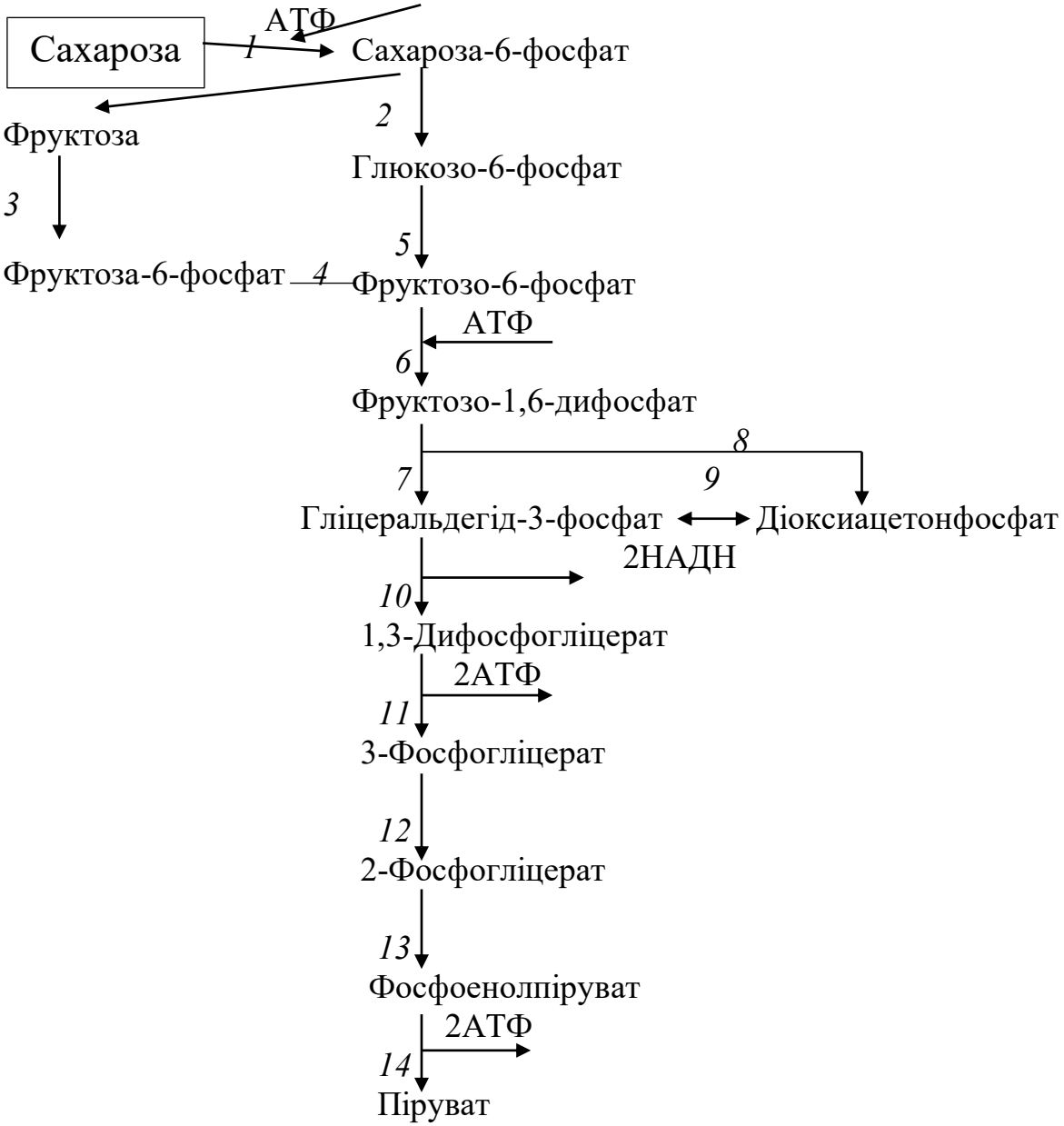

Рис. 4.1 **Катаболізм сахарози у мікроорганізмів *P. polymyxa***

Ферменти: 1- сахарозо специфічна фосфотрансфераза (КФ 2.7.1.211) ; 2- β-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26) ; 3-фруктокіназа (КФ 2.7.1.4) ; 4- глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ: 5.3.1.9) ;5- 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11); 6-фруктозо-1,6-біфосфатаза II (КФ3.1.3.11) 7, 8-фруктозобіфосфатальдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13); 9-триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1);

10 - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);

11 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 12 - 2,3-біфосфатзалежна фософгліцератмутаза (КФ 5.4.2.11), фософгліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 13 - енолаза (КФ 4.2.1.11); 14 – піруваткіназа (КФ:2.7.1.40) [16].

4.2.Біотрансформація ростового субстрату для отримання біомаси

Ростовий субстрат транспортується у клітину в процес його метаболізму утворюються інтермедіати, які використовуються як попередники амінокислот (піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, фосфоенолпіруват та ін.), жирних кислот (ацетил-КоА), нуклеїнових кислот (рибозо 5 фосфат, аспартат та ін.), полісахаридів (нуклеозиддифосфатпохідні вуглеводів).

У циклі трикарбонових кислот утворюються 2-оксоглутарат і оксалоацетат, необхідні для синтезу 10 амінокислот. у пентозофосфатному циклі - рибоза, необхідна для біосинтезу нуклеотидів. у гліколізі - фосфорильовані вуглеводи для синтезу полісахаридів.

Під час росту *Paenibacillus polymyxa* КВ на середовищі з мелясою яка складається із сахарози (джерело вуглецю) перетворюється на піруват у гліколізі. Далі піруват за участю піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1) або піруватдекарбоксилази (КФ 4.1.1.1) перетворюється на ацетил-КоА за участі. піруват-федедоксин-оксидоредуктази (КФ: 1.2.7.1).

Далі ця сполука залучається до ЦТК за участю цитрат синтази (КФ: 2.3.3.1). Даний продуцент є грам позитивною бактерією, що свідчить про наявність пептидоглікану, вихідними сполуками для синтезу якого є ацетилглюкозамін і ацетилмурамова кислота. А також характерна для прокаріотів особливість - синтез лізину через амінопімелінову кислоту[8,9, 10,11,12,13,14,15,16,17]. Схему перетворення глюкози на біомасу наведено схемі.

ферменти:

1- система АПБ, сахарозо-специфічний IIB компонент (КФ 2.7.1.211)

2- β-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26)

3- фруктокіназа (КФ 2.7.1.4)

4- глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)

5- фосфоглюкоматаза (КФ 5.4.2.2)

6- глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)

7- 6-фосфофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11)

8- фруктозо-біфосфат альдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13)

9- гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12)

10- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3)

11- 2,3-біфосфогліцерат залежна фосфогліцерат мутаза (КФ 5.4.2.11)

12- енолаза (КФ 4.2.1.11)

13- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

14- піруват-федедоксин-оксидоредуктаза α-субодиниця (КФ 1.2.7.1)

15- цитрат синтаза (КФ 2.3.3.1)

16- аконітат гідратази (КФ 4.2.1.3)

17- ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42)

18- Компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази E2 (дигідроліпоамід сукцинілтрансфераза) (КФ 2.3.1.61)

19- Сукциніл-КоА-синтетаза, β-суб'єкт (КФ 6.2.1.5)

20- Сукцинат дегідрогеназа / фумарат редуктаза (КФ 1.3.5.1, 1.3.5.4)

21- фумарат гідратаза класу II (КФ 4.2.1.2)

22- малатдегідрогеназа (хінон) (КФ 1.1.5.4)

23- L-аспартатоксидаза (КФ 1.4.3.16)

24- аргініносукцинат синтаза (КФ 6.3.4.5)

25- аргініносукцинат-ліаза (КФ 4.3.2.1)

26- аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4)

27- аспартат-семиальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11)

28- 4-гідрокситетрагідродипіколінат синтаза (КФ 4.3.3.7)

29- 4-гідрокситетрагідродипіколінат редуктаза (КФ 1.17.1.8)

30- тетрагідродипіколінат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89)

31- амінотрансфераза (КФ 2.6.1.)

32- N-ацетилдіамінопімелатдеацетилаза (КФ 3.5.1.47)

33- діамінопімелат епімераза (КФ 5.1.1.7)

34- діамінопімелат-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20)

35- глутамат-синтаза, малий ланцюг (КФ 1.4.1.131.4.1.14)

36- глутамін-синтетаза (КФ 6.3.1.2)

37- карбамоїлфосфат синтаза, велика субодиниця (КФ 6.3.5.5)

38- аспартат карбомоїл трансфер аза, каталітична субодиниця (КФ 2.1.3.2)

39- дигідроротаза (КФ 3.5.2.3)

40- дигідрооратдегідрогеназа, каталітична субодиниця (КФ 1.3.1.14)

41- оротат фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10)

42- оротидин-5-фосфат-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.23)

43- уридилаткіназа (КФ 2.7.4.22)

44- нуклеозид-дифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6)

45- 5-нуклеотидаза / УДФ-дифосфатаза (КФ 3.1.3.5 3.6.1.45)

46- цитидиндеаміназа (КФ 3.5.4.5)

47- уридин кіназа (КФ 2.7.1.48)

48- ЦМФ-кіназа (КФ 2.7.4.25)

49- нуклеозид-дифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6)

50- глутамат-5-кіназа (КФ 2.7.2.11)

51- глутамат-5-семиалдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.41)

52- ;53- пірролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2)

54- аланін дегідрогеназа (КФ 1.4.1.1)

55- ацетолактат синтаза I / II / III, велика субодиниця (КФ 2.2.1.6)

56,57- кетол- редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)

58- дигідрокси-дегідратаза (КФ 4.2.1.9)

59- амінотрансфераза(КФ 2.6.1.42)

60- 2-ізопропілмалат синтаза (КФ 2.3.3.13)

61, 62- 3-ізопропілмалат / (R) -2-метилмалатдегідратаза, мала субодиниця (КФ 4.2.1.33 4.2.1.35)

63- 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85)

64-;65- амінотрансфераза (КФ 2.6.1.42)

66- L-сериндегідратаза (КФ 4.3.1.17)

67- гліцин гідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1)

68- треонін альдолаза (КФ 4.1.2.48)

69- треонін дегідратаза (КФ 4.3.1.19)

70- ацетолактат синтаза I / II / III, велика субодиниця (КФ 2.2.1.6)

71,72- кетол-редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86)

73- дигідроксидегідратаза (КФ 4.2.1.9)

74- амінотрансфераза (КФ 2.6.1.42)

75- серин -О-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30)

76- цистеїн-синтаза А (КФ 2.5.1.47)

77- цистатіонін ϒ-ліаза / гомоцистеїн десульфогідраза (КФ 4.4.1.1 4.4.1.2)

78- цистатіонін-β-ліаза (КФ 4.4.1.8)

79- гомоцистеїн-S-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.10)

80- транскетолаза (КФ 2.2.1.1)

81- 3-дезокси-7-фосфогептулонатсинтаза / хоризмат-мутаза (КФ 2.5.1.54 5.4.99.5)

82- 3-дегідрокінат синтаза (КФ 4.2.3.4)

83- 3-дегідрокінат дегідратаза I (КФ 4.2.1.10)

84- шикімат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.25)

85- шикімат кіназа (КФ 2.7.1.71)

86- 3-фосфошикімат- 1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19)

87- хоризмат-синтаза (КФ 4.2.3.5)

88- компонент антранілат синтази I (КФ 4.1.3.27)

89- антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18)

90- фосфорибозилантранілат ізомераза (КФ 5.3.1.24)

91- індол-3-гліцерол фосфат синтаза (КФ 4.1.1.48)

92- триптофан-синтаза (КФ 4.2.1.20)

93- 3-дезокси-7-фосфогептулонатсинтаза / хоризмат мутаза (КФ 2.5.1.54 5.4.99.5)

94- префенат дегідратаза (КФ 4.2.1.51)

95- гістидінол-фосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9)

96- префенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.12)

97- гістидінол-фосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9)

98- транскетолаза (КФ 2.2.1.1)

99- рибулозо-фосфат -3-епімераза (КФ 5.1.3.1)

100- рибозо-5-фосфат ізомераза А (КФ 5.3.1.6)

101- АТФ-фосфорибозолтрансфераза, регуляторна субодиниця (КФ 2.4.2.17)

102- фосфорибозил-АТФ- пірофосфогідролаза (КФ 3.6.1.31)

103- фосфорибозил-АМФ -циклогідролаза (КФ 3.5.4.19)

104- фосфорибозил-формініо-5-аміноімідазол карбоксамід ізомераза (КФ 5.3.1.16)

105- фосфорибозил-АТФ- пірофосфогідролаза / фосфорибозил-АМФ циклогідролаза (КФ 3.6.1.31 3.5.4.19)

106- циклаза (КФ 4.1.3.)

107- імідазолгліцерол-фосфатдегідратаза (КФ 4.2.1.19)

108- гістидин-фосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9)

109- гістидин-фосфатаза (КФ 3.1.3.15)

110,111- гістидиндегідрогеназа (КФ 1.1.1.23)

112- глутамін-амідотрансфераза (КФ 2.4.2.)

113,114- фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формілтрансфераза/ ІМФ-циклогідролаза (КФ 2.1.2.3 3.5.4.10)

115- ІМФ-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.205)

116- ГМФ-синтаза (КФ 6.3.5.2)

117- гуанілаткіназа (КФ 2.7.4.8)

118- нуклеозид-дифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6)

119- аденілосукцинат синтаза (КФ 6.3.4.4)

120- аденілосукцинатліаза (КФ 4.3.2.2)

121- аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3)

122- нуклеозид-дифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6)

123- глюкозамін- фруктозо-6-фосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.16) 124- фосфоглюкозамін мутаза (КФ 5.4.2.10)

125,126-УДФ-N-ацетилглюкозамін пірофосфорилаза / глюкозамін-1-фосфат-N-ацетилтрансфераза (КФ 2.7.7.232.3.1.157)

127-УДФ-N-ацетилглюкозамін-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.7)

128- УДФ-N-ацетилмураматдегідрогеназа (КФ 1.3.1.98)

129- УДФ-N-ацетилмурамат-аланін-лігаза (КФ 6.3.2.8)

130- УДФ-N-ацетилмурамолілланін - D-глютамат лігаза (КФ 6.3.2.9)

131-УДФ-N-ацетилмурамоїл-L-аланіл-D-глутамат-2,6-діамінопімелат лігаза (КФ 6.3.2.13)

132- УДФ-N-ацетилмурамоїл-трипептид - D-аланіл-D-аланін-лігаза (КФ 6.3.2.10)

133- фосфо-N-ацетилмурамоїл-пентапептид-трансфераза (КФ 2.7.8.13) 134- УДФ-N-ацетилглюкозамін - N-ацетилмураміл- пірофосфорил-ундекапренол N-ацетилглюкозамін-трансфераза (КФ 2.4.1.227)

135- пеніцилін-зв'язуючий білок 2D (КФ 2.4.1.129 3.4.16.4)

136- D-аланіл-D-аланін карбоксипептидази (КФ 3.4.17.14)

137- фосфопантотенат - цистеїн лігаза (КФ 4.1.1.36 6.3.2.5)

138- фосфопантотенолцистеїндекарбоксилаза / фосфопантотенат-цистеїн лігаза (КФ 4.1.1.36 6.3.2.5)

139- пантотеїн-фосфат аденілілтрансфераза (КФ 2.7.7.3)

140- дефосфо-КоА кіназа (КФ 2.7.1.24)

141- 4-фосфопантетеїнтрансфераза (КФ 2.7.8.-)

142- Ацетил-КоА карбоксилаза-карбокситрансфераза, β-субодиниця (КФ 6.4.1.2 2.1.3.15)

143. - S-малонілтрансфераза (КФ 2.3.1.39)

144- 3-оксоацил- синтаза II (КФ 2.3.1.179)

145- 3-оксоацил- редуктаза (КФ 1.1.1.100)

146- 3-гідроксиацил- дегідратаза (КФ 4.2.1.59)

147- еноїл- редуктаза I [ЄС: 1.3.1.9 1.3.1.10)

148- тріозфосфат ізомераза (TIM) (КФ 5.3.1.1)

149- гліцерат 2-кіназа (КФ 2.7.1.165)

150- альдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.3)

151- тріозо / дигідроксиацетонкіназа / ФАД-АМФ-ліаза (КФ 2.7.1.28 2.7.1.29 4.6.1.15)

152- гліцерол дегідрогеназа (КФ 1.1.1.6)

153- гліцерол кіназа (КФ 2.7.1.30)

154- гліцерол-3-фосфоацилтрансфераза(КФ 2.3.1.15)

155- діацилгліцеролкіназа (КФ 2.7.1.107)

156- фосфатидат цитидилтрасфераза (КФ 2.7.7.41)

157- 1,2-діацилгліцерол-β-глюкозилтрансфераза (КФ 2.4.1.315)

158- фосфатидат цитидилтрасфераза (КФ 2.7.7.41)

159-ЦДФ-діацилгліцерол-гліцерол-3-фосфат-3-фосфатидилтрансфераза (КФ 2.7.8.5)

160- ЦДФ-діацилгліцерол-серин-О-фосфатидилтрансфераза (КФ 2.7.8.8)

161- фосфатидилсерин-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.65)

162- глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.49 1.1.1.363)

163- 6-фосфоглюконолактоназа (КФ 3.1.1.31)

164- 6-фосфоглюконатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44.1.1.343)

165- рибозо- 5-фосфат ізомераза А (КФ 5.3.1.6)

166- транскетолаза (КФ 2.2.1.1)

167- фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2)

168- УТФ - глюкоза-1-фосфат уридилтрансфераза (КФ 2.7.7.9)

169-УДФ-глюкоза 4-епімераза(КФ 5.1.3.2).

РОЗДІЛ 5 ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обгрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1 Обґрунтування способу культивування

Paenibacillus polymyx по відношенню до температури є мезофілом, так як оптимальна температура для культивування штаму становить 30 °С, а оптимальне значення pH — 7-7,2. Таке значення температури та кислотності можуть становити високий ризик контамінації. Тому, це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, чого не можливо досягнути при поверхневому культивуванні [12].

Культивування за допомогою глибинного метода використовують на рідких середовищах, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі. Поєднання поживного середовища і мікроорганізмів, які ростуть в ньому називають культуральною рідиною. Так як мікроорганізми можуть споживати тільки розчинний в воді кисень взагалі розчиність кисню у воді невелика, тому для забезпечення росту аеробів їх необхідно постійно збагачувати киснем. Процес підведення кисню в глибину рідкого середовища називається аеруванням. Аерування здійснюється шляхом продування стерильного повітря крізь культуральну рідину.

Глибинний метод використовується для отримання біомаси мікроорганізмів (пресовані хлібопекарські дріжджі, кормові дріжджі) і різних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів (органічні кислоти, ферменти, антибіотики, амінокислоти).

Аерацію в ферментері поєднують із перемішуванням середовища за допомогою мішалок, які обертаються із частотою від десятків до тисяч обертів за хвилину.

Перевага глибинного культивування в тому, що цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, об'єм ферментера можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Ще однією з переваг є простота обслуговування та можливість автоматизації та також зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини [17].

5.1.2. Обґрунтування вибору типу ферментера

При виборі ферментера враховують фізіолого-біохімічні та морфолого-культуральні особливості штаму продуцента, а також економічні потреби продукції.

Так як продуцент є аеробом (потребує кисню), то ферментер має бути оснащений барботером та перемішуючим пристроєм, який дозволить максимально інтенсифікувати масообмінні процеси.

Середовище для культивування містить кукурудзяний екстракт, мелясу, які спричинюють піноутворення, тому необхідно встановити піногасник. Встановлюємо механічний піногасник. Цим ми зменшуємо можливість контамінації, і виключаємо витрати на хімічні піногасники.

Необхідно забезпечити перемішування середовища. Оскільки *P. polymyxa* КВ не утворює міцелію чи конгломератів клітин, для перемішування використовуємо лопатеву мішалку. Для вирощування культури *P. polymyxa* достатня швидкість обертів мішалки – 200-250 об/хв, за якої досягається необхідна подача кисню у культуральну рідину. Для запобігання утворення воронки в апараті необхідно встановити відбивні перегородки, які, крім того, сприяють виникненню вихрів і збільшенню турбулентності системи, що буде призводити до підвищення ефективності перемішування [12].

Обираємо ферментер, який буде оснащений барботером, механічним піногасником, лопатевою мішалкою, та відбивними перегородками.

5.2 Обгрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезинфікуючих засобів для культивування *Paenibacillus polymyx* КВ – продуцента бактеріального добрива

Виробництво біодобрива на основі *Paenibacillus polymyx* КВ здійснюється впродовж 30 днів (див. розділ 1), що передбачає підготовку обладнання: ферментер об'ємом 0,7 м^3, інокулятори об'ємом 70, 10 л, збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, колби качалки, та інше таке як: бокс та лабораторне устаткування.

Таблиця 5.1

Габарити обладнання для виробництва культуральної рідини *Paenibacillus polymyx* КВ

Обладнання	Геометричний об'єм, м^3	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	0,6	0,5	1
Реактори-змішувачі для приготування та стерилізації *композиції А*	0,02	0,072	0,145
Реактор-змішувач для приготування *композиції Б*	0,04	0,144	0,289
Інокулятор 1	0,06	0,34	0,67
Реактори-змішувачі для приготування та стерилізації *композиції А*	0,02	0,072	0,145
Реактор-змішувач для приготування *композиції Б*	0,04	0,144	0,289
Інокулятор 2	0,01	0,292	0,68

Для підтримання чистоти в виробничих приміщеннях підлогу треба мити кожного дня, тобто 30 разів. Обробка стін, вікон та підлоги, тобто генеральне прибирання здійснюється один раз на місяць зважаючи на те, що виробництво встого 30 днів то генеральне прибирання робимо 1 раз. Необхідно розрахувати кількість миючих засобів. Для цього розраховуємо приблизну площу для оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 2,5 м. Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій

встановлено ферментер (700 л), ікокулятор (70 л), другий інокулятор (10 л), збірники,автоклав та інше обладнення становить 25 $м^2$ (5×5 м), Загальна площа стін – ((5 × 2,5) + (5 × 2,5)) × 2 = 50 $м^2$, загальна площа – 25 + 50 = 75 $м^2$.

Загальний об’єм апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу, реакторів-змішувачів становить 790 л. Кількість виробничих циклів для синтезу бактеріального добрива становить 15. Миття обладнання відбувається після кожного циклу, тому кількість процесів миття та/або дезинфекції за весь період виробництва приймаємо 15. Тоді загальна площа миття становитиме:

$$0,79 \times 15 = 11,85 \text{ м}^3$$

Площа підлоги становить 64 $м^2$. Її необхідно мити кожного дня (тобто 30 разів – у відповідності до кількості трудоднів). Миття поверхней стін, дверей необхідно проводити один раз на місяць. З метою проведення санітарно–епідеміологічної обробки повітря і поверхонь приміщень використовуються бактерицидні лампи. Вмикають бактерицидні лампи в приміщеннях коли люди в приміщеннях нема. Вмикають лампи на 1-2 години після генерального прибирання.

Дані щодо розрахунку площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати наведено в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2.

Розрахунок загальної площі миття та/або дезинфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва Поліміксобактерин

Об'єкт миття та/або дезинфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, $м^2$	Кількість процесів митгя та/або дезинфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезинфекції об'єкту за весь період виробництва, $м^2$
Обладнання, інвентар, комунікації	11,85	16	190
Підлога	25	30	750
Стіни, двері, вікна	50	1	50

5.2.1. Обгрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів

Вибираючи миючі та дезінфікувальні засоби, необхідно взяти до уваги їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На 1 $м^2$ затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікуючого засобу [18].

Обладнання обираємо мити автоматичною СІП мийкою, при цьому витрати мийного засобу складають 20% від загального об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$190 \times 0{,}2 = 38 \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}$$

5.2.2 Засоби для миття обладнання, інвентарю

Миття обладнання, інвентарю, комунікацій від залишків поживного середовища здійснюють миючим засобом «Біомой» та «Ексан-про-дез».

Миття обладнання відбуватиметься за допомогою CIP-мийки. Об'єм миючого засобу складатиме 20% від об'єму апарата.

Обслуговуюча площа складатиме 25 $м^2$ та буде внесена до наступних розрахунків, площа миття майданчика в рік складатиме $25 \times 30 = 750$ $м^2$.

Біомой – це мийний засіб який містить синтетичні ПАР та протеолітичні ферменти. Порошок світлого кольору (від білого до

світложовтого), який має помірний запах використаної сировини. Водні розчини біомою безбарвні та прозорі. Виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту.

На ринку Укріїни представлено багатий вибір мийних засобів. Біомой виявляє високу мийну активність при температурі не вище $+40^0$С. Розчини біомою не ушкоджує об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі. Гарно змиваються не залишаючи нальоту. Не сумісні з катіонними поверхово-активними речовинами. Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки).

Аквaклін – це миючий засіб з дезинфікуючим ефектом на основі ортофосфорної кислоти, оцтової кислоти і перекису водню, що використовується для миття обладнання.

Застосовується в різних галузях таких як харчова та фармацевтична промисловвсть.

5.2.3 Засоби для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон та дверей

Для миття та дезинфекції стін, підлоги, вікон та дверей порівняємо засоби, як «Актацид хлор», «Ексан-про-дез», «Біоконтакт».

Актацид хлор – це засіб який у вигляд порошку з трохи помірним запахом хлору для дезінфекції, перед стерилізаційного очищення та стерилізації. Його основу складають: 2,4-імідазолідіндіон - 1,3-дихлор-5,5-диметил у межах 7,0÷13,0 %.

Ексан-про-дез – це мийно-дезинфікуючий засіб з антибактеріальною дією, для миття забруднених поверхонь устаткування і приміщень.

До складу миючого засобу входить: ПАР, гліцерин, етиловий спирт, антикорозійні, антибактеріальні добавки. Способи застосування: ручний, механізований в ультразвуковому і циркуляційному миючому обладнанні, з

піногенератором, аерозольний. «Ексан-про-дез» належить до IV клас небезпеки (малонебезпечні речовина).

Біоконтакт – це мийно-дезинфікувальний засіб який містить діючі речовини: гліоксалевой альдегід, глутаровий альдегід, спеціальну суміш четвертинних амонієвих сполук, полігексаметиленгуанідин, піноутворюючі компоненти, інгібітори корозії, воду.

Препарат проявляє антимікробну дію на грамнегативну та грампозитивну мікрофлору: протей, стафілококи, колібактерії, сальмонели, клебсієли, псевдомонас, кампілобактер, клостридії (*Staphylococcus aureus*, *E. coli, Salmonella enteritidis, Salmonella pullorum, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Campylobacter jejuni, Clostridium perfringens*, інших бактерій та їх спор), проявляє віруцидну, діє проти дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans* та ін.) [20].

Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки). Порівняльна таблиця з даними щодо вартості, концентрації та витрат різних миючих та дезінфікуючих засобів наведено в *табл.5.3.*

Таблиця 5.3.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезинфікувальних засобів для виробництва Поліміксобактерину

Назва миючого/дезинфікую-чого засобу	**Об'єкт миття та/або стерилізації**	**Вартість 1 л/(кг) миючого та/або дезинфікуючого засобу, грн.**	**Концентрація робочого розчину, %**	**Вартість 1 л робочого розчину, грн**	**Кількість робочого розчину на весь період виробництва, л**	**Загальна вартість миття за весь період, грн**
Каустична сода	Обладнання, інвертар, комунікації	18	2	0,8	38000	30400
Біомой		63	0,3	1,89	38000	71820
Акваклін		44	2	0,88	38000	33440
Актацид хлор	Стіни, підлога, вікна, двері, тара	140	0,2	2,8	940	2632
Ексан-про-дез		53	1	0,53	940	498,4
Біоконтакт		130	0,3	3,9	940	3666

Примітки: Ціни миючих та/або дезінфікуючих засобів вказані станом на 11.05.2020. **:** *1* - http://prom

5.2.4. Обладнення стадії підготовки обладнання і комунікацій.

До основних стадій підготовки обладнання та комунікацій належать:

- Миття
- Технічний огляд
- Перевірка на герметичність
- Стерилізація

Існують різні способи внутрішньої мийки:

- ручний спосіб
- мийка низьким тиском контуром від централізованої мийки
- дезінфекція гострою парою після миття.

Але ці способи мають ряд недоліків: за допомогою гострої пари ми не зможемо єфективно вимити обладнання а тільки провести дезінфекцію, через це залишки середовища залишаться на обладнанні. Під час ручного миття бруд буде залишатись у важко доступних місцях. Для миття низьким тиском від централізованої мийки використовується велика кількість робочого розчину близько ½ об'єму обладнання.

На більшості виробництв для внутрішнього миття комунікацій та апаратів застосовують метод циркуляційної безрозбірної CIP-мийки. Технологія миття СІП мийкою є дуже ефективнішою ніж застарілий метод циркуляційного миття. Витрати миючих у циркуляційному методі складають 50 % загального об'єму апарату, а при використанні CIP-мийки лише – 30 %.

Внутрішнє миття будемо здійснювати за допомогою 2-х контурної циркуляційної безрозбірної CIP-мийки (Clean In Place).

Установка CIP являє собою насосною станцією, що підключається гнучкими шлангами до ферментера, лінії води і каналізації. Після включення оператором вона в автоматичному режимі готує миючі розчини та подає їх під тиском на кульову головку CIP. Головка CIP, обертаючись з високою швидкістю, миє безліччю струменів всю внутрішню поверхню ферментера. За рахунок потужного механічного впливу струменів процес мийки дуже

ефективний, та триває впродовж короткого часу. При цьому розчин миючий безперервно циркулює по замкнутому контуру між ферментерами і установкою CIP. Розчини проходять через циркуляційний резервуар, нагріваються у теплообміннику пластинчастому , що забезпечує економію енергії, води і миючих засобів. Така методика миття дає обраній технології перевагу над іншими способами мийки ємнісного обладнання.

Зовнішня щоденна мийка здійснюватиметься водою питною, а генеральне прибирання 1 % розчином препарату Ексан-про-дез.

Стадія технологічного огляду

Після того як пройшла стадія миття та ополіскування ємністного обладнання проводять його технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань, або їх заміну.

Перевірка на герметичність

Існує два методи перевірки на герметичність:

- омилювання розчином мила господарського
- використання течешукачів.

Метод омилювання є простим та доступним, в його основу покладено виділення бульбашок у разі наявності на апараті нещільностей, але даний метод має недоліки: є застарілим, довготривалим і менш ефективним порівняно із сучасним галогенним методом.

5.3. Обгрунтування стадій підготовки аераційного повітря.

Бактерія Paenibacillus polymyx КВ є факультативним аеробом [12].

Один із способів стерилізації повітря є опромінення ультрафіолетовими променями цей спосіб використовують для знезараження повітря в боксах. Але у цього способа є великий недолік: це утворення молекул озону з кисню.

Технологічно й економічно вигіднішим є очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів. Таким способом вдається отримати повітря з дуже високим ступенем очистки, що дозволяє його

використання для керування культуральної рідини. Завислі в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному та дифузійному механізму осадження.

Для високого очищення повітря застосовується індивідуальний та головний фільтр. Головні фільтри заповнюються грубішим волокном і на цих фільтрах видаляється близько 98 % мікроорганізмів-контамінантів.

Фільтри індивідуальні безпосередньо встановлюються перед кожним ферментером. Використання фільтрів індивідуальних, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, дозволяє отримати повітря зі найвищем ступенем очистки 99,99%.

5.4. Обгрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.

Paenibacillus polymyxa КВ вирощують на поживному середовищі такого складу (г/л):

Меляса - 40

Кукурудзяний екстракт - 20

Вермикуліт - 4

K_2HPO_4 - 0,5

KH_2PO_4 - 0,5

$MgSO_4$ - 0,5

NaCl - 0,5

$CaCO_3$ - 10,5

Треба врахувавати можливу взаємодію між компонентами та режими стерилізації і тому середовище розділяємо на композиції наступним чином:

Композиція А: меляса та кукурудзяний екстракт (112°С, 30 хв. при Р=0,05 МПа).

Такий режим стерилізації пов'язаний зі здатністю вуглеводів до карамелізації під дією високих температур, що призводить до втрати їх основних властивостей.

Композиція Б: розчини K_2HPO_4, KH_2PO_4 (131о С, 40 хв)

Композиція В: розчини MgSO4 , NaCl (131о С, 40 хв).

Композиція Г: суспензії вермикуліту, CaCO3 (131о С, 40 хв)

5.4.1 Стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

На цьому етапі об'єм середовища невеликий, стерилізація компонентів поживного середовища буде проводитися в автоклаві.

Компоненти розбивають на наступні композиції:

Композиція А: меляса та кукурудзяний екстракт (112°С, 30 хв.)

Композиція Б: розчини $К_2НРО_4$, $КН_2РО_4$ (131^{о}С, 40 хв)

Композиція В: розчини $MgSO_4$, NaCl (131^{о}С, 40 хв)

Композиція Г: суспензії вермикуліту, $CaCO_3$ (131^{о}С, 40 хв).

5.4.2. Стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л

Для даного етапу необхідно 4 л поживного середовища, які стерилізуються безпосередньо в інокуляторі місткістю 0,01 м^3 (10 л).

Окремо від солей кальцію і магнію готують розчини фосфорних солей (для запобігання утворення нерозчинних фосфатів кальцію і магнію), проте якщо підкислити середовище до pH = 4 – 4,5, то стає можливим спільна стерилізація таких солей. Для підкислення використовують соляну кислоту у розрахунку 2 мл 6% розчину кислоти на 1 л поживного середовища. Орієнтовно для даного етапу культивування необхідно 0,128 х 2 = 0,526 мл розчину соляної кислоти.

Тоді, для другої стадії розділяємо на такі композиції:

Композиція А: меляса та кукурудзяний екстракт (112°С, 30 хв. при Р=0,05 МПа).

Композиція Б: розчини $К_2НРО_4$, $КН_2РО_4$, $MgSO_4$, NaCl (131^{о}С, 40 хв).

Композиція В: суспензії крейди та вермикуліту.

5.4.3. Стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу в інокуляторі на 70 л

Для даного етапу необхідно 36 л поживного середовища, які стерилізуються безпосередньо в інокуляторі місткістю 0,06 $м^3$.

Тоді, для третьої стадії розділяємо на такі композиції:

Композиція А: меляса та кукурудзяний екстракт (112°С, 30 хв. при Р=0,05 МПа).

Композиція Б: розчини $К_2HPO_4$, KH_2PO_4, $MgSO_4$, NaCl (131^{o} С, 40 хв).

Композиція В: суспензії крейди та вермикуліту.

Для підкислення використовують розчин соляної кислоти у розрахунку 2 мл 6% розчину кислоти на 1 л поживного середовища. Орієнтовно для даного етапу культивування необхідно 0,92 х 2 = 1,84 мл розчину соляної кислоти.

5.4.4. Стерилізація поживного середовища для культивування в ферментері 0,7 $м^3$

Для даного етапу необхідно 359 л поживного середовища, які стерилізуються безпосередньо в ферментері.

Окремо від солей кальцію і магнію готують розчини фосфорних солей (для унеможливлення утворення нерозчинних фосфатів кальцію і магнію), проте якщо підкислити середовище до pH = 4 – 4,5, то стає можливою спільна стерилізація солей. Для підкислення використовують розчин соляної кислоти у розрахунку 2 мл 6% розчину кислоти на 1 л поживного середовища.

Орієнтовно для даного етапу культивування необхідно 2 х 359 = 718 л 718 мл розчину соляної кислоти. Окремо розчин соляної кислоти не стерилізують, оскільки його додають до композиції А перед стерилізацією безпосередньо у ферментері. Композиція Б стерилізується безпосередньо у ферментері.

Тоді, для третьої стадії розділяємо на такі композиції:

Композиція А: меляса та кукурудзяний екстракт (112°С, 30 хв. при Р=0,05 МПа).

Композиція Б: розчини K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4$, NaCl (131° С, 40 хв).

Композиція В: суспензії крейди та вермикуліту.

Для процесу культивування необхідне pH =7,2 то після процесу стерилізації у ферментері додають гідроксид натрію для нейтралізації кислоти в об'ємі, еквівалентному кількості соляної кислоти.

Крім того, розчин натрій гідроксиду потребує окремої стерилізації за умов 131° С, 40 хв, оскільки його подають у апарат уже після стерилізації поживного середовища.

5.5. Обгрунтування вибору та підготовка піногасника

Піногасники – це речовини, які впливають як на процес утворення піни (антивспінюючі -запобігають або знижують утворення піни), так і на стабільність вже утвореної піни (піногасники - руйнують утворену піну).

Культивання Paenibacillus polymyx КВ здійснюється глибинним способом та інтенсивною аерацією, тому процес піногасіння відіграє важливу роль під час даного виробництва. Також до складу поживного середовища входить кукурудзяний екстракт та меляса, які при інтенсивному перемішуванніможуть збільшувати кількість утворення піни. Важливо дотримуватись збалансованих пінних режимів, тому що при цьому збільшується міжфазна контактна поверхня і досягається інтенсивний масообмін між середовищем і аеруючим повітрям.

Піногасники бувають:

- механічні
- хімічні
- комбіновані піногасники

Обираємо механічний піногасник, що вигідно з економічної сторони.

5.6 Обгрунтування вибору стадій виділення та очищення цільового продукту

Бактеріальні добрива (біодобрива) випускають у різних формах:

- рідкій формі
- порошки
- напіврідкій
- гранульованій
- суспензійній (вермикулітній, торфній, гельній).

Поліміксобактерин – біопрепарат, який використовується для бактеризації насіння ярої та озимої пшениці з метою покрашення фосфорного живлення рослин [21]. Препарат являє собою сукупність біомаси та культтуральної рідини.

5.6.1 Обгрунтування способу концентрування

Упарювання це процес за допомогою якого відбувається концентрування рідких розчинів практично нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника під час кипіння рідини [21].

Проведення процесу упарювання під вакуумом має багато переваг:

- уловлюється вторинна пара, для нагрівання випарного апарата можливо використати пару низького тиску
- знижується температура кипіння розчину

Внаслідок зниження точки кипіння рідини збільшується середня різниш температур між гріючою парою і рідиною, що обігрівається, а це призводить до зменшення необхідних розмірів випарного апарата.

Однокорпусна установка включає лише один корпус упарної установки [21].

5.6.2. Обгрунтування способу сушіння

Сушінням називають видалення рідини (вологи) з рідких та твердих матеріалів. Сушінння здійснюється за допомогою сушильних установок різного типу. У Виробництві застосовують різноманітні сушарки, в яких висушують дуже різні матеріали.

Для сушіння використовують такі сушарки:

- розпилювальні
- сублімаційні

- парові-конвеєртні

Парові-конвеєрні сушарки мають такі переваги:

- володіють високою продуктивністю
- прості в обслуговувані

Сушарка являє собою металічну шафу всередині якого розташовані транспортерні стрічки. Їх виготовлено із дротової сітки із нержавіючого металу. Повітря подається через нижню частину конвеєра і нагрівається за допомогою парових калориферів.

Недоліки:

- продукт перед сушкою необхідно гранулювати;
- значні габаритні розміри та мала продуктивність

Сублімаційне сушіння. В процесі сублімаційного сушіння осмотична і капілярна волога виділяється при температурі нижче крапки замерзання вологи, що утримується в матеріалі. Тому термолабільні речовини не зазнають істотних змін, а мікробіологічні процеси гальмуються. Виморожена волога не містить розчинних у ній речовин. Внаслідок цього внутрішній перенос розчинних речовин відсутній, а сублімація льоду сполучена з помітним віднесенням з паром розчинних летучих складових частин продукту.

Розпилювальна сушильна уставновка являє собою сушильну камеру, де рідкий продукт розпилюється за допомогою швидкоповоротного диску (або форсунки). У камеру подають гаряче повітря або топочні гази, які тонко очищені в батареї циклонів та скруберах. Камери, в яких здійснюється процес сушіння, виготовляють із нержавіючої сталі. Вони бувають з плоским та конічним дном, при чому перші мають привід для видалення висушеного продукту. У камерах з конічним дном висушений продукт який вигляді порошку видаляється під дією сили тяжіння. Тривалість розпилювальної сушки дуже мала, перебування висушеного препарату в сушарці обмежується 5-8 с [22].

Отже обираємо розпилювальну сушарку, бо продукт одразу по закінченню отримується у виді порошку, і його не треба буде відправляти на дробарку.

5.6.3 Обґрунтування способу пакування

Після сушіння, сухий порошок поліміксобактерину необхідно упакувати у поліетиленові пакети по 1 кг.

Фасовка препарату здійснюється за допомогою спеціальних фасувальних апаратів.

Апарат фасує та упаковує готовий продукт у готові пакети. Автомат комплекс в складі: ваговий дозатор і ніжний запайщик постійного нагріву, призначений для дозування (фасування) і упаковки в готові полімерні пакети сипучих продуктів (кава мелена, кава зерновий, чай, спеції, приправи, цукерки, снеки, крупи, каші та ін. пр). Дозу фасування можна регулювати за допомогою електронного блоку управління в діапазоні від 20 г до 2 кг. Устаткування ідеально підходить для невеликих виробництв, лінія здатна видати до 10 упаковок в хвилину [23].

Дозатор ваговий.Складається з:

- приймального бункера для продукту;
- вібродозатора - переміщення продукту з бункера в ваговимірювальний ковш;
- ваговимірювальний ковш;
- лійка з тубусом для потрапляння продукту з ковша в тару.

Можемо зробити висновок, що якщо у нас форма випуску порошок, то пакування буде відбуватися у поліетиленові пакети.

РОЗДІЛ 6. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ПАРТІЮ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

Згідно з техніко-економічним обґрунтуванням для виготовлення біодобрива «Поліміксобактерин» за рік необхідно отримати 5100 л. Таку кількість продукту можливо виготовити за Трд = 30 робочих днів.

Концентрація *Paenibacillus polymyx* КВ 4 г/л спостерігається при культивування на середовищі наступного складу, г/л:

C_1 – меляса - 40;

C_2 – кукурудзяний екстракт - 20

C_3 – Вермикуліт - 4

C_4 – K2HPO4 - 0,5

C_5 –KH2PO4 - 0,5

C_6 MgSO4 - 0,5

C_7NaCl - 0,5

C_8 CaCO3 - 10,5

Всього $C_{\Sigma ф}$ = 76,5гл.

Посівний матеріал вирощують на середовищі такого складу:

C_1 – меляса - 40;

C_2 – кукурудзяний екстракт - 20

C_3 – Вермикуліт - 4

C_4 – K2HPO4 - 0,5

C_5 –KH2PO4 - 0,5

C_6 MgSO4 - 0,5

C_7NaCl - 0,5

C_8 CaCO3 - 10,5

Всього $C_{\Sigma ф}$ = 76,5 гл.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

1) час циклу роботи ферментера $Т_{цф} = Т_{ф} + Т_{по} = 45$ год, де $Т_{по}$ – тривалість підготовчих операцій;
2) коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій приймаємо $К_1 = 1,1$;
3) коефіцієнт заповнення ферментера, інокулятора та посівного апарата обираємо $К_{зф} = К_{зі} = К_{па} = 0,5$;
4) коефіцієнт заповнення колб приймаємо $К_{кол} = 0,2$;

коефіцієнт заповнення збірників-змішувачів та реакторів обираємо $К_{зр} = К_{зб} = 0,8$;

1) сумарні втрати при виділені цільового продукту $Е_{св} = 0,01$;
2) кількість посівного матеріалу для виробничого ферментера обираємо $Х_{ф} = 0,1$;
3) кількість посівного матеріалу для посівного апарату $Х_{па} = 0,1$;
4) кількість посівного матеріалу для інокулятора$Х_{ін} = 0,1$;
5) кількість посівного матеріалу для качалочних колб $Х_{кол} = 0,1$;
6) втрати культуральної рідини під час біосинтезу і отримання посівного матеріалу в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря становлять $Е_{ф} = Е_{і} = 0,1$;
7) втрати культуральної рідини під час вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці $Е_{кол} = 0,01$;
8) конденсат при стерилізації компонентів в колбах у автоклаві не утворюється ($К_{кон} = 0$);
9) при стерилізації компонентів у реакторах-змішувачах, інокуляторах або ферментері $К_{кон} = 0,1$;

6.1 Розрахунок виробничих циклів

Кількість продукту на добу: $V_{гп} = G_{гп}/G_{рд} = 5100/30 = 170$ л/добу.

Кількість продукту за цикл:

$V_{цк} = V_{гпд} \times Т_{цф}/24 = 170 \times 45/24 = 319$ л

Об’єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію:

$V_{кр} = (К_1 \times V_{цк} \times Т_{цф})/24 = (1,1 \times 319 \times 45)/24*(1-0,01) = 651,4$ л

Кількість виробничих циклів на рік:

$N_ц = V_{гп}/V_{кр} = 5100/319 = 16$

6.1.1 Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат (в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря = 10 %) при біосинтезі дорівнює:

$V_{роб1} = V_{кр} (1-Е_ф) = 651 (1-0,1) = 723,3$ л

Кількість поживного середовища для виробничого ферментера буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб1} (1+Х_ф) = 723,3 / (1+0,1) = 658$ л

Витрати посівного матеріалу на засів виробничого ферментера становлять:

$V_{пм1} = V_{роб1} – V_{пс1} = 723,3 – 658 = 65,3$ л

Визначення кількості стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість ПМ становить $Х_ф = Х_{па} = Х_і = Х_{колб} = 0,1\%$ від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з посівного апарата

Vпмф = 65,3 л

ПМ для посівного апарата з інокулятора

Vпма = VпмфХпа = 65,3×0,1= 7 л

ПМ дляінокулятора з качалочних колб Vпмі = VпміХін= 7×0,1= 0,7 л

Отже маємо 3 ступеневу стадію отримання ПМ.

Приготування та стерилізація поживного середовища та води для виробничого біосинтезу

Об'єм поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 0,7 $м^3$ = 658 л.

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псф}$ складають:

$G_ф = V_{псф} \times C_{Σф} = 658 \times 76,5 = 50,3$ кг в тому числі:

Меляса$G_1 = G_ф \times (C_1/C_{Σф}) = 50,3 \times (4076,5) = 26,3$

Кукурудзяний екстракт $G_2 = G_ф \times (C_2/C_{Σф}) = 50,3 \times (2076,5) = 13,1$

Вермикуліт $G_3 = G_ф \times (C_2/C_{Σф}) = 50,3 \times (476,5) = 3$

K2HPO4 $G_4 = G_ф \times (C_4/C_{Σф}) = 50,3 \times (0,576,5) = 0,4$

KH2PO4 $G_5 = G_ф \times (C_5/C_{Σф}) = 50,3 \times (0,576,5) = 0,4$

MgSO4 $G_6 = G_ф \times (C_6/C_{Σф}) = 50,3 \times (0,576,5) = 0,4$

NaCl $G_7 = G_ф \times (C_7/C_{Σф}) = 50,3 \times (0,576,5) = 0,4$

крейда $G_8 = G_ф \times (C_8/C_{Σф}) = 50,3 \times (10,576,5) = 7$

Необхідно розрахувати кількість води яка буде потрібна для приготування та стерилізації розчину меляси та кукурудзяного екстракту (композиція А) у реакторі-змішувачі гострою парою з урахуванням утворення конденсату.Кількість води визначають за наступною формулою: $V_{вф} = V_{псф} - G_ф - V_{фк}$, де $V_{фк} = V_{псф} \times K_{кон}$ – розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{кон}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища. При стерилізації компонентів у реакторі-змішувачі $K_{кон}$становитиме 0,1.

Оскільки об'єм поживного середовища яке необхідно простерилізувати становить 658 л то розрахуємо кількість конденсату:

$V_{фк} = 658 \times 0,1 = 66$ л

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде: $V_{вф} = 658 - 66 - 50,3 = 542$ л

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л = 1 кг.

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері геометричним об'ємом 0,7 м^3

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, л:

Меляса $V_{1B} = V_ф \times (C_1/C_Σ) = 542\times (4076,5) = 283$

Кукурудзяний екстракт $V_{1B} = V_ф \times (C_2/C_Σ) = 542\times (2076,5) = 142$

Вермикуліт $V_{1B} = V_ф \times (C_3/C_Σ)$ $542\times (476,5) = 28,2$

K2HPO4 $V_{1B} = V_ф \times (C_4/C_Σ) = 542\times (0,576,5) = 3,25$

KH2PO4 $V_{1B} = V_ф \times (C_5/C_Σ) = 542\times (0,576,5) = 3,25$

MgSO4 $V_{1B} = V_ф \times (C_6/C_Σ) = 542\times (0,576,5) = 3,25$

NaCl $V_{1B} = V_ф \times (C_7/C_Σ) = 542\times (0,576,5) = 3,25$

крейда $V_{1B} = V_ф \times (C_8/C_Σ) = 542\times (10,576,5) = 74,25$

Таблиця 6.1.

Склад композизій для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 0,7 м^3

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування, середовища, кг (л)	Композиція	Об`єм композиції, V,л
Меляса	40	26,3	А	487
Вода		283		
Кукурудзяний екстракт	20	13,1		
Вода		142		
Конденсат		22		
K_2HPO_4	0,5	0,4	Б	36,6

Закінчення таблиці 6.1

KH_2PO_4	0,5	0,4	Б	36,6
$MgSO_4$	0,5	0,4		
NaCl	0,5	0,4		
Вода		13		
Конденсат		22		
Крейда	10,5	7	В	134,6
Вода		74,3		
Вермикуліт	4	3		
Вода		28,2		
Конденсат		22		
Разом:		658		658

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі геометричним об'ємом 0,07 м^3

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в ферментері становить:

Vін=Vпмін/(1-Еін)=65,3/(1-0,1)= 73 л

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

Vпсін=Vін/(1+Хін)= 73/(1+0,1)= 66,3 л

Неохідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

Vкол=Vін-Vпсін=73 – 66,3 = 7 л

Згідно з прийнятим складом загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища Vпсін становить:

Gзаг = Vпсім × CΣ = 66,3 × 76,5 = 5,08 кг, в тому числі по компонентно, кг:

Меляса$G_1 = G_ф \times (C_1/C_{Σф}) = 5,08 \times (4076,5) = 2,6$

Кукурудзяний екстракт $G_2 = G_ф \times (C_2/C_{Σф}) = 5,08 \times (2076,5) = 1,3$

Вермикуліт $G_3 = G_ф \times (C_2/C_{Σф}) = 5,08 \times (476,5) = 0,26$

K2HPO4 $G_4 = G_ф \times (C_4/C_{Σф}) = 5,08 \times (0,576,5) = 0,04$

KH2PO4 $G_5 = G_ф \times (C_5/C_{Σф}) = 5,08 \times (0,576,5) = 0,04$

MgSO4 $G_6 = G_ф \times (C_6/C_{Σф}) = 5,08 \times (0,576,5) = 0,04$

NaCl$G_7 = G_ф \times (C_7/C_{Σф}) = 5,08 \times (0,576,5) = 0,04$

крейда $G_8 = G_ф \times (C_8/C_{Σф}) = 5,08 \times (10,576,5) = 0,70$

Стерилізвація компонентів в композиціях буде здійснюватися в окремих реакторах гострою парою, приймаємо Ккон=0,1, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

Vпак=Vпсіп•Ккон=66,3•0,1= 4 л

Загальна кількість води необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, буде становити:

Vв=Vпсіп-Vпак-Gзаг= 66,3 – 4 -5,08 =57,2 л

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, л:

Меляса $V_{1В} = V_ф \times (C_1/C_Σ) = 57,2 \times (4076,5) = 30$

Кукурудзяний екстракт $V_{1В} = V_ф \times (C_2/C_Σ) = 57,2 \times (2076,5) = 15$

Вермикуліт $V_{1В} = V_ф \times (C_3/C_Σ) = 57,2 \times (476,5) = 3$

K2HPO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_4/C_Σ) = 57,2 \times (0,576,5) = 0,3$

KH2PO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_5/C_Σ) = 57,2 \times (0,576,5) = 0,3$

MgSO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_6/C_Σ) = 57,2 \times (0,576,5) = 0,3$

NaCl$V_{1В} = V_ф \times (C_7/C_Σ) = 57,2 \times (0,576,5) = 0,3$

крейда $V_{1В} = V_ф \times (C_8/C_Σ) = 57,2 \times (10,576,5) = 87,8$

Розраховуємо кількість конденсату по компонентно, л:

Меляса$V_{1В} = V_ф \times (C_1/C_Σ) = 4 \times (4076,5) = 2$

Кукурудзяний екстракт $V_{1В} = V_ф \times (C_2/C_Σ) = 4 \times (2076,5) = 1$

Вермикуліт $V_{1В} = V_ф \times (C_3/C_Σ)$ $4 \times (476,5) = 0,2$

K2HPO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_4/C_Σ) = 4\times (0,576,5) = 0,02$

KH2PO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_5/C_Σ) = 4 \times (0,576,5) = 0,02$

MgSO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_6/C_Σ) = 4\times (0,576,5) = 0,02$

NaCl $V_{1В} = V_ф \times (C_7/C_Σ) = 4\times (0,576,5) = 0,02$

крейда $V_{1В} = V_ф \times (C_8/C_Σ) = 4\times (10,576,5) = 0,5$

Таблиця 6.2.

Склад композизій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 0,07м^3

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування,г/л	Композиція	Об`єм композиції, V,л
Меляса	40	2,6	А	52
Конденсат		2		
Вода		30		
Кукурудзяний екстракт	20	1,3		
Конденсат		1		
Вода		15		
K_2HPO_4	0,5	0,04	Б	1,6
KH_2PO_4	0,5	0,04		
$MgSO_4$	0,5	0,04		
NaCl	0,5	0,04		
Конденсат		0,08		

Закінчення таблиці 6.2

Вода		1,36	В	12,5
Крейда	10,5	0,7		
Конденсат		0,5		
Вода		7,8		
Вермикуліт	4	0,3		
Конденсат		0,2		
Вода		3		
Разом:		66,3		66,3

Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі геометричним об'ємом 0,02 м^3

Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті (10л) з врахуванням втрат (в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря = 10 %) при біосинтезі:

$V_{па}= V_{пмф} (1-E_{па}) =7 (1-0,1) = 8$ л

Кількість поживного середовища для посівного матеріалу буде становити:

$V_{псп}= V_{па} (1+X_{па}) = 7,7 / (1+0,1) = 7,2$ л

Кількість посівного матеріалу становить:

$V_{пмп}= V_{па}- V_{псп}= 8 –7,2= 0,8$ л.

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псп}$ складають:

Gзаг = Vпсім × CΣ = 7,2× 76,5 = 0,551 г, в тому числі:

МелясаG$_1$ = G$_ф$ × (C$_1$/C$_{Σф}$) = 0,551 × (4076,5) = 0,29

Кукурудзяний екстракт G$_2$ = G$_ф$ × (C$_2$/C$_{Σф}$) =0,551 × (2076,5) = 0,14

Вермикуліт G$_3$ = G$_ф$ × (C$_2$/C$_{Σф}$) = 0,551 × (476,5) = 0,03

K2HPO4 G$_4$ = G$_ф$ × (C$_4$/C$_{Σф}$) = 0,551 × (0,576,5) = 0,003

KH2PO4 G$_5$ = G$_ф$ × (C$_5$/C$_{Σф}$) = 0,551 × (0,576,5) = 0,003

MgSO4 G$_6$ = G$_ф$ × (C$_6$/C$_{Σф}$) = 0,551 × (0,576,5) = 0,003

NaCl G$_7$ = G$_ф$ × (C$_7$/C$_{Σф}$) = 0,551 × (0,576,5) = 0,003

крейда G$_8$ = G$_ф$ × (C$_8$/C$_{Σф}$) = 0,551 × (10,576,5) = 0,08

Стерилізвація компонентів в композиціях буде здійснюватися в окремих реакторах гострою парою, приймаємо Ккон=0,1, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

Vпак=Vпсіп•Ккон=7,2•0,1=0,72 л

Загальна кількість води необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, буде становити:

Vв=Vпсіп-Vпак-Gзаг=7,2-0,4-0,551 = 6,3 л

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, л:

МелясаV$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_1$/C$_Σ$) = 6,3× (4076,5) = 3,2

Кукурудзяний екстракт V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_2$/C$_Σ$) = 6,3× (2076,5) = 1,6

Вермикуліт V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_3$/C$_Σ$) 6,3× (476,5) = 0,3

K2HPO4 V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_4$/C$_Σ$) = 6,3× (0,576,5) = 0,04

KH2PO4 V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_5$/C$_Σ$) = 6,3 × (0,576,5) = 0,04

MgSO4 V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_6$/C$_Σ$) = 6,3 × (0,576,5) = 0,04

NaCl V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_7$/C$_Σ$) = 6,3× (0,576,5) = 0,04

крейда V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_8$/C$_Σ$) = 6,3 × (10,576,5) = 0,86

Розраховуємо кількість конденсату по компонентно, л:

Меляса$V_{1В} = V_ф \times (C_1/C_Σ) = 0,72\times (4076,5) = 0,37$

Кукурудзяний екстракт $V_{1В} = V_ф \times (C_2/C_Σ) = 0,72\times (2076,5) = 0,18$

Вермикуліт $V_{1В} = V_ф \times (C_3/C_Σ)\ 0,72\times (476,5) = 0,04$

K2HPO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_4/C_Σ) = 0,72 \times (0,576,5) = 0,004$

KH2PO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_5/C_Σ) = 0,72\times (0,576,5) = 0,004$

MgSO4 $V_{1В} = V_ф \times (C_6/C_Σ) = 0,72 \times (0,576,5) = 0,004$

NaCl $V_{1В} = V_ф \times (C_7/C_Σ) = 0,72\times (0,576,5) = 0,004$

крейда $V_{1В} = V_ф \times (C_8/C_Σ) = 0,72 \times (10,576,5) = 0,09$

Таблиця 6.3.

Склад композизій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в вінокуляторі геометричним об'ємом 0,02 м^3

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування,г/л	Композиція	Об`єм композиції, V,л
Меляса	40	0,29	А	5,78
Конденсат		0,37		
Вода		3,2		
Кукурудзяний екстракт	20	0,14		
Вода		1,6		
Конденсат		0,18	Б	0,188
K_2HPO_4	0,5	0,003		
KH_2PO_4	0,5	0,003		

Закінчення таблиці 6.3

$MgSO_4$	0,5	0,003		
NaCl	0,5	0,003		
Конденсат		0,016		
Вода		0,16		
Крейда	10,5	0,08	В	1,4
Конденсат		0,09		
Вермикуліт	4	0,03		
Конденсат		0,3		
Вода		0,04		
Разом:		7,2		7,2

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

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу становить:

Vін=Vпмін/(1-Еін)= 0,7/(1-0,1)= 0,77 л

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

Vпсін=Vін/(1+Хін)= 0,77/(1+0,1)= 0,7 л

Неохідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

Vкол=Vін-Vпсін= 0,77-0,7 = 0,07 л = 70 мл

Згідно з прийнятим складом загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища Vпсін становить:

Gзаг = Vпсім × CΣ = 0,7 × 76,5 = 53,55 г, в тому числі по компонентно, г:

МеляcаG$_1$ = G$_ф$ × (C$_1$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (4076,5) = 27,9

Кукурудзяний екстракт G$_2$ = G$_ф$ × (C$_2$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (2076,5) = 13,9

Вермикуліт G$_3$ = G$_ф$ × (C$_2$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (476,5) = 2,7

K2HPO4 G$_4$ = G$_ф$ × (C$_4$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (0,576,5) = 0,32

KH2PO4 G$_5$ = G$_ф$ × (C$_5$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (0,576,5) =0,32

MgSO4 G$_6$ = G$_ф$ × (C$_6$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (0,576,5) = 0,32

NaCl G$_7$ = G$_ф$ × (C$_7$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (0,576,5) = 0,32

крейда G$_8$ = G$_ф$ × (C$_8$/C$_{Σф}$) = 53,55 × (10,576,5) = 7,3

Стерилізація компонентів в композиціях буде здійснюватися в автоклаві, тому конденсат утворюватися не буде.

Загальна кількість води необхідна для розбавлення компонентів поживного середовища, буде становити:

Vв=Vпсіп-Vпак-Gзаг=770-53,55, = 716,45 мл

Розраховуємо кількість води для розчинення по компонентно, мл:

МеляcаV$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_1$/C$_Σ$) = 716,45× (4076,5) = 373,9

Кукурудзяний екстракт V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_2$/C$_Σ$) = 716,45× (2076,5) =186,9

Вермикуліт V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_3$/C$_Σ$) 716,45× (476,5) = 37,2

K2HPO4 V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_4$/C$_Σ$) = 716,45× (0,576,5) = 4,2

KH2PO4 V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_5$/C$_Σ$) = 716,45× (0,576,5) = 4,2

MgSO4 V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_6$/C$_Σ$) = 716,45× (0,576,5) = 4,2

NaClV$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_7$/C$_Σ$) = 716,45× (0,576,5) = 4,2

крейда V$_{1В}$ = V$_ф$ × (C$_8$/C$_Σ$) = 716,45× (10,576,5) = 98,1

Таблиця 6.4.

Склад композицій для стерилізації середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування,	Композиція	Об`єм композиції, V,л
Меляса	40	27,9	А	552
Вода		373,9		
Кукурудзяний екстракт	20	13,9		
Вода		186,9		
K_2HPO_4	0,5	0,3	Б	1,4
KH_2PO_4	0,5	0,3		
Вода		8,4		
$MgSO_4$	0,5	0,3	В	1,4
NaCl	0,5	0,3		
Вода		8,4		
Крейда	10,5	7,3		

Закінчення таблиці 6.4

Вода		98,1	Г	145,3
Вермикуліт	4	2,7		
Вода		37,2		
Разом:		700		700

Усі композиції готуються у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклаві

6.3 Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 6.5.

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм^3	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм^3
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ , г (мл)			
1.1.	Меляса	28	Нестерильне ПС	700
1.2.	Кукурудзяний екстракт	14		

Продовження таблиці 6.5

1.3.	K_2HPO_4	0,32		
1.4.	KH_2PO_4	0,32		
	$MgSO_4$	0,32		
	NaCl	0,32		
	Крейда	7,3		
	Вермикуліт	3		
	Вода	646,5		
	Всього:	700	Всього:	700
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1.	Нестерильне ПС	700	Стерильне ПС	700
	Всього:	700	Всього:	700
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ, г (мл)			

Продовження таблиці 6.5

3.1.	Стерильне ПС	700	Посівний матеріал	770
3.2.	Посівний матеріал з колби	70		
	Всього:	770	Всього:	770
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 0,02 м3			
4.1.	Меляса	0,29	Нестерильне ПС	6,4
4.2.	Кукурудзяний екстракт	0,14		
4.3.	K_2HPO_4	0,003		
4.4.	KH_2PO_4	0,003		
	$MgSO_4$	0,003		
	NaCl	0,003		
	Крейда	0,08		
	Вермикуліт	0,03		
	Вода	5,8		
	Всього:	6,4		6,4
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩАДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 0,02 м3			
5.1.	Нестерильне ПС	6,4	Стерильне ПС	7,2

Продовження таблиці 6.5

5.2.	Конденсат	0,8	(втрат немає)	0,0
	Всього:	7,2	Всього:	7,2
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В МАЛОМУ ІНОКУЛЯТОРІ			
6.1.	Стерильне ПС	7,2	Посівний матеріал	7,2
6.2.	Посівний матеріал з колб на качалках	0,8		
6.3.	Втрати (частка)	0,1		0,8
	Всього:	8	Всього:	8
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ’ЄМОМ 0,07 м3			
7.1.	Меляса	2,6	Нестерильне ПС	62,3

Продовження таблиці 6.5

7.2.	Кукурудзяний екстракт	1,3		
7.3.	K_2HPO_4	0,04		
7.4.	KH_2PO_4	0,04		
	$MgSO_4$	0,04		
	NaCl	0,04		
	Крейда	0,26		
	Вермикуліт	0,70		
	Вода	57,3		
	Всього:	62,3	Всього:	62,3
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА			
8.1.	Нестерильне ПС	62,3	Стерильне ПС	66,3

Продовження таблиці 6.5

8.2.	Конденсат	4	(втрат немає)	0,0
	Всього:	66,3	Всього:	66,3
9.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ			
9.1.	Стерильне ПС	66,3	Посівний матеріал	66,3
9.2.	Посівний матеріал з малого інокулятора	7		
9.3.	Втрати (частка)	0,1		7
	Всього:	73	Всього:	73
10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА ОБ'ЄМОМ 0,7 $м^3$			
10.1.	Меляса	26,3	Нестерильне ПС	592
10.2.	Кукурудзяний екстракт	13,1		
10.3.	K_2HPO_4	0,4		
10.4.	KH_2PO_4	0,4		

Закінчення таблиці 6.5

	$MgSO_4$	0,4		
	NaCl	0,4		
	Крейда	7		
	Вермикуліт	3		
	Вода	541		
	Всього:	592	Всього:	592
11.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ			
11.1.	Нестерильне ПС	592	Стерильне ПС	658
11.2.	Конденсат	66	(втрат немає)	0,0
	Всього:	658	Всього:	658
12.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ			
12.1.	Стерильне ПС	658	Культуральна рідина	651,3
12.2.	Посівний матеріал з інокулятора	65,3		
12.3.	Втрати (частка)	0,1		72
	Всього:	723,3	Всього:	723,3

6.4. Уточнюючий розрахунок ферментаційного обладнання

Оскільки, кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (651,3 л) практично співпадає із кількістю культуральної рідини, визначеної відповідно у розрахунку кількості партій продукту (651,4 л), тому можемо сказати, що матеріальний баланс зроблено вірно.

Уточнюючий розрахунок проводиться на основі продуктового розрахунку та матеріального балансу з метою уточнення коефіцієнтів заповнення обладнання.

6.4.1 Уточнюючий розрахунок кількості ферментерів

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $К_з$ = 0,5:

$V_{гф} = V_ф/К_з = 0,4/0,6 = 1,4$ м^3.

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом ферментер: $V_{нф}$ = 1,6 м^3.

Кількість виробничих ферментерів при заданому $К_з$:

$N_{фр} = V_{гф}/ V_{нф} = 1,4/0,6 = 0,875$ – приймаємо 1

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$К_{зф}= V_ф/(V_{нф}N_{фр}) = 0,4/0,6\cdot1 = 0,666$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65), то приймаємо до установки ферментерів 1 + 1 запасний.

6.4.2. Уточнюючий розрахунок кількості посівних апаратів

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

$V_{гпа} = V_{па}/К_з = 0,036/0,6 = 0,06$ м^3.

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом посівний апарат: $V_{нпа}$ =0,7 м^3.

Кількість посівних апаратів при заданому $К_з$:

$N_{пар} = V_{гпа}/V_{нпа} = 0,06/0,6 = 0,08$– приймаємо 1

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці посівних апаратів:

$К_{зпа}= V_{па}/ (V_{нпа}N_{пар}) = 0,036/(0,6\cdot1) = 0,06$.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5 – 0,65), то приймаємо до установки посівних апаратів 1 + 1 запасний.

6.4.3. Уточнюючий розрахунок кількості інокуляторів

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому $К_з$ = 0,6:

$V_{гін1} = V_{ін1}/К_з$ = 70/0,6= 116л.

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом інокулятор: $V_{нін1}$ = 100 л.

Кількість інокуляторів при заданому $К_{зін}$:

$N_{ін1р} = V_{гін1}/ V_{нін1}$ = 70/100 = 0,7 – приймаємо 1

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного з таблиці інокулятора:

$К_{зін}= V_{ін1}/ (V_{нін1}N_{ін1р})$ = 70/(100·1) = 0,7.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,5 – 0,65), приймаємо до установки інокуляторів 1 + 1 запасний.

6.4.4. Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

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

$V_{гколб} = V_{колб}/К_{колб}$ = 0,7/0,2 = 3,5 л

Об'єм 1 качалочної колби $V_{нколб}$ = 0,750 л.

Кількість качалочних колб при заданому $К_{колб}$ = 0,2:

$N_{колб} = V_{гколб}/ V_{нколб}$= 3,5/0,75 = 5 колб.

6.5. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування та стерилізації поживного середовища

6.5.1. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 0,7 м^3

Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для приготування композиції А об'ємом $V_А = V_{пс} – V_{кон}$=658-65,3= 593 л

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8:

$V_{Аг} = V_А/К_{зб}$ =0,324 /0,8 = 405 л

Вибираємо найближчий за номінальним об’ємом реактор: $V_{нр}$ = 500 л

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Аг}/V_{нр}$ = 324/500= 0,65 Приймаємо - 1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$К_{зр}= V_А/(V_{нр}N_р)$ = 359/(500·1) = 0,72

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

6.5.2. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 0,07 м^3

Підбираємо геометричний об’єм реактора-змішувача для приготування композиції А

Приблизний геометричний об’єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8:

$V_{Аг} = V_А/К_{зб}$ = 52/0,8 = 65 л

Вибираємо найближчий за номінальним об’ємом реактор: $V_{нр}$ = 70 л

Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Аг}/V_{нр}$ = 65/70 = 0,9. Приймаємо -1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$К_{зр}= V_А/(V_{нр}N_р)$ =52/(70·1) = 0,74.

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,6 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

6.5.3. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі об’ємом 0,02 м^3

Підбираємо геометричний об’єм реактора-змішувача для приготування композиції Приблизний геометричний об’єм реактора-змішувача при заданому $К_{зб}$ = 0,8:

$V_{Аг} = V_А/К_{зб}$ = 6/0,8 = 7,5 л

Вибираєм найближчий за номінальним об’ємом реактор: $V_{нр}$ = 8 л. Кількість реакторів при заданому $К_{зб}$ становить:

$N_р = V_{Аг}/V_{нр}$ = 6/7,5= 0,8. Приймаємо – 1 од.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$К_{зр}= V_А/(V_{нр}N_р)$ = 6/(5·1) = 0,8

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення в заданих межах співпадає (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у *табл. 7.1*.

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	**Найменування**	**Кількість**	**Технічна характеристика (виробник)**
1	*2*	*3*	*4*
Р3	Реактор-змішувач для проготування дезинфікуючого засобу	1	Реактор об'ємом 100 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв [24].
Н4,Н8,Н13	Насос відцентровий	3	Відцентровий насос серії CPm 150. Напір: 29-15 м; продуктивність: 1,2-7,2 м³/год, Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304 Виробник: WestHeating, Україна, Львів [25].
Р7, Р12	Реактор-змішувач для приготування титруючих розчинів	2	Реактор-змішувач об'ємом 60,100 л оснащені перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв. Сталь. Виробник Ейрена СК, Росія [26]

Продовження таблиці 7.1

Ф15	Фільтр попередній	1	Тип ФЯР – комірчасті, загальна запиленість якого не більше 5 мг/м^3. Ефективність 45 – 80 %. Площа робочого січення – 0,22 м^2. Виробник: «General filter» (Італія) [27].
К16	Компресор	1	Компресор AirStation A07 314 з робочим тиском 0,8 МПа. Виробник: «Comprag Group» (Німеччина) [28].
Р18	Ресивер-вологовідділювач	1	Ресивер Р 900.800.01, робочий тиск 10 атм, температура нагріву до +100 °С; Виробник: «Пневмо-комплект», (Україна) [29]
Ф20	Фільтр головний	1	Фільтр F9. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно з алюмінієвими розділювачами, Е = 95%. Виробник: «General filter» (Італія) [30].
Р24, Р28, Р32	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А,Б,В	3	Реактор-змішувач об'ємом 40,60,200,800 л оснащені перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв. Сталь. Виробник Ейрена СК, Росія [31].
ФР34	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер New Brunswick BioFlo 310, об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та лопотевою мішалкою, швидкість перемішування: 200 об/хв. Виробник: (Росія) [32].
Р38, Р42, Р46	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А,Б,В	3	Реактор об'ємом10,20,70 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв [31].
Ф11,Ф23,Ф27,Ф31,Ф33,Ф37,Ф41,Ф45,Ф47,Ф51,Ф55,Ф59,Ф61	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	13	Фільтр (Р)-ВЕ. Фільтруючий матеріал – боросилікат, Е = 99,999%. Виробник: «Donaldson» (Німеччина) [34].

Продовження таблиці 7.1

ФР48	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер New Brunswick BioFlo 310, об'ємом 70 л, оснащений сорочкою та лопотевою мішалкою, швидкість перемішування: 200 об/хв. Виробник: (Росія) [24].
Р52, Р56, Р60	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А,Б,В	1	Реактор-змішувач об'ємом 40, 200 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристоєм (100 об/хв), сталь 12Х18Н10Т [31].
ФР62	Ферментер	1	Ферментер типу-р BIORUS®, об'ємом 700 л, оснащений сорочкою та лопотевою мішалкою, швидкість перемішування: 200 об/хв. (Росія) [24].
Н63	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний фірми Aquavital серії KRONOS 65 (Італія), продуктивність 25 л/год [31].
З64	Збірник для культуральної рідини	1	Збірник Промвит Загальний об'єм 2 $м^3$ Матеріал – AISI 316 L Виробник: Промвит, м.Черкаси, Україна [32].
Н65, Н66,Н69,	Насос відцентровий	3	Відцентровий насос серії CPm 150. Напір: 29-15 м; продуктивність: 1,2-7,2 $м^3$/год, Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304 Виробник: WestHeating, Україна, Львів [25].
В68	Вакуум випарна установка	1	Вакуум випарна установка Вігант-8000 Потужність насосів, кВт - 6 Габарити, м - 10 х 6 х 6 [33].

Закінчення таблиці 7.1

С70	Розпилювальна сушарка	1	Розпилювальна сушарка Матеріал нержавіюча сталь Виробник Китай [34].
ФПМ71	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна машина для порошків Потужність (Вт) 1,5 Продуктивність (пакетів/хвилину) 10 [35].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу препарату Поліміксобактерину включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря, піногасника та поживних середовищ), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез біомаси мікроорганізмів).

Технологічну схему біосинтезу біомаси наведено у графічній частині дипломного проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийючих та дизинфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування мийного розчину «Біомой»

Для миття ємнісного обладнання застосовують розчин мийно-дезинфікувального засобу «Біомой» 0,3 % концентрації. Миття обладнання буде відбуватиметься за допомогою CIP-мийки. Для одного циклу необхідно витратити близько 775 л робочого розчину мийного засобу. У мірному циліндрі відміряємо 3 л концентрату мийно-дезинфікувального засобу переносимо його до CIP-мийки та доливаємо 772 л води (до ДР 1.2.1).

ДР 1.1.2. Приготування мийно-дезинфікуючого розчину «Ексан-про-дез»

Робочий розчин «Ексан-про-дез» коцентрацією 1 % готують в ємності об’ємом 15 л.

Приготування мийно-дезинфікуючого засобу необхідно у мірному циліндрі відміряти 15 мл концентрату та розвести у 15 л підігрітої питної води, ретельно перемішати. Таким чином, ми отримаємо робочий розчин об’ємом 15 л який використовується препарату для генерального прибирання (ДР 1.2.2.).

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання приміщень проводиться кожен день вологим способом за використанням питної води. Використовують для миття підлоги, нижніх частин дверей та протирання ручок. При щоденному прибиранні із виробничої дільниці, видаляють готову продукцію, напівпродукти, відходи виробництва та невикористані матеріали.

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять 1 раз на місяць або якщо є така потреба чи у випадку виявлення мікробної контамінації мікробіологом. Для обробки використовують 1% робочий розчин препарату «Ексан-про-дез» (від *ДР 1.2.1.*). Генеральне прибирання стіни, стелі дверей, вікон, обладнання також здійснюють вологим способом шляхом орошення. Для знезараження повітря після генерального прибирання вмикаються бактерицидні лампи.

ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання

ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання

Миття ємнісного обладнання здійснюється за допомогою 2-х контурної циркуляційної безрозбірної CIP-мийки з використанням мийно-дезинфікувального розчину «Біомой» (ДР 1.2.1.).

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Після миття обладнання проводиться візуальний технічний огляд з метою виявлення неущільнень в комунікаціях та запірній апаратурі на обладнанні. Для усунення неущільнень проводять підтягування різьбових з’єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

Перевірку на герметичність проводять за рахунок подачі аераційного повітря, закривши усю запірну апаратуру, що призводить до набору надлишкового тиску 0,3 МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв)

в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. Перед подачею аераційного повітря до набору надлишкового тиску в апарат вносять невелику кількість будь-якого галоїдного газу (наприклад тетрахлорметану). Нещільність знаходять використовуючи галоїдний течешукач БГТШ-5, що дозволяє фіксувати галогенопохідні алканів. Відпрацьоване повітря надходить *(до ЗВ11.1).*

ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання

Щоб провести стерилізацію апарата у сорочку необхідно подати глуху пару і нагрівати його до 80-90 ºС. Для цього необхідно відкрити усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подаючи насичену пару безпосередньо до апарата через нижній спуск, також відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації 125-130 ºС всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після витримування закривають запірну арматуру подачі пари в апарат, потім подають стерильне повітря, а в сорочку подається холодна вода. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30-40 ºС і надлишкового тиску Р = 0,28 МПа. Відпрацьоване повітря подається (до ЗВ 11.1).

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря збирають на висоті близько 3 м через повітрозбірник.

ДР 2.2. Очищення повітря у фільтрі грубої очистки

Повітря очищається від пилу та механічних домішок на фільтрі грубої очистки. Ступінь очищення 75 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Компресування повітря відбувається на компресорі при тиску 0,35 МПа та за температури 120-250 ^{o}С.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стисне повітря «охолоджують» в теплообміннику-охолоджувачі до температури 20 ^{0}C і подають на ресивер для зменшення пульсації руху повітря і для відділення зайвої вологи.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Нагрівають охолоджене повітря до 50 ^{o}C за допомогою повітронагрівача.

ДР 2.6. Очищення повітря на головному фільтрі

Подальше очищення повітря від мікроорганізмів відбувається в тонкому фільтрі. Ступінь очищення якого становить 95 %.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

На заключному етапі отримання аераційного повітря використовують індивідуальні фільтри, ступінь очищення становить 99,99 %, такі фільтри встановлюють безпосередньо перед інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером.

ДР 3. Приготування та стерилізація титруючих розчинів

ДР 3.1 Приготування 6% - го розчину HCl для підкислення поживних середовищ.

У колбу об'ємом 2 л під витяжною шафою вносять 1200 л води дистильованої і при постійному перемішуванні циліндром додають 263 мл 37%-го розчину HCl. Отримують 1463 л 6% розчину соляної кислоти. Закривають колбу скляною пробкою.

ДР 3.2 Приготування та стерилізація 6% - го розчину NaOH

На технічних вагах зважують 63 г NaOH і вносять у колбу об'ємом 2 л, доливають 1400 л дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при 131^{o}C упродовж 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках.

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічні ваги поміщають мірний стакан і відтаровують його. Після цього зважують 28 г меляси та 14 мл кукурудзяного екстракту. Наважки переносять у колбу об'ємом 600 мл і додають 552 мл води, і перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 112° С, тиску – 0,05 МПа, впродовж 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованих хімічних стаканчиках зважують по 0,3 г солей K_2HPO_4, KH_2PO_4. Наважки переносять в колбу на 100 мл і додають 2 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури – 131° С тиску –0,15 МПа, впродовж 40 хвилин.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованих хімічних стаканчиках зважують по 0,3 г солей NaCl, $MgSO_4$. Наважки переносять в колбу на 100 мл і додають 2 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури – 131° С тиску –0,15 МПа, впродовж 40 хвилин.

ДР 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованому стакані 7,3 г подрібненої в ступці крейди та 2,7 г подрібненого в ступці вермикуліту. Суспендують у 200 мл дистильованої води, переносять у колбу об'ємом 300 мл. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури – 131° С тиск –0,15 МПа, впродовж 40 хвилин.

ДР 4.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 20 л.

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 0,14 г кукурудзяного екстракту та 0,29 г меляси. Наважки поміщають в колбу об'ємом місткістю 6 л, додають 5,7 л води перемішують. Стерилізують при температура стерилізації – 112° С, тиск – 0,05 МПа, тривалість – 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

В окремому збірнику готують розчин солей. На технічних вагах зважують: K_2HPO_4 – 0,003 г , KH_2PO_4 – 0,003 г, NaCl - 0,003 , $MgSO_4$ – 0,003 г. Наважки солей переносять у колбу об'ємом 1 л та додають 200 мл води. Стерилізують при температурі 131 ^oC 40 хв.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

Зважують на технічних вагах у попередьо відтарованому стакані 0,08 г подрібненої крейди та 0,03 г подрібненого вермикуліту. Наважки переносять в колбу об'ємом на 1 л, доливають 1,4 л води, перемішують. Стерилізують при температурі стерилізації – 131° С, тиск 0,15 МПа, 40 хвилин.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 70 л.

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 1,3 кг кукурудзяного екстракту та 2,6 кг меляси. Наважки поміщають в збірник місткістю 60 л, додають 52 л води перемішують. Стерилізують збірник із компонентами поживного середовища гострою парою. Температура стерилізації – 112° С, тиск – 0,05 МПа, тривалість – 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

В окремому збірнику готують розчин солей. На технічних вагах зважують: K_2HPO_4 – 0,04 г , KH_2PO_4 – 0,04 г, NaCl – 0,04 г , $MgSO_4$ – 0,04 г.

Наважки солей переносять у збірник об'ємом 1 л, доводять композицію до водою 1 л вмикають мішалку переміщують. Розчин зі колб подають у інокулятор, підкислюють розчином HCl (від ДР 3.1) до pH 4 – 4,5 та стерилізують при температурі 131 ^{o}C, тиск 0,15 МПа, 40 хв.

ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 0,7 кг подрібненої крейди та 0,3 кг подрібненого вермикуліту. Наважки зливають в збірник на 20 л, доливають 12,5 л питної води, перемішують до утворення однорідної суспензії за допомогою мішалки, якою обладнаний збірник. Стерилізують гострою парою, температура стерилізації – 131° С, тиск 0,15 МПа, 40 хвилин.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в ферментері об'ємом 0,7 м^3

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 26,3 кг меляси і 13,2 кг кукурудзяного екстракту. Зважені мелясу та кукурудзяний екстракт поміщають в збірник об'ємом 500 л додають 487 л холодної води, суміш перемішують. Стерилізують збірник гострою парою. Температура стерилізації – 112° С, тиск – 0,05 МПа, тривалість – 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

В окремому збірнику готують розчин солей. Через об'ємно-ваговий дозатор зважують: K_2HPO_4 – 0,4 кг , KH_2PO_4 – 0,4 кг, NaCl -0,4 кг, $MgSO_4$ – 0,4 кг. Наважки солей переносять у збірник об'ємом 100 л і додають 50 л води, вмикають мішалку і перемішують. Потім розчин зі збірника подають у ферментер, підкислюють розчином HCl (від ДР 3.1) до pH 4 – 4,5. Стерилізацію проводять подачею гострої пари в нижній спуск апарата при температурі 131 ℃ впродовж 40 хвилин. Після стерилізації і охолодження розчин солей нейтралізують розчином NaOH (відДР 3.2.) до pH 7,2.

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

Через об’ємно-ваговий дозатор зважують 7 кг подрібненої крейди та 3 кг подрібненого вермикуліту. Наважки зливають у збірник на 200 л доливають 136 л води, перемішують до утворення однорідної суспензії за допомогою мішалки, якою обладнаний збірник. Стерилізують збірник, із суспензіями крейди та вермикуліту, гострою парою, температура стерилізації – 131° С, тиск 0,15 МПа, 40 хвилин.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП.5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *P. polymyxa* КВ зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять суворо в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках на скошеним м'ясо-пептонним агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 30 ºС упродовж 36 год.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії (від *ТП 5.2*) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). Вирощують вирощують при температурі 30 ºС упродовж 36 год.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об’ємом 1 л із 552 мл розчину композиції А (від *ДР 4.1.1*) в асептичних умовах додають 1,4 мл композиції Б (від *ДР 4.1.2*), 1,4 мл композиції В (від ДР 4.1.3) та додають 145 мл суспензії композиці Г (від *ДР 4.1.4*). Перемішують і розливають по 100 мл у п'ять качалочних колб об’ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *P. polymyxa КВ*, вирощеною на м'ясо-пептонному агарі, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини і піпеткою вносять одержану суспензію у колби з розлитим поживним

середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування *P. polymyxa КВ* у колбах на качалках (200-220 об/хв) впродовж 36 год, при температурі 30 ºС культуральну рідину з колб переносять у стерильну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляту об'ємом 10 л

У попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 10 л з 5,78 л композиції Б (від ДР 4.2.2) через стерильну засівну колбу вносять 0,188 л композиції А (від ДР 4.2.1), 1,4 л композиції В (ДР 4.2.3.), і вносять посівний матеріал (від ТП 5.4.). На початку культивування вмикають мішалку, барботер та доводять pH доводять до 7,2-8,4 за допомогою розчину NaOH (від ДР 3.2).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляту об'ємом 70 л.

У попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 70 л з 1,6 л композиції Б (від *ДР 4.3.2*) через стерильну засівну колбу вносять 52 л композиції А (від *ДР 4.3.1*), 12,5 л композиції В (ДР 4.3.3.), і вносять посівний матеріал (від ТП 5.5.). На початку культивування вмикають мішалку, барботер, pH доводять до 7,2 за допомогою розчину натрій гідроксид (від *ДР 3.2*).

Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (200-220 об/хв), температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі –

30 ºС. Подається стерильне аераційне повітря. Тривалість процесу – 36 год, температура 30 ºС. Кожні 4 години здійснюємо мікробіологічний контроль

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 0,7 м^3

У ферментер, де знаходиться стерильна композиція Б (від ДР 4.4.2)

через об'ємно-ваговий дозатор подаємо композицію А (від ДР 4.4.1.) та композицію В (від ДР 4.4.3). Оскільки біосинтез відбувається при pH 7,2 реакцію поживного середовища доводять до нейтральної за допомогою 6 %

розчину натрій гідроксид (від *ДР 3.2*). Рівень pH контролюється на pH-метрі. Через трубу перетискування вносять посівний матеріал (від *ТП 5.6).* Вмикають мішалку та аерацію, у кожух ферментера подають пару.

Культивування здійснюється впродовж 36 год за температури 30 º С. Під час проведення біосинтезу кожні 4-6 годин відбирають проби культуральної рідини для контролю показників росту та синтезу, а також для мікробіологічного контролю.

ТП 7. Зберігання культуральної рідини

Піся культивування одержана культуральна рідина направляється у збірник (З-65) за допомогою відцентрового насоса, де вона тимчасово зберігається та періодично перемішується мішалкою (1 об/хв) для того щоб уникнути осадження біомаси в культуральній рідині на дно.

ТП 8. Коцентрування

ТП 8.1. Упарювання поліміксобактерину

Від стадії ТП 7 від збірника (З-68) надходить культуральна рідина у вакуум випарну установку для концентрування поліміксобактерину за допомогою упарювання. Після упарювання рідина через відцентровий насос (Н-69) по трубопроводі прямує на сушіння (С-70).

ТП 9. Сушіння

ТП 9.1 Сушіння поліміксобактерину

Сушіння поліміксобактерину здійснюють у розпилювальній сушарці (С- 70). Сушіння здійснюють при 50 °С протягом 16 годин.

ПМВ 10. ***Фасування та пакування поліміксобактерину***

ПМВ10.1 Фасування готового поліміксобактерину

Фасування порошку поліміксобактерину здійснюють на фасувальному автоматі (ФМ-71) у поліетиленові пакети по 1 кг.

ПМВ 10.2. Пакування у коробки

Пакування поліетиленових пакетів з порошком поліміксобактерин (*від ПМВ 10.1*) у картонні коробки здійснюється вручну. Коробки відвантажуються на склад.

ЗВ 11. Знешкодження відходів

ЗВ 11.1 Знешкодження газаподібних відходів

ЗВ 11.2 Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи від ДР 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3 на даному етапі виробництва міститимуть мийно-дезінфікуючий засоби «Біомой», «Ексан-про-дез»»

Щоб попередити корозію матеріалів каналізаційних споруд проводять взаємну нейтралізаціюя кислих і лужних стічних вод.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Впродовж культивування періодично (кожні 6 год) відбирають проби культуральної рідини для визначення показників росту, синтезу, та мікробіологічного контролю.

Мікробіологічний контроль.

Культуральну рідину визначають на мікробіологічну чистоту висівом на поживні середовища та мікроскопіюванням.

Через довготривале отримання результатів методом висіву на щільні поживні середовища чистоту культури здебільшого контролюють мікроскопіюванням. Для цього готують препарат фіксованих забарвлених клітин і переглянути його з імерсійною системою. З пробовідбірника апарату відбирають необхідну кількість культуральної рідини. За допомогою стерильної бактеріологічної петлі чи піпетки наносять на знежирене предметне скло краплю суспензії мікроорганізму. Матеріал рівномірно тонким шаром розподіляють на площі 1-2 $см^2$.

Мазок висушують за кімнатної температури на повітрі. Якщо він дуже повільно висихає, препарат можна злегка нагріти в струмені теплого повітря, тримаючи предметне скло високо над полум'ям пальника мазком догори. Після чого його необхідно зафіксувати в полум'ї пальника. Тримаючи скло мазком догори, тричі проводять його через гарячу частину полум'я.

Після фіксації на мазок наносять 2-3 краплі метиленового синього на 2-3 хв. Під час забарвлення розчин барвника на мазку не повинен підсихати, при необхідності доливають нові порції. Потім препарат висушують на повітрі і промокають фільтрувальним папером та мікроскопіюють з імерсією.

Клітини бактерії штаму *P. polymyxa* КВ (*рис. 9.1*). великі грампозитивні палички розміром 1,1-1,3 х 3,0-5,0 мкм, поодинокі, розташовуються в парах і коротких ланцюжках.

При спороутворенні клітина роздувається веретеноподібно, за формою нагадує лимон. Спори великі, овальні (еліптичні). Фарбуються за грамом позитивно, мають продовгувасту форму, нерухливі.

Під мікроскопом не повинна спостерігатися (бути) наявність стороньої мікрофлори грибів або бактерій.

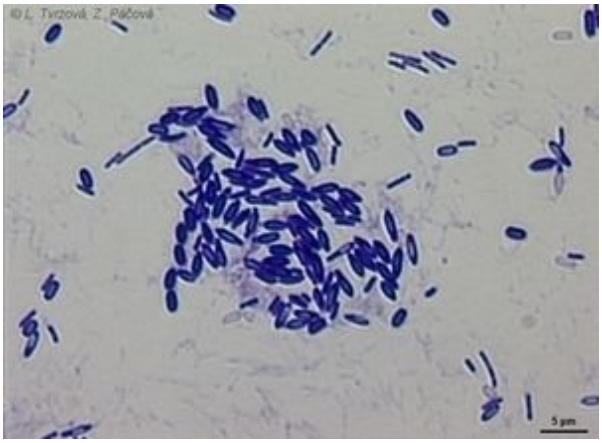

Рис 9.1 Фотографія *P.polymyxa* ***через світловий мікроскоп (збільшення ×90)***

Для визначення наявності сторонніх дріжджів та грибів культуральну рідину висівають у чашки Петрі на сусло-агар, культивують при температурі 30^{o} С,36 год.

Критерієм чистоти культуральної рідини є відсутність колоній інших мікроорганізмів, та однорідність вирослих колоній штаму *P. Polymyxa.* Колонії безбарвні, плоскі, гладкі, в'язкі, іноді мають вирости що за формою нагадують пальці.(*рис.9.2)*.

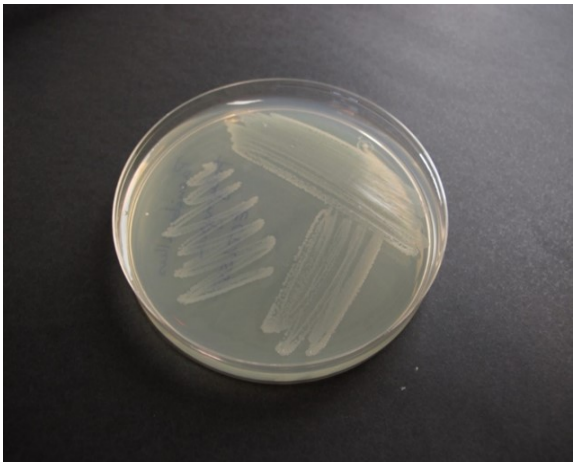

Рис 9.2. Фотографія колонії *Paenibacillus polymyxa*.

Визначення показників росту та синтезу

Концентрація амінного азоту. Джерелом азоту в середовищі для культивуванн**я** штаму бактерії *Paenibacillus polymyxa* КВ є кукурудзяний екстракт, що містить у своєму складі амінний азот.

Визначення амінного азоту проводять йодометричним методом по Попу і Стівенсу (мідним способом). В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні сполуки з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням.

Метод визначення:

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

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 мл 80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із бюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію. Вміст амінного азоту $C_{ам.а}$ (у мг на 100 мл) розраховують за рівнянням:

$C_{ам.а}= (0,28b*100)/a = 28b/a$,

де а – об’єм дослідної рідини, взятий на аналіз, мл;

b – розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л^3, який пішов на титрування, мл;

0,28- коефіцієнт, який враховує, що 1 мл тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $Cu_3(PO_4)_2$. При цьому утворюються розчинні мідні сполуки. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексної сполуки і перетворюється в ацетат міді.

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

$2Cu(CH_3COO)_2 + 4KI = I_2 + 2CuI + 4CH_3COOK$

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

$I_2 + 2Na_2S_2O_3 = 2NaI + N_2S_4O_6$

Визначення кількості живих клітин

Визначається за методом Коха – посівом послідовних десятикратних розведень клітинної суспензії у чашках Петрі на агаризованих середовищах МПА. Кількість життєздатних клітин визначають за кількістю колоній, що утворилися на чашках. На останніх годинах культивування кількість клітин бактерій повинна бути не менше 5×10^9 КУО/мл [36].

Кількість мікроорганізмів в 1 г чи 1 мл визначають за формулою:

$$N = \frac{X\,V}{R}$$

де: N – кількість мікроорганізмів в 1 г чи 1 мл;

X – кількість колоній; V – об`єм проби; R – розведення

Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають непрямим методом за оптичною густиною клітинної суспензії. Для визначення концентрації цим методом у пробірку наливають 9 мл стерильної води та вносять 1 мл культуральної рідини. Суспензію перемішують і вимірюють його оптичну густину на ФЕК (при 700 нм). Як контроль використовують кювету зі стерильною водою. Отримане значення оптичної густини перераховують на суху масу клітин за калібрувальним графіком

Таблиця 9.1

Карта постадійного контролю біосинтезу біомаси бактерій *Paenibacillus polymyxa* КВ

Номер контрольної точки та назва стадії	**Об'єкт контролю і показник, що визначається**	**Засоби та методи контролю**	**Періодичність перевірки та порядок відбору проб**	**Нормативна характеристика показника, що визначається**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
ДР 1. Санітарна підготовка виробництва				
ДР 1.2. Приготування мийно-дезинфікувальних засобів				
Кх, Кт 1.2.1. Приготування мийного розчину «Біомой»	Концентрація розчину «Біомой»	Хімічний метод, термометр технічний, годинник		С =0,3 %, τ = 10 хв, t = 40°С
Кх, Кт 1.2.2. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину «Ексан-про-дез»	Концентрація розчину «Ексан-про-дез»	Хімічний метод, годинник		С = 1 %, τ = 10 хв
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень				
Кх, 1.3.1. Щоденне прибирання	Підлога, ручки, нижні частини дверей, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Відсутність бруду та пилу

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кх, 1.3.2. Геренальне прибирання	Підлога, вікна, двері стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Після прибирання
ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання				
Кх, Кт 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання	Концентрація мийного розчину «Каустичної соди», обладнання, температура мийного розчину, чистота	Хімічний метод, термометр технічний, годинник, візуальний огляд	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	С = 2%, t = 70 °С, τ = 1 год, чисте обладнання
Кт 1.4.2. Технічний огляд	Обладнання	Візуальний огляд	Під час операції	Відсутність несправностей
Кт 1.4.3. Перевірка на герметичність	Обладнання, температура, тиск, перепад тиску, час	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	Р = 0,3 МПа, ΔР < 0,01МПа τ = 30 хв,
Кт, Км 1.4.4. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізація, тиск, час стерилізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації	t = 130 °С, Р = 0,15 МПа, τ = 1 год
ДР 2. Підготовка аераційного повітря				

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт 2.2. Очищення повітря у фільтрі грубої очистки	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	Е = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	Р = 0,35 МПа, t = 150-250 °С
Кт 2.4. Кондиціонування повітря	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 20 °С, W = 60 %
Кт 2.5. Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 39 °С W = 50 %
Кт 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	Е = 95 %, тиск згідно паспорту
Кт 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	Е = 99,99 %, тиск згідно паспорту
ДР 3. Приготування та стерилізація титруючих розчині				
Кх 3.1. Приготування 6% - го розчину HCI	Концентрація	-	-	С = 6%

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.2 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	Температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 ºС, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа, С = 6%, відсутність мікробіоти
ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища				
ДР 4.1. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці				
Кт, Км 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 ºС, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти Р = 0,05 МПа
Кт, Км 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 ºС, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 ºС, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 ºС, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
ДР 4.2. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л				
Кт, Км 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стирилізації	t = 112 ºС, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти Р = 0,05 МПа

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
ДР 4.3. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 70 л				
Кт, Км 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, Р = 0,05 МПа відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
ДР 4.4. Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування у ферментері об'ємом 700 л				
Кт, Км 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний Контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, Р = 0,05 МПа відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
ТП 5. Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 5.1. Підтримка колекційної культури культура *Paenibacillus polymyxa* КВ	Колекційна культура *Paenibacillus polymyxa* КВ, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 3-4 °С, τ = 3-4міс, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.2. Одержання робочої культури *Paenibacillus polymyxa* КВ на агаризованих середовищах	Робоча культура *Paenibacillus polymyxa* КВ, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 30 °С, τ = 36 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3. Вирощування культури *Paenibacillus polymyxa* КВ на агаризованих середовищах	Робоча культура культура *Paenibacillus polymyxa* КВ, тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4. Вирощування культури *Paenibacillus polymyxa* КВ в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота	Годинник, термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура контролюється перед культивуванням, мікробіологічний контроль після культивування	t = 30 °С, τ = 24 год, n = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км, Кх 5.5. Вирощування посівного матеріалу *Paenibacillus polymyxa* КВ в інокуляторі (10л)	Посівний матеріал, тривалість культивування, pH, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація *Paenibacillus polymyxa* КВ	Годинник, pH-метр термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням та під час культивування, температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль та концентрація бактерій здійснюється після культивування через кожні 6 годин	τ = 24 год, pH = 7,0, t = 30 °C, n = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.6. Вирощування посівного матеріалу *Paenibacillus polymyxa* КВ в посівному апараті (70 л)	Посівний матеріал, тривалість культивування, pH, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація бактерій	Годинник, pH-метр термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням та під час культивування, температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль та концентрація бактерій здійснюється після культивування через кожні 6 годин	τ = 36 год, pH = 7,2, t = 30 °C, n = 220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти,

Продовження таблиці 9.1

1	2	3	4	5
ТП 6. Виробничий біосинтез				
Кт, Км, Кх 6.1. Виробниче культивування *Paenibacillus polymyxa* КВ у ферментері об'ємом 700 л	Культуральна рідина, тривалість культивування, pH, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, концентрація бактерій	Годинник, pH-метр термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль	pH визначається перед культивуванням та під час культивування, температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль та концентрація біомаси здійснюється під час культивування через кожні 6 годин, а також після культивування визначається концентрація бактерій (КУО)	τ = 36 год, pH = 7,2, t = 30 °C, n = 220 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення таблиці. 9.1

1	2	3	4	5
	ТП 8. Коцентрування			
Кт 8.1 Концентрування	Концентрат поліміксобактерин, час	Годинник, термометр технічний	Під час процесу концентрування	τ = 1 год t = 70°C
	ТП 9. Сушіння			
Кт 9.1 Сушіння поліміксобактерину	температура, час	Годинник, датчик температури, манометр, датчик вологості	Під час процесу сушіння	t=50°C, τ=16 год, n=5 об/хв, P=6,6 мбар, W=5%
ПМВ 10. Фасування та пакування поліміксобактерину				
Кт 10.1 Фасування готової продукції	Порошок поліміксобактерину, маса для фасування, мікробіологічна чистота	Дозатор, мікробіологічний метод	Маса встановлюється перед процесом фасування, мікробіологічна чистота продукту перевіряється перед фасуванням	m = 1 кг Мікробіологічна чистота

РОЗДІЛ 10 АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

10.1 Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої дільниці.

У роботі розроблюється система автоматизації для технологічної ділянки автоматизація ферментера.

Ферментери бувають різних видів та форм які призначенні для синтезу цільового продукту. Ферментери виготовляють з високоякісної нержавіючої сталі, так що він був не схильний до корозії і не виділяв у середовище токсичні солі металів.

Ферментери повинні відповідати певним вимогам:

- процес проводиться в асептичних умовах, то ферментер повинен бути сконструйований так, щоб виключити можливість попадання сторонніх мікроорганізмів;
- параметри зовнішнього середовища, такі як pH, температура та інші повинні постійно контролюватися, з цією метою ферментери обладнуються відповідними датчиками (датчиком для контролю температури та датчиком контролю pH);
- якщо культура є аеробною, то ферментери повинні бути обладнанні барботером та датчиком рівня розчинного кисню в середовищі;
- для інтенсифікації масообмінних процесів в ферментері, повинен бути встановлений перемішуючий пристрій.

Для забезпечення достатніх параметрів масообміну та гомогенізації культуральної рідини необхідним є оснащення ферментера перемішуючим пристроєм.

Через барботер подається аераційне стерильне повітря, швидкість подачі якого 0,7 $м^3/м^3$ за 1 хв.

Культивування бактерії штаму *Bacillus polymyxa* КВ відбувається за температури 30^{o} С, і значення pH 7,2. Це може зумовлювати ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Тому є необхідність забезпечення асептичних умов під час засіву поживного середовища посівним матеріалом.

Під час ферментації у ферментері контролюємо верхній та нижній рівень поживного середовища.

Таблиця 10.1

Технологічні умови до системи автомватизації

Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управляючої дії
Ферментер	Частота обертів	200 об/хв	Регулювання	Підтримання на заданому значенні	АРМ оператора
	Температура	30 ± 1 ºС	Регулювання	Підтримання на заданому значенні	
	pH в агрегаті	7,2-7,4	Контроль	Відображення, сигналізація (світлова)	
			Регулювання	Підтримання на заданому значенні	
	Рівень	0,9 ±0,01 м	Управління	Підтримання на заданому значенні	

Закынчення таблиці 10.1

Ферментер	Піноутворення	0,93 ±0,001 м	Контроль	Відображення, сигналізація (світлова)	Керування аналоговим пневматичним клапаном (подача стисненого очищеного повітря) Керування двигуном піногасника (дискретне)
	Концентрація кисню	концентрація розчиненого кисню на рівні вище 50%	Контроль, Регулювання	Моніторинг	
	Рівень піни	Заданий рівень	Контроль, Регулювання	Підтримання на заданому значенні	
			Реєстрація	Сигналізація при значному відхиленні (світлова)	
			Регулювання	Сигналізація	

10.2 Опис схеми автоматизації об’єкта

Температура у ферментері вимірюється за допомогою датчика температури (поз. 1а). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від температури іде управління подачею пари регулюючим органом (поз. 1в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 1б.

Верхній рівень у ферментері контролюється за допомогою датчика рівня (поз. 2а). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від значення рівня регулюється за допомогою регулюючих органів (поз. 2в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 2б.

Нижній рівень у ферментері контролюється датчиком рівня (поз. 3а). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від значення рівня регулюється за допомогою виконавчих органів (поз. 3в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача (3б).

У ферментері pH вимірюється задопомогою датчика pH (поз. 4а). Сигнал від датчика подається на контролер і в залежності від значення pH іде управління подачею натрій гідроксид виконавчими органами (поз. 4в), що приводиться в дію за допомогою електропневмоперетворювача 4 б.

У ферментері рівень піни (поз. 5а) сигнал від датчика подається на регулюючий орган 5б, що приводить в дію виконавчий механізм 5в, який подає силіконовий піногасник.

Частота обертів у ферментері (поз. 7а). Контролюється на заданому значенні, мотором М1.

Таблиця 10.2

Специфікація засобів та приладів автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1а	Темпе-ратура	В агрегатах	Датчик термоперетворювач опору ТСП, НСХ-Pt100, діапозон (0 – 100)ºС, з уніф. вих. сигнал 4…20 мА	ТСМ-0193-01	ЧТП «Теплоприбор» м. Челябинск
1б	Темпе-ратура	На щиті	Електропневмоперетвюрювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
1в	Темпе-ратура	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA32-230-L0	СВ Альтера м. Київ
2а	Верхній рівень	В агрегаті	Контактний датчик рівня, з вихідним сигнал по напрузі	SITRNSL Pointek CLS 200	ДП «Сименс Україна» м.Київ
2в	Верхній рівень	По місцю	Електромагнітний регулюючий клапан	JASKA D201	СВ Альтера м. Київ

Продовження таблиці 10.2

2б	Верхній рівень	На щиті	Електропневмоперетвюрювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
3а	Нижній рівень	В агрегаті	Контактний датчик рівня, з вихідним сигнал по напрузі	SITRNSL Pointek CLS 200	ДП «Сименс Україна» М.Київ
3в	Нижній рівень	По місцю	Електромагнітний регулюючий клапан	JASKA D201	СВ Альтера м. Київ
3б	Нижній рівень	На щиті	Електропневмоперетвюрювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
4а	pH	В агрегатах	Для вимірювання pH водних розчинів у стаціонарних умовах промислового підприємства	pH-101П	ООО Компания «Химснаб-жение» м. Харків
4в	pH	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA3 2-230-L0	СВ Альтера м. Київ

Закінчення таблиці 10.2

4б	pH	На щиті	Електропневмоперетвюрювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
5а	Рівень піни	В агрегатах	Датчик контролю рівня піни водних розчинів	Flow 2001 101П	ООО Компания «Химснаб-жение» м. Харків
5в	Рівень піни	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA3 2-230-L0	СВ Альтера м. Київ
5б	Рівень піни	На щиті	Електропневмоперетвюрювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
7а	Частота	На щиті	Частотний перетворювач	Altivar 71	СВ Альтера м. Київ

Автоматизація технологічного процесу у ферментері повинна забезпечувати:

- Контроль та регулювання температури культуральної рідини у ферментері здійснюється по місцю.
- Контроль швидкості обертів мішалки у ферментері по місцю.
- Контроль та регулювання рівню піни у апараті.
- Контроль та регулювання рівня pH у ферментері.

- Контроль та регулювання кількості кисню шляхом подачі стерильного повітря до апарату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.Високі урожаї з року в рік – реалії сьогодення та потреба часу. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://agrotimes.ua/article/nerozkritij-potencial/

2.Біопрепарат, протруйник Поліміксобактерин (Інститут мікробіології УААН). [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://superagronom.com/pesticidy-protruyniki/polimiksobakterin-institut-mikrobiologiyi-uaan-id1072

3.Поліміксобактерин. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://catu.com.ua/polimicksobacterin/

4. Шевченко Л. А. Розвиток кореневої системи рослин кукурудзи за впливу Поліміксобактерину – стимулятора росту рослин. Сільськогосподарська мікробіологія: міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2017. Вип. 26. С. 42–48.

5.Застосування азотфіксуючих та фосформобілізуючих бактерій – [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://pidruchniki.com/78615/agropromislovist/zastosuvannya_azotfiksuyuchih_fosformobilizuyuchih_bakteriy

6. Бактеріальні добрива – [Електронний ресурс] // Режим доступу: http://gidroponist.ru

7. Спосіб виготовлення мікробного препарату Поліміксобактерину – стимулятора росту рослин: пат. 99009 Україна. МПК C12N 1/20 (2006.01), C05F 11/08 (2006.01), Токмакова Л. М.; заявник і власник патенту: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України. № u 2014 13665; заявл. 19.02.2014; опубл. 12.05.2015, Бюл. № 9. 7 с.

8. Патент 54923 UA, МПК C05F11/08 C12N1/20 Штам бактерій Bacillus Subtilis для одержання бактеріального добрива для рослинництва/ *Курдиш.І.К.,Рой.А.О.;* заявник Інститут Мікробіології і Вірусології ІМ Д.К.

Заболотного Національної Академії Наук України. – № 2002054179; опубл.17.03.2003, Блю №3,2003 р.

9. Патент 101388 UA, МПК C05F 11/00 C12P 39/00 Комплексний мікробний препарат Ековітао для інокуляції насіння бобових культур/ *Титова.Л.В., Леонова.Н.О., Бровко.І.С., Іутинська.Г.Л. .;* заявник Інститут Мікробіології і Вірусології ІМ Д.К. Заболотного Національної Академії Наук України – № a201102210 ; заявл. 25.02.2011 ; опубл. 25.03.2013, Бюл. № 6.

10. Xie, J. *et al*. Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Sci. Rep.* 6, 21329; doi: 10.1038/srep21329 (2016).

11. Elliot Nicholas Grady,Jacqueline MacDonald,Linda Liu,Alex. Richman Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review// Microb Cell Fact.- doi: 10.1186/s12934-016-0603-7.2016

12. *Paenibacillus polymyxa* [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://alchetron.com/Paenibacillus-polymyxa#-

13. Медведєв В.В. Взаємозв'язок між антропогенним навантаженням, деградацією і сталістю грунтів / В.В.Медведєв // Вісник аграрної науки.- 2007.- № 8.- С.49-55.

14. Дегодюк Е.Г. Сучасний стан земельних ресурсів України і шляхи відновлення земель – і природокористування //Зб. доп. Всеукраїнської наук.-практ. Конференції «Стан земельних ресурсів в Україні : проблеми, шляхи вирішення». – К.: Центр екологічної освіти та інформації, 2001. – с.32-37.

15. Карта урожайності [Електронний ресурс] – *Режим доступу до ресурсу:* https://latifundist.com/urozhaj-online-2017

16.KEGG Glycolysis / Gluconeogenesis - Paenibacillus polymyxa [Електронний ресурс] – *Режим доступу до ресурсу:*https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathwayppy00010

17.BIORUS – Все для масштабируемой биотехнологии. [Електронний ресурс]. Режим доступу : http://bio-rus.ru .

18. Державні санітарні правила проектування, упорядкування та експлуатації виробництва біологічних засобів захисту рослин та стимуляторів росту рослин у виробничих біолабораторіях та біофабриках, затверджені наказом МОЗ 20.08.1997 р. №254а

19.Timmusk, S., N. Grantcharova, E. Gerhart, and H. Wagner. 2005. *Paenibacillus polymyxa* Invades Plant Roots and Forms Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 7292-7300. P. stellifer. Microbiology 80, 117–124. 2011.

20. Біопрепарати для технічних культур [Електронний ресурс] – *Режим доступу до ресурсу:* https://superagronom.com/pesticidy-protruyniki/polimiksobakterin-institut-mikrobiologiyi-uaan-id1072

21. Процеси та апарати хімічних виробництв – [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://dl.sumdu.edu.ua/textbooks/22852/266104/index.html

22. Сушильні процеси та установки. Навчальний посібник. - Вінниця: ВНТУ, 2007. - 76 с.

23. Пакувальні машини – [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://ua.multivac.com/uk/

24. [Електронний ресурс] // https://prom.ua/p1101304432-reaktor-dlya-proizvodstva.html

25. [Електронний ресурс] // [http://westheating.com.ua/produkcia/nasosy-pedrollo]

26. [Електронний ресурс] // https://prom.ua/p1101304432-reaktor-dlya-proizvodstva.html

27. Електронний ресурс] // https://epicentrk.ua/ua/shop/predvaritelnyy-filtr-al-ko-110157.html

28. [Електронний ресурс] // https://kms-market.com.ua/p65367829-vozduhosbornik-resiver.html?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_campaign=osushiteli-mc&google_ad=436321422905&gclid=Cj0KCQjwzZj2BRDVARIsABs3l9JmeEx

Rz4IDHVTE5LXEuCAJkWqfWgFaQSXFKDrvLLaNo4n8PAHp0WsaAm8_EALw_wcB

29.[Електронний ресурс] // https://www.agrcomp.ru/item/ohladitely_vozduha_friulair

30. [Електронний ресурс] // https://newfilter.com.ua/ua/promislovi-filtri-new-filter.html

31. [Електронний ресурс] // https://prom.ua/p827472445-peristalticheskij-doziruyuschij-nasos.html?prosale=&utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=pla_stroitelstvo&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=Cj0KCQjwzZj2BRDVARIsABs3l9JRKz0CQzX2dSGne4p8QQZI_JNZNNpPBgtE84Xd3nuZf-0csknD2W4aAmtYEALw_wcB

32. [Електронний ресурс] // https://promvit.com.ua/sbornik-obemom-2000-l/

33. [Електронний ресурс] // https://prom.ua/p1098445381-vakuum-vyparnaya-ustanovka.html

34 [Електронний ресурс] // https://dlu.com.ua/%D0%A0%D0%BE%D0%B7%D0%BF%D0%B8%D0%BB%D1%8E%D0%B2%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0-%D1%81%D1%83%D1%88%D0%B0%D1%80%D0%BA%D0%B0-Nano-Spray-Dryer-B-90-HP

35. [Електронний ресурс] // https://prom.ua/p691704749-fasuvalno-pakuvalna-mashina.html

36. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. І перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.

37. Визначення концентрації амінного азоту [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурс: http://med.bobrodobro.ru/1160.