

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СЛІПЧУК Тетяни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання амілосубтіліну культивуванням *Bacillus subtilis*
Керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus subtilis*, цільовий продукт: амілосубтілін, об'єм ферментера: 32 м³, коефіцієнт заповнення: 0,6.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Характеристика цільового продукту, Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування, Розділ 4. Біосинтез цільового продукту, Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми, Розділ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу, Розділ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу, Розділ 8. Контроль виробництва, Розділ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

Розділ 1. Характеристика цільового продукту, Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування, Розділ 4. Біосинтез цільового продукту, Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної

схеми, Розділ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та

виробничого біосинтезу, Розділ 7. Опис технологічної схеми

доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу, Розділ 8. Контроль

виробництва, Розділ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

виробництва, Розділ 10. Нормативно - технічна документація виробництва

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Опис цільового продукту	01.03.2023 – 11.03.2023	
2	Обґрунтування вибору біологічного агента	12.03.2023- 24.03.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування	25.03.2023- 03.04.2023	
4	Біосинтез цільового продукту	05.04.2023- 18.04.2023	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	19.04.2023- 02.05.2023	
6	Специфікація обладнання доферментаційних процесів	03.05.2023- 12.05.2023	
7	Опис технологічної схеми доферментаційних процесів	13.05.2023- 19.05.2023	
8	Контроль виробництва	20.05.2023- 21.05.2023	
9	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	22.05.2023- 25.05.2023	
10	Оформлення пояснювальної записки	26.05.2023- 29.05.2023	
11	Виконання графічної частини проекту	29.05.2023- 31.05.2023	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Тетяна СЛІПЧУК

_____ (ім'я та прізвище)

Юрій КАРЛАШ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці біотехнології отримання ферментного препарату амілосубтиліну, що синтезує штам *Bacillus subtilis*, що є найкращим продуцентом в порівнянні з іншими мікроорганізмами, оскільки даний штам продукує найвищу концентрацію ферменту амілази з активністю 145,4 Од/мл за час культивування у 72 години.

Розраховано технологічне обладнання та кількість стадій вирощування посівного матеріалу для забезпечення даної кількості ферменту в рік. Згідно розрахунків для виробничого біосинтезу 19,6 т альфа-амілази культивуванням *Bacillus subtilis* МК1 в рік, необхідно проводити виробничий синтез в ферментері об'ємом 32 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Технологія біосинтезу амілосубтиліну передбачає проведення допоміжних робіт (приготування 6%-го розчинів HCl та NaOH для підкислення та підлужнення середовища відповідно при вирощуванні культури в інокуляторах та виробничому ферментері, підготовка та стерилізація композицій поживного середовища), а також технологічний процес, що включає чотири етапи вирощування посівного матеріалу та виробничий біосинтез у ферментері 32 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Складено карту контролю доферментаційних стадій і виробничого біосинтезу, впроваджено методи моніторингу концентрації та активності амілази, а також концентрації крохмалю. Досліджено процес виділення α -амілази з культурального середовища, що передбачає відділення клітинної біомаси, концентрування фільтрату та висушування продукту.

Кваліфікаційна робота викладена на 94 сторінках, містить 24 таблиці, 14 рисунків, складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (65 найменувань), технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, ферментний препарат, амілосубтилін, α -амілаза, активність ферменту, спиртова промисловість, виділення ферменту.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ	12
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	19
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	19
3.2. Розрахунок потужності виробництва	20
3.3. Розрахунок об'єму ферментера і кількості виробничих циклів.....	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	23
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	27
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	27
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	29
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	33
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	33
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	33
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	37
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	39
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	46
5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту	52
5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів	53
5.3.1. Видалення біомаси	53
5.3.2. Концентрування	54
5.3.3. Сушіння.....	54
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	55
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	58

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	65
8.1. Мікробіологічний контроль	70
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	73
8.2.1. Концентрація біомаси	73
8.2.2. Концентрація та активність амілази.....	75
8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену	76
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	79
9.1. Системи знешкодження рідких відходів	80
9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів.....	83
9.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	84
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА	85
ЛІТЕРАТУРА	87

ВСТУП

Сучасні розробки в багатьох галузях промисловості та сільського господарства були б неможливі без використання ферментних препаратів. Виробництво ферментних препаратів – один з провідних напрямків сучасної біотехнології, одна з галузей, обсяги виробництва якої постійно зростають, а сфера застосування розширюється. [1].

Термін "ферментний продукт" наразі використовується для опису як промислових ферментів, так і фармацевтичних препаратів. Він вказує на основний активний фермент у продукті з одночасним підтвердженням його комплексності, іншими словами наявності побічних ензимів. [1].

Обсяг міжнародного ринку технологічних ферментів без врахування обсягів виробництва ферментів для біопалива у 2010 р. складав 2,8 млрд дол. США. Згідно розрахунків аналітиків маркетингового агентства DISCOVERY Research Group, об'єм ринку ферментів і ферментних препаратів в країнах СНГ в 2014 -2016 роках склав, в середньому, 67400 тонн за рік. Загальний розподіл використання ферментів в різних галузях представлено значеннями (%): 26 - в харчовій промисловості, 23 - в текстильній промисловості, 37 - в виробництві кормів та комбікормів для сільського господарства, 4 - в шкіряному виробництві, 9 - в медицині, 3 - в інших сферах [2,3].

Так, групу амілолітичних ферментів (α -амілаза, β -амілаза, глюкоамілаза), які в своєму складі має амілосубтилін, використовують в великих об'ємах в виробництві хлібобулочних, круп'яних виробів, в кондитерській, крохмале-патоковій, спиртовій промисловості, пивоварінні, виробництві сучасних миючих засобів, текстильній, паперовій, парфумерній

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ		
					Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Сліпчук Т.О.				7	2
Перевір.		Карлаш Ю.В.			Кафедра БТМ		
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

галузях, в сільському господарстві, для чистки водопровідних систем та інше [3].

Таким чином, виробництво ферментних препаратів залишається актуальною задачею сучасної промислової сфери. Для промислового отримання ферментів можливе використання сировини різного походження - тваринної, рослинної, мікробної. Найбільші перспективи має виробництво ферментних препаратів біотехнологічного походження за участю певних мікроорганізмів-продуцентів ферментів. Переваги мікробного синтезу ферментів підтверджені експериментально: висока швидкість накопичення біомас, прискорений метаболізм та функціонування клітинних ферментних систем, здатність мікробів культивуватись на дешевих поживних середовищах, високий вміст окремих ферментів (40-60 % від загальної кількості білкових речовин клітини), ряд ферментів мікроорганізми виділяють назовні (в культуральну рідину), що спрощує їх подальше виділення та очистку; деякі ферменти синтезуються тільки певними мікроорганізмами, (рацемази амінокислот, кератинази та ін.); синтез мікробами ферментів з особливими властивостями (термостабільні, кислотостійкі і т.п.); індукцйбельність ферментів мікробного походження; можливість регулювати та масштабувати біотехнологічне виробництво [3].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Амілосубтилін - комплексний ферментний препарат, природно-збалансований за амілолітичним та целюлозолітичним активностями [4].



Рис. 1.1. Препарат Амілосубтилін

Основний фермент Амілосубтиліну - α -амілаза з ендогенним механізмом дії, що каталізує гідроліз α -1,4-глікозидних зв'язків крохмалю, що призводить до швидкого зниження в'язкості клейстеризованих розчинів крохмалю. Кінцевим продуктом бактеріальної дії α -амілази на крохмаль є низькомолекулярний розчинний декстрин, що містить декілька моносахаридів і дисахаридів (глюкозу і мальтозу) [4].

Завдяки комплексному впливу ферментів Амілосубтиліну відбувається ступінчасте розщеплення нативних форм рослинних кормів [4].

Ферментний препарат фасується у пакети/мішки номіналом 5 кг за допомогою автоматичної машини для фасування. На цій же автоматичній машині на пакет наноситься наліпка із назвою і всією необхідною інформацією. Далі пакети запаковують у групові картонні коробки.

					НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Сліпчук Т.О.					9	3
Перевір.		Карлаш Ю.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Фізико-хімічні властивості

Альфа-амілаза (α -амілаза, 1,4- α -D-глюкан-глюканогідролаза, глікогеназа) є кальцій-залежним ензимом. До цього типу належать амілаза слинних залоз та амілаза підшлункової залози. Цей ензим може гідролізувати полісахаридні ланцюги довголанцюгових вуглеводів, таких як крохмаль, у будь-якому місці. Таким чином, процес гідролізу прискорюється, що призводить до утворення олігосахаридів різної довжини. У тварин α -амілаза є основним травним ензимом. Випускається у вигляді порошку [4].



Рис. 1.2. Альфа-амілаза

Використання і виготовлення

α -амілаза використовується у виробництві етанолу для розщеплення крохмалю в зернах цукру. Також, першим етапом виробництва кукурудзяного сиропу з високим вмістом фруктози є обробка кукурудзяного крохмалю α -амілазою. α -амілаза, звана «термаміл», отримана з бактерій *Bacillus licheniformis*, також використовується в деяких миючих засобах, особливо миючих засобах для миття посуду та видалення крохмалю. У тваринництві амілосубтилін застосовується як біодобавка для різних комбікормів [5].

Дозування Амілосубтиліну при обробці з парогенератором: 1-2 од/г крохмалю, при обробці без пари – як зазначено вище в інструкції температура дії 50-65 °С. При зброджуванні густішого суслу, а також житньої або ячмінної

сировини допускається збільшення доз витрат амілосубтиліну на 25-30% [5].

Оптимальні умови та ефективність

Найбільш ефективна температура, за якої діє фермент, становить 90-95°C. Застосовувати при температурі до 100 °C. Оптимальне дозування при зазначеній температурі становить 0,33 г препарату на 1 кілограм крохмалю, що міститься в сировині. Препарат амілосубтилін активний і за більш низьких температур, проте в такому випадку необхідно збільшувати дозування ферменту [5].

Активність α -амілази оптимальна в нейтральному середовищі (рН = 6,7-7,0), а також при вмісті: хлориду та броміду – найбільший вплив, йодиду – менший вплив, сульфату та фосфату – найменший вплив [5].

Механізм біологічної дії

Альфа-Амілаза (Діастаза) утворюється в слинних залозах та підшлунковій залозі. Також, у підшлунковій залозі утворюється **панкреатична амілаза** - фермент, що бере участь у розщепленні крохмалю та інших вуглеводів у просвіті дванадцятипалої кишки [6].

Амілаза, розщеплюючи крохмаль та інші вуглеводи, забезпечує перетравлення вуглеводів їжі. З організму амілазу виводять нирки разом із сечею. Визначення активності амілази використовується в діагностиці захворювань підшлункової залози, слинних залоз для з'ясування причин болю в животі [6].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ

Амілосубтилін – це ферментний препарат, представлений α -амілазою. Даний препарат синтезується багатьма біологічними агентами, як грибами, так і бактеріями. Наприклад, різні види *Aspergillus* виробляють великі різновиди позаклітинних ферментів, серед яких амілази мають найбільше промислове значення. Такими грибними продуцентами у масштабі виробництва вважають *A. oryzae* та *A. niger* [7].

Альфа-амілази бактеріального походження синтезуються промисловими штамами *Bacillus*. Найчастіше використовуються штами *B. subtilis* та *B. licheniformis*. Нерідко можна зустріти повідомлення про використання штамів *Pseudomonas fluorescens* у виробництві даного ферменту [8, 9].

B. licheniformis є доволі універсальним агентом, адже окрім α -амілази може одночасно синтезувати глюкоамілазу, протеазу та пектиназу. Зважаючи на кінцеву активність ферментів, показники саме α -амілази є найвищими. Наприклад, при культивуванні *B. licheniformis* KIBGE-IB1 отримали наступні результати по активності: α -амілаза – 2621 ± 52 од./мг, глюкоамілаза – $174 \pm 3,5$ од./мг, протеаза – $740 \pm 14,8$ од./мг, пектиназа – $240 \pm 4,8$ од./мг [10].

Доволі часто можна зустріти статті по оптимізації процесу культивування того чи іншого агента для одержання цільового ферменту. Це пов'язано не лише з кінцевою концентрацією, а також з підвищенням активності ферменту. Взагалі, такі білкові препарати дуже чутливі до різних

					НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Сліпчук Т.О.				13	12	
Перевір.		Карлаш Ю.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

чинників, такі як рН середовища та температура, які впливають на показник. При звичайній оптимізації поживного середовища та умов культивування для *B. amyloliquefaciens* NRRL B-14396 вдалось досягти підвищення активності на 98 %, порівняно зі стандартним поживним середовищем та умовами [11].

Також, відомі випадки, що при зміні невеликої кількості параметрів культивування, можна збільшити виробництво ферменту у декілька разів. При оптимізації культивування *Brevibacterium linens* DSM 20158 змінили лише кількість інокуляту, який вноситься, концентрацію пшеничних висівок (попередня – 5 г/л, остаточна – 14,2 г/л), концентрацію сульфату амонію (попередня – 0,1 г/л, остаточна – 0,4 г/л) та температури культивування (попередня – 30 °С, остаточна – 33,5 °С) синтез амілази збільшився на 82,5% [12].

Окрім цього, для культивування деяких мікроорганізмів для одержання α -амілази використовують різні відходи інших виробництв. Наприклад, при культивуванні *Rhizopus oryzae* CH₄ використовували відходи хлібопекарського виробництва, які були представлені відходами білого хліба. Окрім цього, середовище було оптимізовано, що кінцева активність амілази збільшилася майже в 6 разів (з 16,2 од/г до 100 од/г). Але, порівняно з бацилами, показник все одно є доволі низьким [13].

Продовжуючи тему відходів, для одержання ферменту з *A. flavus* AUMC 11685 використовували мандаринову цедру. Окрім цього, в роботі зазначено важливість параметрів культивування на такому поживному середовищі. Таким чином, найгіршим рН є показник 2, а найкращим – 5,5. Найкращою концентрацією цедри є 5 г/л. Температура також має вплив, в підтвердження цього найгіршою температурою є 50 °С, а найкращою – 28 °С. Крім цього, час культивування також впливає на кінцеву активність. При культивуванні культури протягом 7 діб визначено, що найвища активність зафіксована на 4 дні біосинтезу. Отримані дані підтверджують вплив параметрів культивування на кінцевий продукт [14].

Використання різноманітних компонентів для культивування є доволі цікавою темою, яку використовують у дослідженнях амілазосинтезувальних грибів. Так, наприклад, при культивуванні *A. niger* МТСС-282 використовували подрібнений коренеплід – касаву. При оптимізації було визначено, що найкращою концентрацією маніоки є 18,2 г/л порошку, при рН – 4,8, температурі 32,4 °С та тривалості у 79,5 годин. Але, знову ж таки, максимальна активність становила 14,01 од./мл, що є дуже низьким показником на фоні бацил [15].

Порівняльна характеристика різних продуцентів α -амілази зазначена в таблиці 2.1

Таблиця 2.1

Порівняння синтезувальної здатності мікроорганізмів для отримання α -амілази

Мікроорганізм	Компоненти поживного середовища, г(мл)/л	Режим вирощування	Кількість ферменту, мг/л	Активність, од/мл	Джерело
<i>A. oryzae</i> S2	Крохмаль – 10 Дріжджовий екстракт – 1 Сечовина – 0,5 KН ₂ PO ₄ – 0,2 NaNO ₃ – 5 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,03 CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,03 Твін 80 – 1 Мікроелементи - 1 (складається з (г/л): MgSO ₄ – 1,6 ZnSO ₄ – 1,4 FeSO ₄ – 5 CaCl ₂ – 2)	288 год рН – 5,6 30 °С	4,9	55	[16]
<i>B. subtilis</i> МК1	Крохмаль – 2 Лактоза – 10 екстракт яловичини – 5 K ₂ HPO ₄ – 10 MgSO ₄ ·7H ₂ O – 5 FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,25 CaCl ₂ – 0,5	72 год рН – 7 35 °С	20,42 г/л	145,4	[17]
<i>B. subtilis</i> МТСС 2423	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 2,5 K ₂ HPO ₄ – 5 KН ₂ PO ₄ – 5 Цитрат натрію – 1 MgSO ₄ – 0,25	24 год рН – 7 37 °С	183,4	800	[18]

	CaCl ₂ – 0,1 MnSO ₄ – 0,01 FeSO ₄ – 0,01 ZnSO ₄ – 0,002 Глюкоза – 4,5 г/л; Фенілаланін – 0,05 Тирозин – 0,05 Триптофан – 0,05				
--	--	--	--	--	--

Отже, як видно з таблиці 2.1. найгіршим продуцентом амілази є *A. oryzae* S2. Він має найнижчу активність та концентрацію білкового препарату. Це підтверджує той факт, що гриби синтезують набагато меншу кількість та нижчу активність амілази, як це було зазначено вище.

Стосовно штамів *B. subtilis* можна стверджувати, що вони є доволі продуктивними, на фоні грибів. *B. subtilis* МТСС 2423 має вищу активність, але він поступається за концентрацією кінцевого продукту *B. subtilis* МК1. Спираючись на те, що для культивування *B. subtilis* МК1 потрібна менша кількість компонентів поживного середовища, а також на більшу концентрацію білку, можна визначити цей продуцент найкращим поміж вище зазначених.

Незважаючи на те, що час культивування обраного штаму є в 3 рази більшим, а активність менша, перевага мікроорганізми криється у більшій кількості цільового продукту. При його належній очистці можна отримати вищу активність, навіть порівняно з амілазою *B. subtilis* МТСС 2423, а очищеного білку в кінці буде набагато більше, ніж у порівняному штамі.

Оскільки середовище *B. subtilis* МК1 напівсинтетичне, немає можливості перерахувати кількість азоту, тому проводити перерахунок поживного середовища неможливо.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів фермента

Мікроорганізм	Речовина поживного середовища	Кількість у ПС, г/л	Вартість грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Інформаційне джерело (1, 2, 3)*
<i>A. oryzae</i> S2	Крохмаль	10	53	0,53	1

	Дріжджовий екстракт	1	1100	1,1	1
	Сечовина	0,5	43,50	0,02175	1
	KH_2PO_4	0,2	150	0,03	1
	NaNO_3	5	96	0,48	3
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03	35	0,00105	1
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03	24	0,00072	2
	Твін 80	1	225	0,225	1
	Мікроелементи - 1 (складається з (г/л): MgSO_4	1,6	64	0,1024	3
	ZnSO_4	1,4	80	0,112	1
	FeSO_4	5	750	3,75	1
	CaCl_2	2	105	0,21	1
Всього в сумі за 1л середовища = 6,56292 грн					
<i>B. subtilis</i> МК1	Крохмаль	2	53	0,106	2
	Лактоза	10	60	0,6	1
	Екстракт яловичини	5	205	1,025	1
	K_2HPO_4	10	180	1,8	1
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5	35	0,175	1
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	40	0,01	1
	CaCl_2	0,5	105	0,0525	1
Всього в сумі за 1л середовища = 3,7685 грн					
<i>B. subtilis</i> МТСС 2423	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5	41	0,1025	http://ior-pomid 1

	K ₂ HPO ₄	5	180	0,9	1
	KH ₂ PO ₄	5	250	1,25	1
	Цитрат натрію	1	422	0,422	3
	MgSO ₄	0,25	64	0,016	3
	CaCl ₂	0,1	105	0,0105	1
	MnSO ₄	0,01	90	0,0009	1
	FeSO ₄	0,01	750	0,0075	2
	ZnSO ₄	0,002	80	0,00016	1
	Глюкоза	4,5	80	0,36	1
	Тирозин	0,05	2075	0,10375	1
	Триптофан	0,05	2385	0,11925	1
Всього в сумі за 1л середовища = 2,79256 грн					

Примітка. *

1) <https://prom.ua/ua;>

2) <https://proteininkiev.com.ua/ua/p1478077669-tirozin-uns-100.html;>

3) <https://agravery.com/uk/posts/show/cini-na-alovicinu-prodovzuut-zrostati.>

Ціни наведено станом на травень 2022р.

Таблиця 2.3

Умовна ціна 1 г ферменту альфа-амілази

Біологічний агент	Концентрація фермента, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ферментів за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>A. oryzae</i> S2	0,0049	288	0,000017	6,56292	1340,8
<i>B. subtilis</i> MK1	20,42	72	0,28	3,7685	0,185

<i>B. subtilis</i> MTCC 2423	0,1834	24	0,008	2,7925	15,22
------------------------------------	--------	----	-------	--------	-------

Можна зробити висновок, що економічно найвигіднішим цільовим продуктом є *B. subtilis* МК1, оскільки його вартість за 1г/л=0,185 грн. На другому місці *B. subtilis* MTCC 2423 за швидкістю культивування він є самим продуктивним, оскільки культивується всього 24 години на відміну від попереднього. Третє місце посідає *A. oryzae* S2, за всіма показниками - **не рекомендую.**

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Амілосубтилін є ферментним препаратом бактеріального походження, переважна частина препарату складається з альфа-амілази. Даний препарат в основному використовують для розріджування крохмалю, а саме переведення полісахаридів крохмалю у розчинений стан. Враховуючи механізм дії даного препарату його найчастіше застосовують в харчовій промисловості, де використовують крохмаль в якості початкової сировини та де в подальшому відбувається використання дріжджів, а саме в хлібопекарській та спиртовій та крохмало-патоковій промисловості.

В хлібопекарській промисловості найбільшої популярності набув препарат амілоризин, який є подібний до амілосубтиліну (наявна альфа-амілаза), але даний препарат отримується з грибів. Тому використовувати амілосубтилін для даної сфери не є доцільним.

В крохмало-патоковій та спиртовій промисловості використання амілосубтиліну є звичним явищем. В спиртовій промисловості основним компонентом сухих речовин початкової сировини з якої виробляють спирт є крохмаль, який не зброджується дріжджами. Для інтенсифікації процесу виробництва спирту необхідно використовувати ферментні препарати, які гідролізують крохмаль до зброджуваних цукрів, застосування амілолітичних ферментів є одним з етапів даного процесу.

В крохмало-патоковій промисловості амілосубтилін використовують для етапу розрідження крохмалю з метою виробництва різних паток, які в подальшому використовуються в різних галузях харчової промисловості.

Розглянувши перераховані вище сфери використання альфа-амілази, для подальшого розрахунку річної потреби оптимальним варіантом буде розрахунок використання альфа-амілази для спиртової промисловості, через

					НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування					
Розроб.		Сліпчук Т.О.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.							19	8
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

легшу прогнозованість кількості виробництва та використання спиртової продукції, в порівнянні з крохмало-патоковою промисловістю (в даній сфері складно визначити, яку кількість крохмального гідролізату та де його зазвичай використовують).

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Визначивши в якій сфері амілосубтилін найбільш затребуваний, розрахуємо потужність виробництва. Згідно даних Державної служби статистики в Україні в 2020 році вироблено 9,4 млн дал спирту етилового неденатурованого (харчового) [19].

Дізнавшись кількість спирту, яку було вироблено, визначимо теоретичну яку кількість крохмалю було використано для виробництва даної кількості спирту. Так як спирт може вироблятися з використанням різних технологій та сировини в якій наявна різна кількість крохмалю, для подальших розрахунків розглянемо дані з патенту в якому наводиться декілька прикладів отримання спирту з різної сировини з використанням ферментів для розріджування та оцукрювання [20]. Згідно даного патенту можна спостерігати що теоретично при використанні картоплі та кукурудзи в якості початкової сировини для виробництва спирту, вихід спирту на умовну тону крохмалю є найбільшим, в той час як при використанні пшениці він є найменшим. Враховуючи різні дані та неможливість визначити відсоткове співвідношення використання однієї чи іншої сировини, для подальших розрахунків оберемо найменший показник виходу спирту на тону крохмалю, який наведений в даному патенті та становить 64,0 дал спирту на тону умовного крохмалю.

Отже, теоретична кількість крохмалю буде становити:

$$9,4 \text{ млн дал спирту} / 64,0 \text{ дал спирту/т крохмалю} = 146\,875 \text{ т крохмалю}$$

Розраховуємо кількість ферментного препарату Амілосубтілін Г3х зі стандартною активністю $A_{ст} = 1500 \text{ Од/г}$, необхідного для оцукрювання 146 875 т крохмалю при витратах 1 умовного г ферменту на 1,5 кг крохмалю

$$146\,875\,000 \text{ кг/1,5 кг} = 91\,916\,667 \text{ г або } 91\,916,677 \text{ кг Амілосубтіліну Г3х}$$

Для подальших розрахунків, врахуємо наявні конкуруючі умови та визначимо, що теоретично можливі потреби, які можуть бути задоволені, становлять 20% від загальної кількості:

$$91\,916,677 \text{ кг} \times 0,2 = 19\,583,3 \text{ кг Амїлосубтиліну ГЗх.}$$

Округляємо потребу до цілого $G_{\text{гп}} = 19\,600 \text{ кг}$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера і кількості виробничих циклів

Для матеріального розрахунку процесу отримання визначеної потреби Амїлосубтиліну ГЗх приймаємо наступні вихідні дані:

Річна потужність підприємства, ум.кг/рік;	$G_{\text{гп}} = 19\,600$
Кількість робочих днів у рік	$T_{\text{рд}} = 62$
Стандартна активність препарату, Од Ак/ г препарату;	$A_{\text{ст}} = 1500$
Активність препарату в культуральній рідині, Од/ мл КР	$A_{\text{кр}} = 145,4$
Концентрація ферменту в КР, кг фм/м ³ КР	$P_{\text{кр}} = 1,5$
СР в готовому продукті, частка (0,9-0,95)	$СР_{\text{гп}} = 0,95$
Час виробничого циклу, год	$T_{\text{цк}} = 80,$
де 72 год – час культивування, 8 год – час на підготовку ферментера.	
Коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій), 1,1-1,5;	$K_1 = 1,1$
Коефіцієнт заповнення ферментера, частка:	$K_{\text{ф}} = 0,6$
Втрати КР при біосинтезі (краплевинос), $E_{\text{ф}}$, частка (0,08-0,2)	$E_{\text{ф}} = 0,091$
Втрати ферменту при його виділенні	
Втрати продукту при сепаруванні КР, частка	$E_{\text{сп}} = 0,05$
Втрати продукту при ультрафільтрації супернатанту, частка	$E_{\text{уф}} = 0,12$
Втрати продукту при сушінні концентрату, частка	$E_{\text{сш}} = 0,12$
<u>Втрати продукту при упакуванні, частка</u>	<u>$E_{\text{уп}} = 0,01$</u>
Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту), частка	$E_{\text{св}} = 0,30$
Втрати активності ферменту при його виділенні	
Втрати активності при сепаруванні, частка	$E_{\text{ас}} = 0,07$
Втрати активності при ультрафільтруванні, частка	$E_{\text{ауф}} = 0,06$

Втрати активності при сушінні, частка $E_{асш} = 0,12$

Сумарні втрати активності ферменту при виділенні $E_{ав} = 0,25$

При відсутності даних з концентрації цільового продукту в культуральній рідині приблизно можна прийняти, $P_{кр}$, г/л: *антибіотики, ферментні препарати 1...2*. Приймаємо концентрація ферменту в КР $P_{кр} = 1,5$ г/л.

Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

1.1. Кількість циклів (партій) за рік

$$N_{цк} = 24 \times K_1 \times T_{рд} / T_{ц} = 24 \cdot 1,1 \cdot 62 / 80 = 20,5$$

Приймаємо цілу кількість циклів за рік $N_{цк} = 21$

1.2. Кількість ум.кг ферменту/цикл

$$G_{цкy} = G_{гп} / N_{цк} = 19600 / 21 = 933,3$$

1.3. Кількість одиниць активності ферменту, що знаходяться в 1 умовному кг, Од фм / ум. кг препарату

$$A_{цкy} = A_{ст} \cdot 1000 = 1,5 \cdot 10^6$$

1.4. Кількість одиниць активності ферменту в КР з врахуванням втрат активності при виділенні в 1 тов. кг, Од/ тов. кг

$$A_{крт} = A_{кр} \cdot 10^6 (1 - E_{ав}) / P_{кр} = 7,27 \cdot 10^7$$

1.5. Кількість товарного ферменту за цикл, тов.кг/цикл

$$G_{цкт} = A_{цкy} \cdot G_{цкy} / A_{крт} = 1,5 \cdot 10^6 \cdot 933,3 / 7,27 \cdot 10^7 = 19,3$$

1.6. Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат ферменту при виділенні $E_{св}$, м³

$$V_{кр} = G_{цкт} \cdot CP_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 19,3 \cdot 0,95 / 1,5 (1 - 0,3) = 17,46$$

Визначення геометричного об'єму ферментера

1.7. Визначаємо робочий об'єм ферментера, м³

$$V_{рф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 17,46 / (1 - 0,091) = 19,2$$

1.8. Приблизний геометричний об'єм ферментера, м³

$$V_{пф} = V_{рф} / K_{ф} = 19,2 / 0,6 = 32,0$$

1.9. З таблиці Технічні характеристики ферментрів вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, м³ $V_{гф} = 32,0$

1.10. Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{уф}$, частка

$$K_{уф} = V_{рф}/V_{гф} = 19,2/32 = 0,6$$

Перевірене значення $K_{уф}$ відповідає вибраному діапазону ферментера з комбінованим перемішуванням - 0,5 - 0,65

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримуємо $V_{пц} = 17,46 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Під час отримання культуральної рідини необхідно передбачити втрати КР в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які становлять до 10%.

Розраховуючи, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом є наступною:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{пц}}{1-E_{ф}} = \frac{17,46}{1-0,09} = 19,2 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм ферментера складається з суми об'єму поживного середовища (ПС) $V_{пс1}$ та об'єму посівного матеріалу (ПМ) $V_{пм1}$.

Посівний матеріал готується в посівному апараті (ПА) та його об'єм дорівнює 10 % від об'єму поживного середовища який подається до ферментера:

$$V_{пс1} = V_{роб1}/(1+X_{пм1}) = 19,2 / (1 + 0,1) = 17,46 \text{ м}^3$$

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 19,2 - 17,46 = 1,74 \text{ м}^3$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для посівних апаратів

Посівний матеріал готується у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{роб2}$

$$V_{роб2} = V_{пм1}/(1-E_{пм}) = 1,74 / (1 - 0,1) = 1,93 \text{ м}^3$$

де $E_{пм} = 0,1$ – втрата культурального середовища при вирощуванні посівного матеріалу у інокуляторі, внаслідок стікання частини культурального середовища при його аерації.

З метою отримання посівного матеріалу слід забезпечити наступний об'єм поживного середовища $V_{пс2}$ та кількість посівного матеріалу, що складає 10% від об'єму поживного середовища $V_{пс2}$

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{пм2}) = 1,93 / (1 + 0,1) = 1,75 \text{ м}^3$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 1,93 - 1,75 = 0,18 \text{ м}^3$$

Для встановлення наближеного геометричного об'єму посівного апарата $V_{па1}$ використовуємо $V_{роб2}$ та $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{па1} = V_{роб2} / K_{зап} = 1,93 / 0,6 = 3,2 \text{ м}^3$$

Дану кількість посівного матеріалу *Bacillus subtilis* МК1 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{па} = 3,2 \text{ м}^3$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{зап2} = V_{роб2} / V_{па} = 1,93 / 3,2 = 0,6, \text{ що допустимо.}$$

Посівний матеріал для посівного апарату об'ємом $3,2 \text{ м}^3$ готується у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{роб3}$

$$V_{роб3} = V_{пм2} / (1 - E_{пм}) = 0,18 / (1 - 0,1) = 200 \text{ л}$$

де $E_{пм} = 0,1$ – втрата культурального середовища при вирощуванні посівного матеріалу у інокуляторі, внаслідок стікання частини культурального середовища при його аерації.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{пс3}$ та кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища $V_{пс2}$

$$V_{пс3} = V_{роб3} / (1 + X_{пм3}) = 200 / (1 + 0,1) = 182 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 200 - 182 = 18 \text{ л}$$

Для визначення приблизного геометричного об'єму посівного апарата $V_{па2}$ використовуємо $V_{роб3}$ та $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{па2} = V_{роб3} / K_{зап} = 200 / 0,6 = 333 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Bacillus subtilis* МК1 можна отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{па} = 0,4 \text{ м}^3$.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{па2}} = 200 / 400 = 0,5, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок ПС та ПМ для інокулятора

Посівний матеріал для посівного апарата $0,4 \text{ м}^3$ готується в інокуляторі з робочим об'ємом $V_{\text{роб4}}$

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{пм4}}) = 18 / (1 - 0,05) = 18,95 \text{ л,}$$

де $E_{\text{пм4}} = 0,05$ – це втрати культурального середовища під час вирощування ПМ в інокуляторі за рахунок краплевиносу частини КР під час аерації середовища. З метою вирощування посівного матеріалу $V_{\text{пс4}}$ потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс4}}$ та кількість посівного матеріалу, яка дорівнює 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс4}}$

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 18,95 / (1 + 0,1) = 17,23 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 18,95 - 17,23 = 1,72 \text{ л}$$

Для встановлення приблизного геометричного об'єму інокулятора $V_{\text{ін1}}$ використовуємо $V_{\text{роб4}}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{роб4}} / K_{\text{зап}} = 18,95 / 0,6 = 31,58 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Bacillus subtilis* МК1 можна отримати при культивуванні в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін1}} = 30$ л.

Тоді дійсний коефіцієнт заповнення буде

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб4}} / V_{\text{ін1}} = 18,95 / 30 = 0,63, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб

Посівний матеріал для інокулятора об'ємом 30 л синтезується в качалочних колбах. Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах на качалці $V_{\text{пм4}} = 1,72$ л. Втратами при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб5}} = V_{\text{пм4}} = 1,72 \text{ л}$$

Для одержання посівного матеріала потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс4}}$ та кількість посівного матеріалу, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс5}}$

$$V_{пс5} = V_{роб5} / (1 + X_{пм5}) = 1,72 / (1 + 0,1) = 1,56 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{пм5} = V_{роб5} - V_{пс5} = 1,72 - 1,56 = 0,16 \text{ л}$$

Для культивування використовуємо колби об'ємом $V_{кол} = 0,75 \text{ л}$ та коефіцієнтом заповнення $K_{зап} = 0,2$

Кількість колб

$$N_k = V_{роб5} / V_{кол} \times K_{зап} = 1,72 / 0,75 \cdot 0,2 = 11,46 \text{ колб, тобто } 12 \text{ колб}$$

Підсумовуючи можна зазначити, що процес одержання посівного матеріалу *Bacillus subtilis* МК1 для синтезу альфа-амілази у ферментері об'ємом 32 м^3 і з коефіцієнтом заповнення 0,6 здійснюється у чотири етапи.

Таблиця 3.1

Об'єми апаратів для стадій синтезування посівного матеріалу та для культивування у ферментері

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, V_r , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л
1	$0,750 \times 12$ колб	0,2	1,72	1,56	0,16
2	30	0,63	18,95	17,23	1,72
3	400	0,50	200	182	18
4	3 200	0,60	1 930	1 750	180
5	32 000	0,60	19 200	17 460	1 740

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Амілосубтилін – це ферментний продукт, основним компонентом якого є альфа амілаза. Класичним бактеріальним продуцентом цього ензиму є різні штами *B. subtilis*. При аналізі різних літературних джерел було обрано штам *B. subtilis* МК1. Основними компонентами вуглецевого живлення для даного мікроорганізму виступають крохмаль та лактоза. Спочатку продуцент використовує першу сполуку, оскільки на її розпад витрачається менше часу, а реакцій біохімічного перетворення – менше, всього дві. В той час як лактоза застосовується після, оскільки для її перетворення в інтермедіат гліколізу (глюкозо-1-фосфат) проходить 4 дії [21].

За даними KEGG в клітині повноцінно функціонує гліколіз, як основний шлях катаболізму. Тому, подальшу схему буде наведено за таким способом перетворення речовин в піровиноградну кислоту.

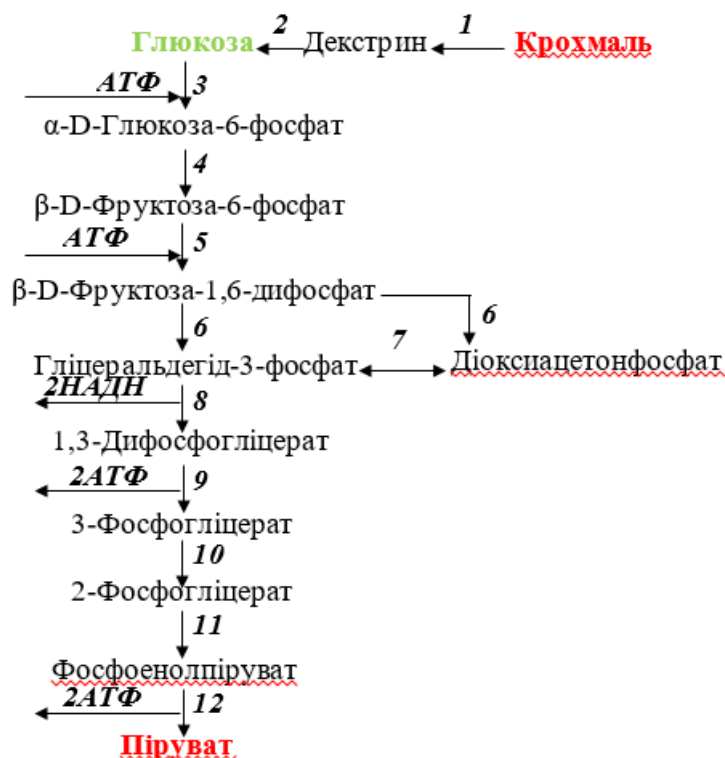


Рис.4. 1. Схема гліколізу, яка функціонує в *B. subtilis* МК1

					НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту					
Розроб.	Сліпчук Т.О.							Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.								27	6
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

Ферменти: 1 - альфа-амілаза (КФ 3.2.1.1), 2 - оліго-1,6-глюкозидаза (КФ 3.2.1.10), 3 – глюकोкіназа (КФ 2.7.1.2), 4 – глюकोзо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9), 5 – фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11), 6 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13), 7 – тріозофосфат ізомерази (КФ.5.3.1.1), 8 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 9 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 10 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12), 11 – енолаза (КФ 4.2.1.11), 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

Отже, попередньо гліколіз розпочинається перетворенням крохмалю в декстрин, під дією вже нам знайомої альфа-амілази (1, КФ 3.2.1.1), а вже після декстрину утворюється глюкоза – початковий компонент шляху Ембдена-Маєргофа-Парнаса, під дією оліго-1,6-глюкозидаза (2, КФ 3.2.1.10). Глюкокіназа (3, КФ 2.7.1.2) допомагає речовині перейти у фосфатну форму. Після чого, дана речовина перетворюється в фосфатну форму галактози, за допомогою глюकोзо-6-фосфат ізомерази (4, КФ 5.3.1.9). Дана сполука трансформується в фруктозо-1,6-дифосфат під впливом фосфофруктокінази (5, КФ 2.7.1.11). Після чого, за допомогою фруктозодифосфат альдолази (6, КФ 4.1.2.13) йде розвилка на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат. Це сполуки, які можуть переходити одна в одну за допомогою тріозофосфат ізомерази (7, КФ.5.3.1.1). Далі, з гліцеральдегід-3-фосфату синтезується 1,3-дифосфогліцерат в присутності гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (8, КФ 1.2.1.12), а після цього в 3-фосфогліцерат за допомогою фосфогліцераткінази (9, КФ 2.7.2.3). Фосфогліцератмутаза (10, КФ 5.4.2.12) вносить свої корективи та утворює 2-фосфогліцерат. З нього утворюється фосфоенолпіруват під впливом енолази (11, КФ 4.2.1.11). Кінцевим ферментом, який закінчує гліколіз є піруваткіназа (12, КФ 2.7.1.40), за допомогою якої одержується піруват.

Доречно зазначити, що лактозу не показано на схемі, оскільки вона до катаболізму залучається лише після повного вичерпання крохмалю. За вичерпанням цієї речовини відбувається 4 ферментні реакції з перетворення

молочної кислоти в галактозу та її похідні, а потім в продукт гліколізу глюкозо-1-фосфат.

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Як було вказано вище, наша головна ціль – одержання альфа амілази. Це фермент, який складається з 15 амінокислот. До цього складу входять: аспартат, треонін, серин, глутамат, пролін, гліцин, аланін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, тирозин, фенілаланін, гістидин та лізин [22].

Схема біотрансформації крохмалю в альфа-амілазу продемонстровано на рис. 2.

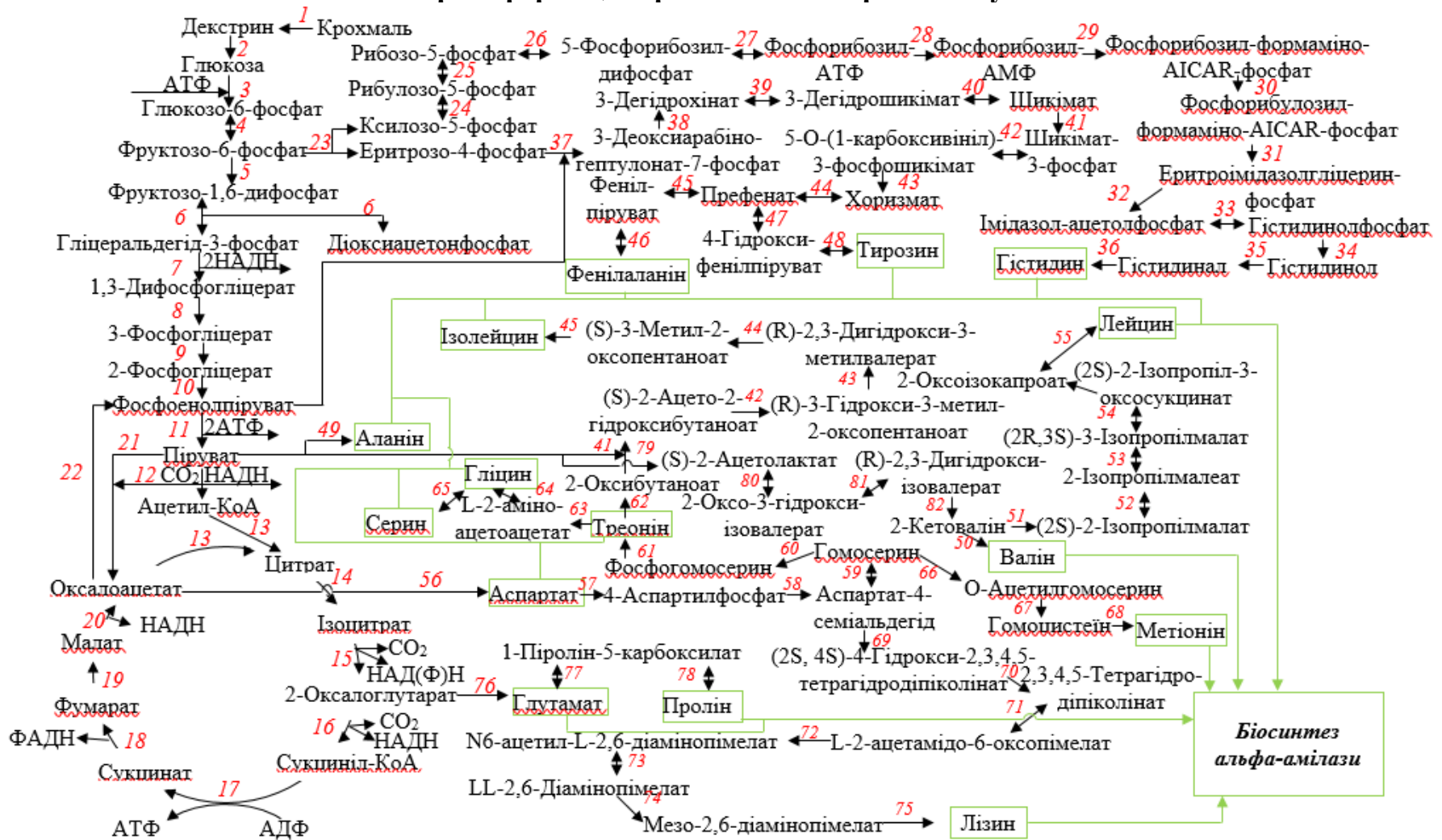
Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, метіонін, треонін, ізолейцин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК .

Амінокислоти глутаматної родини (глутамін, пролін) утворюються з 2-оксоглутарату (інтермедіату ЦТК).

Амінокислоти піруватної родини (аланін, валін, лейцин, серин, гліцин) синтезуються з пірувату (інтермедіат гліколізу).

Фруктозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники ароматичних амінокислот – фосфорибозилпірофосфат (попередник гістидину) і еритрозо-4-фосфат. Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват – попередники фенілаланіну та тирозину.

Біотрансформація крохмалю в альфа-амілазу



Ферменти: 1 - альфа-амілаза (КФ 3.2.1.1), 2 - оліго-1,6-глюкозидаза (КФ 3.2.1.10), 3 – глюकोкіназа (КФ 2.7.1.2), 4 – глюकोзо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9), 5 – фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11), 6 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13), 7 – тріозофосфат ізомерази (КФ.5.3.1.1), 8 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12), 9 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), 10 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12), 11 – енолаза (КФ 4.2.1.11), 12 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40), 13,16 – бета субодиниця 2-оксоглутарат ферредоксин оксидоредуктаза (КФ 1.2.7.11), 14 – цитрат синтаза (КФ 2.3.3.1), 15 – аконітат гідратаза (КФ 4.2.1.3), 16 – ізоцитрат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.42), 17 – альфа-субодиниця сукциніл-КоА синтетаза (КФ 6.2.1.5) та сукциніл-КоА: кофермент А трансфераза (КФ 2.8.3.18), 18 – сукцинат дегідрогенази залізо-сірчана субодиниця (КФ 1.3.5.1, КФ 1.3.5.4), 19 – фумарат гідратаза (КФ 4.2.1.2), 20 – малат дегідрогеназа (КФ 1.1.5.4), 21 – піруват карбоксилаза (КФ 6.4.1.1), 22 – фосфоенолпіруват карбоксикіназа (КФ 4.1.1.49), 23 – транкетолаза (КФ 2.2.1.1), 24 – 3-рибулозофосфат епімераза (КФ 5.1.3.1), 25 – рибозо-5-фосфатізомераза А (КФ 5.3.1.6), 26 – рибозофосфат-пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1), 27 – АТФ фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17), 28 – фосфорибозил-АТФ пірофосфогідролаза (КФ 3.6.1.31), 29 – фосфорибозил-АМР циклогідролаза (КФ 3.5.4.19), 30 – риботидкарбоксамід-фосфорибозилформаміно-5-аміноімідазол-карбоксамід ізомераза (КФ 5.3.1.16), 31 – субодиниця імідазол-гліцерол-фосфат-синтаза HisH (КФ 4.3.2.10), 32 – імідазолегліцерол-фосфатдегідрататаза (КФ 4.2.1.19), 33 – гістидинол-фосфат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9), 34 – гістидинол-фосфатаза (КФ 3.1.3.15), 35,36 – гістидинолдегідрогеназа (КФ 1.1.1.23), 37 – 3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтаза (КФ 2.5.1.54), 38 – 3-дегідрохінатна синтаза (КФ 4.2.3.4), 39 – 3-дегідрохінатна дегідрататаза II (КФ 4.2.1.10), 40 – шикіматдегідрогеназа (КФ 1.1.1.25), 41,79 – шикіматнакіназа (КФ 2.7.1.71), 42 – 3-фосфошикімат 1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.19), 43 – хорізматсинтаза (КФ.4 2.3.5), 44 – хорізматмутаза (КФ 5.4.99.5), 45 – префенатдегідратаза (КФ 4.2.1.51), 46 – аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1), 47 - гістидинол-фосфатна

амінотрансфераза (КФ 2.6.1.9), 48 – префенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.12), 49 – аланін дегідрогеназа (КФ 1.4.1.1), 50,55 – амінокислоттрансфераза з розгалуженою ланцюгом (КФ 2.6.1.42) та лейцин дегідрогеназа (КФ 1.4.1.9), 51 – 2-ізопропілмалат синтаза (КФ 2.3.3.13), 52,53 – 3-ізопропілмалатдегідратаза великої субодиниці (КФ 4.2.1.33), 54 – 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85), 56 – аспартат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.1), 57 – аспартат кіназа (КФ 2.7.2.4), 58 – аспартат-напівалдегідегідрогеназа (КФ 1.2.1.11), 59 – гомосерин дегідрогеназа (КФ 1.1.1.3), 60 – гомосерин кіназа (КФ 2.2.1.39), 61 – треонін синтаза (КФ 4.2.3.1), 62 – треонін дегідратаза (КФ 4.3.1.19), 63 – 56 – треонін 3-дегідрогеназа (КФ 1.1.1.103), 64 – гліцин С-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.29), 65 – гліцин гідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1), 66 – гомосерин О-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.31), 67 – цистатіонін гамма-синтаза (КФ 2.5.1.48, КФ 2.5.1.49), 68 – 5-метилтетрагідрофолат-гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.13, КФ 2.1.1.14), 69 – дигідродіпіколінатсинтаза (КФ 4.3.3.7), 70 – 4-гідрокси-тетрагідродіпіколінат редуктаза (КФ 1.17.1.8), 71 – тетрагідродіпіколінат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89), 72 – амінотрансфераза (КФ 2.6.1.-), 73 – N-ацетилдіамінопімелат деацетилаза (КФ 3.5.1.47), 74 – діамінопімелатна епімераза (КФ 5.1.1.7), 75 – діамінопімелат-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20), 76 – малий ланцюг глутаматсинтази (НАДФН) (КФ 1.4.1.13), 77 – 1-піролін-5-карбоксилатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.88), 78 – піролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2), 80,81 – кетолово-кислотна редуктоізомераза (КФ 1.1.1.86), 82 – дигідроксикислота дегідратаза (КФ 4.2.1.9)

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Bacillus subtilis (можливі синоніми: *Vibrio subtilis*, *B. atterimus*, *B. mesentericus*, *B. panis*, *B. vulgatus*, *Tyrothrix minimus*, *B. nigrificans*, *B. mesentericus hydrolyticus*), також відомий як сінна або трав'яна паличка – найбільш продуктивний представники роду *Bacillus*. За фарбуванням по Граму є позитивними. Бактерії паличкоподібної форми. Розмір клітин становить 2,0-3,0×0,7-0,8 мкм. Клітини рухливі, за розташуванням джгутики є перитрихійними [23-25].

У ґрунті бацили знаходяться у вигляді спор. За формою спори можуть бути еліпсоїдними або циліндричними, по відношенню до розташування центральними або парацентральними, іноді субтермінальними. Не деформують вегетативну клітину. Більшість штамів не виробляють значного капсулярного матеріалу. При настанні сприятливих умов бактерії переходять у активний (вегетативний) стан. Чим вище рН (лужні ґрунти), тим більший відсоток спор бактерії [23-25].

Як правило, штами *B. subtilis* утворюють на поживному середовищі опуклі колонії ризоїдної форми. Добре ростуть на МПА, пептонно-кукурудзяному агарі та інших середовищах. Загальна характеристика цих бактерій на агаризованому середовищі наступна [23,24]:

- колонії круглі або неправильної форми;
- поверхня матова, може бути зморшкуватою;
- колонії можуть набувати кремового або коричневого кольору.

Особливості колоній сильно відрізняються в залежності від складу

					НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					33	23
Реценз.						Кафедра БТМ ↵		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

середовища. Колоніальна морфологія мінлива, як всередині так і між штамми, і може створювати вигляд змішаної культури. На картопляному або агаровому середовищі, що містить глюкозу, можуть утворюватися пігменти від кремового, жовтого, оранжевого, рожевого і червоного до коричневого або чорного кольору [23].

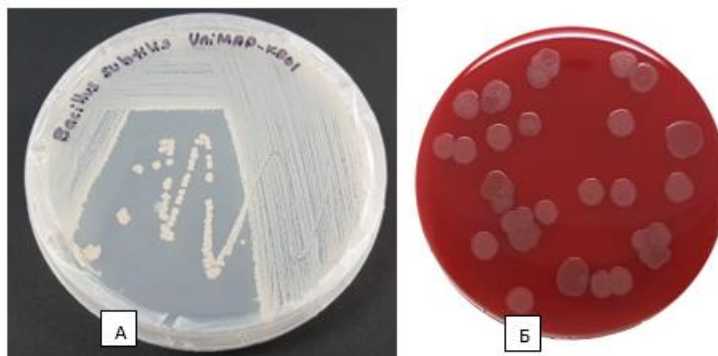


Рис.5.1. Колонії *B. subtilis* на: А - агарі с карбоксиметилцеллюлозою;
Б – на кров'яному агарі [26,27]

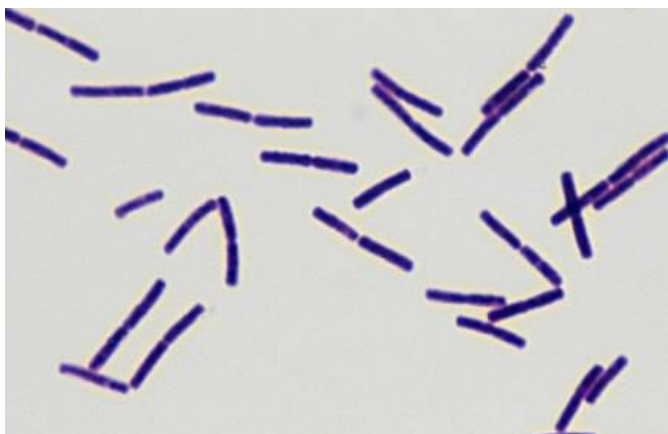


Рис.5.2. Клітини *B. subtilis* зафарбовані за Грамом (збільшення в 400 раз) [28]

B. subtilis – аеробні бактерії, анаеробно рости не можуть. Температура росту від 5-15 °С до 40-50 °С. Оптимальна температура становить 28-30 °С. Витримують до 7% концентрації NaCl, але сіль не є необхідною для зростання. Активний ріст спостерігається при рН 5,5-8,5 [23].

B. subtilis має позитивні результати реакцій бета-галактозидази, каталази, гідролізу ескуліну, гідролізу крохмалю, реакції Фогеса-Проскауера. Може використовувати цитрат як джерела вуглецю. Відновлює нітрати до нітритів. Здатен до розкладання казеїну та вироблення кислоти з глюкози, манози, гліцерину, глікогену, саліцину, D-ксилози, арбутину, целобіози, фруктози, бета-

гентибіози, мезоінозиту, мальтози, рафінози, рибози, сорбіту, сахарози, трегалози та маніту [23].

Негативні результати щодо гідролізу гіпурату, аргініндигідролази, деградації тирозину, дезамінування фенілаланіну, лізиндекарбоксілази, орнітиндекарбоксілази. Неможливий синтез кислоти з адонітолу, D-арабінози, D-арабітолу, L-арабіту, дульциту, еритриту, D-фукози, L-фукози, глюконату, 2-кетоглюконату, 5-кетоглюконату, ліксози, мелезітози, рамнози, сорбози, ксиліту і L-ксилози [23].

Варіабельні результати, в залежності від штаму, для оксидази, а також вироблення кислоти з лактози, інуліну та галактози [23].

Зазначивши інформацію вище, можна приступати до визначення умов культивування. Наш продуцент – аероб, тому потребується ретельна підготовка аераційного повітря для промислового культивування. Оптимальна температура становить 30-37 °С, що підходить більшості мезофільним бактеріям. Отже – асептичні умови треба гарантувати [29].

Режим перемішування для культури варіюється від 150 об/хв до 250. Можна обрати середнє значення, 200 об/хв. До речі, такий режим перемішування також використовують для культивування штамів *B. subtilis* [29-31].

Культивування будемо проводити глибинним та періодичним способами. Поверхневий метод не застосовується для бацил, ця методика розроблена для грибів. А періодичний метод дає ряд переваг перед безперервним, дозволяє забезпечити ефективне використання субстрату, що є більш економічно доцільним.

Вибір типу ферментера

Для наших потреб необхідно підібрати ферментер об'ємом 32 м³. Ферментатор з нержавіючої сталі Hermann може окремо контролювати температуру за допомогою гліколевих сорочок і в основному оснащений такими аксесуарами, як клапан скидання тиску, струмінь для очищення CIP, клапан для санітарних проб, люк тощо [32].

Стандартна конфігурація ферментеру має в собі наступні параметри [29]:

- Розмір: 2600mm · 7800mm
- Внутрішня оболонка: SUS304 повністю зварна; ТН=4 мм
- Зовнішня оболонка: повністю зварна SUS304; ТН=2,5 мм
- Внутрішня обробка: загальне полірування до 0,4~0,6 мкм без мертвих кутів
- Ізоляція: поліуретан; ТН=80 мм
- Сорочка з гліколю на конусі та збоку
- Суворі перевірки на герметичність бака водою та газом під тиском
- Суворий тест на герметичність оболонки водою та газом під тиском
- Конічна головка і низ
- Фланцевий люк зверху
- Ручка СІР з охопленням 360° СІР розпилювальна кулька
- Рукоятка для викиду CO₂ з клапаном-метеликом
- Повний санітарний пробовідбірний клапан
- Механічний запобіжний клапан 2 бар на кронштейні СІР
- Протиударний манометр на кронштейні СІР
- Поворотний стелажний кронштейн і порт на конусі з заслінкою
- Нагнітальний рукав із трьома затискачами з дросельним клапаном
- Термогильза для високоточного датчика температури



Рис. 5.3. Ферментер Hermann [32]

Отже, спираючись на особливості нашого біологічного агента, можна

зробити висновок, що даний ферментер може повністю забезпечити наші потреби.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

B. subtilis– аеробні бактерії, анаеробно рости не можуть. Отже, наш продуцент – аероб, тому потребується ретельна підготовка аераційного повітря для культивування. Також для культивування необхідно створити асептичні умови. Створення асептичних умов передбачає підготовку та стерилізацію повітря для аерації, стерилізацію композицій поживного середовища, обладнання для ферментації та всіх комунікацій.

Підготовка стерильного стисненого повітря для аерації для інокуляторів та виробничого ферментера передбачає такі стадії:

1) Забір атмосферного повітря. Кількість мікроорганізмів у повітрі варіюється в різні пори року, і це явище слід враховувати при виборі очищувача повітря. Оскільки зі збільшенням висоти кількість часточок у повітрі зменшується, то для виробництва амілосубтилінузабір повітря здійснюють на висоті близько 23 м, повітрязабірні пристрої розташовані в 2-3 м від верхньої частини будівлі, тоді висота поверху приблизно становитиме 20 м.

2) Первинне очищення повітря від великих часток. Здійснюють очищення від великих часток пилу розміром 5-10 мкм на фільтрах попереднього очищення. Для очищення газів і повітря при проведенні технологічних процесів застосовують волокнисті фільтри. Фільтри зі штучних волокон з полімерних смол (наприклад, полістиролу, перхлорвінілу, поліарилату) товщиною від 0,1 до 100 мкм. Швидкість фільтрації $0,01 \div 0,10$ м/с.

3) Далі повітря стискають. На цьому етапі вологість підвищується через зміни тиску та температури. Для стиснення і нагнітання повітря використовують поршневий компресор або турбокомпресор (тиск 0,35-0,5 МПа, температура 120-250°C).

4) Потім нагріте повітря охолоджують у теплообміннику-охолоджувачі та конденсують вологу, що утворилась, у краплезбірнику. Повітря поступає до ресивера для вирівнювання тиску в системі й забезпечення рівномірної

подачі повітря на фільтри.

5) Далі повітря очищують в головному фільтрі. Компанії мікробної промисловості використовували фільтруючі матеріали з базальтових волокон у своїх основних фільтрах. Основною перевагою базальтового волокна є його висока паронепроникність (вища, ніж у скловолокна). Повторний вплив гарячої пари під тиском 0,2 МПа не знижує міцність волокна навіть після року експлуатації фільтра. Властивості базальтових волокон не змінюються при нагріванні до 1100°C. Базальтові волокна не гниють і не горять. Досліди показали, що оптимальний діаметр волокон для фільтрів грубого очищення повітря становить 12-14 мікрон.

Для очищення великих обсягів повітря використовуються флісові фільтруючі матеріали, виготовлені з різних волокон.

Суміші поліамідів, поліефірів, віскози, металів і різних волокон. Товщина нетканого фільтруючого матеріалу зазвичай становить 1-5 мм, а маса панелі площею 1 м² становить 0,4-1 кг [33].

6) Для подачі повітря до інокуляторів та ферментеравно проходить очищення в індивідуальних фільтрах.

Фільтри Петріянова (ФП) з тканиною Петріянова, що складається з ультратонких полімерних волокон, використовуються в індивідуальних фільтрах для забезпечення тонкого очищення повітря. Такі фільтри сформовані у виді тканини на марлевій підкладці. На сьогодні виробляється різноманітна кількість ФП.

Базальтові волокна також використовують в індивідуальних фільтрах для виготовлення базальтового паперу та картону з достатньою механічною міцністю. В останні роки для очищення повітря використовуються тверді пористі перегородки, такі як пластик і металокераміка. Перевагами цих матеріалів у порівнянні з волокнистими є структурна стабільність, стійкість до високих температур, простота конструкції та простота обслуговування фільтра. Істотним недоліком є високий перепад тиску. Фторполімерні та металокерамічні фільтруючі матеріали найчастіше використовуються у вигляді FER-втулок, які є

фільтруючими елементами картриджного типу. Фільтруючі матеріали цього типу добре стерилізуються паром [34].

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Під час культивування *Bacillus subtilis* в інокуляторах і в ферментері підтримується температурний режим 37°C, значення рН 7 та аерація. Такі умови легко піддаються контамінацією іншими мікроорганізмами. Тому необхідно забезпечення асептичних умов культивування. Один з етапів допоміжних робіт є санітарна підготовка виробничих приміщень, персоналу, обладнання та комунікацій, підготовка дезінфікуючих розчинів, підготовка поживних середовищ в збірниках. Мийно-дезінфікувальні засоби необхідні для підготовки поверхонь приміщень (підлога, стіни, стеля, вікна, двері), обладнання та рук персоналу перед початком роботи. Рекомендується змінювати засоби кожні 1-3 місяці задля уникнення розвитку та розповсюдження стійких форм мікроорганізмів, тому у табл. 5.1 наведено кілька мийних і кілька дезінфікуючих засобів.

У табл. 5.1 наведено мийні та дезінфікуючі засоби, які можуть використовуватися для фармацевтичної, харчової та біотехнологічної галузі. Всі вони зареєстровані в державному реєстрі. Вони відрізняються за спектрами бактерицидної дії, корозійністю, безпекою на організм персоналу, екологічністю та стабільністю розчинів, а також часом експозиції.

Загальні властивості мийних та дезінфікуючих засобів

Таблиця 5.1

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Джерело інформації
1	2	3	4
«Стериокс» (Baltichemi) (Надоцтова кислота 15-20%)	Поверхні приміщення та обладнання	0,01 (час експозиції 15 хв)	[35]

Засіб мийний універсальний з ароматом морської свіжості ТМ "SUPER WASH" з дезінфікуючою дією (ЧАС*)	Поверхні приміщення та обладнання	10 (час експозиції 60хв)	[36]
Дезінфекційний засіб «ДЕЗаль», діючими речовинами засобу є комплекс четвертинних амонійних сполук - 17,0±2 % (алкілдиметилбензиламоній хлорид - 10,0±2 %; дидецилдиметиламоній хлорид - 7,0±2 %) та глутаровий альдегід - 4,3±2 %	Приміщення та поверхні обладнання	0,1 - (час витримки 20 хв) 0,5 - (10 хв)	[37]
Засіб для дезінфекції рук та шкіри спиртовмісний "SterillPlus" (діючі речовини: спирт ізопропіловий – 70-80%)	Руки персоналу	готовий до застосування (час експозиції 20 сек)	[38]
Засіб дезінфекційний Dezoquatam 10 (діючі речовини мас.%,: 72–77 % спирт ізопропіловий, 0,15 % алкілдиметилбензиламоній хлорид)	Руки персоналу	готовий до безпосереднього використання (час експозиції 15 сек)	[39]

Мийні та дезінфікуючі засоби для обробки поверхонь приміщень та обладнання

Стеріокс має виключно високу бактерицидну (в т.ч. туберкулоцидну), віруліцидну (включаючи найбільш стійкі до дії дезінфекційних засобів поліовіруси), фунгіцидну (у тому числі щодо дріжджових та пліснявих грибів) та спороцидну дію. Засіб не має селективної антимікробної дії та перешкоджає формуванню стійких штамів мікроорганізмів, не має шкірно-подразнюючої, шкірно-резорбтивної та сенсibiliзуючої дії. Приготування робочих розчинів препарату Sterioks проводять з використанням індивідуальних засобів захисту: клейончатий фартух, гумові рукавички, герметичні окуляри (типу ПО-2, ПО-3), респіратор типу РУ-60М або РПГ-67 з протигазовим патроном марки або аналогічним. При використанні розчинів препарату Стеріокс у концентрації по АДВ не більше 0,1% методом протирання з усіх засобів індивідуального захисту використовують лише гумові рукавички та фартух. Стеріокс добре змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Робочий розчин прозорий, має помірний

оцтовокислий запах, має миючі властивості, видаляє механічні, білкові та жирні забруднення. Не усуває органічні забруднення. Розчини не надають шкідливого впливу на об'єкти, виготовлені з нержавіючої сталі (в т.ч. хромистої, хромонікелевої, аустенітної). Стеріокс застосовується у вигляді водних робочих розчинів у концентрації 0,005-0,01% діючої речовини [35].

Засіб ТМ «SUPERWASH» можна використовувати на підприємствах біотехнологічної промисловості. Діючою речовиною є четвертинні амонійні сполуки. Засіб має обмежений спектр дії на мікроорганізми. Також відзначають несумісність з милами та аніонними поверхнево-активними речовинами (ПАР), тому не можна їх змішувати разом [36].

Засіб «Дезаль» Це концентрований безбарвний розчин, який можна використовувати для дезінфекції та стерилізації різних предметів. Забезпечує відмінне з'єднання з водою і спінення. Препарат проявляє активність проти бактерій, включаючи грам-позитивні та грам-негативні, вірусів, грибків. Низькі температури не впливають на властивості. Засіб «ДЕЗаль» призначений: — для проведення профілактичної, поточної та заключної дезінфекції, генеральних прибирань [37].

Обираючи миючі і дезінфікуючі засоби, було врахована їхній біологічний вплив на мікроорганізми, на персонал, корозійну здатність, екологічність.

Біосинтез альфа-амілази в препараті аміносубтиліну за допомогою *Bacillus subtilis* проходить 62 дні, за яких відбувається 21 цикл, і передбачає підготовку такого устаткування та обладнання: збірники 30л, 20000 л, 30л, 20 м³, інокулятор 30, 300, 3200 л, ферментер 32000 л. Виробництво містить такі приміщення: цех біосинтезу та вирощування інокуляту, цех підготовки поживного середовища для УБС і збірників, лабораторне приміщення. При створенні плану приміщення враховують діаметр приладів, відстань між ними (не менше 1 м) і відстань від стін (1-1,5 м). На рис. 5.4 вказано план приміщення та розташування обладнання. Основні розміри ферментаційного обладнання вказані в таблиці 5.2.

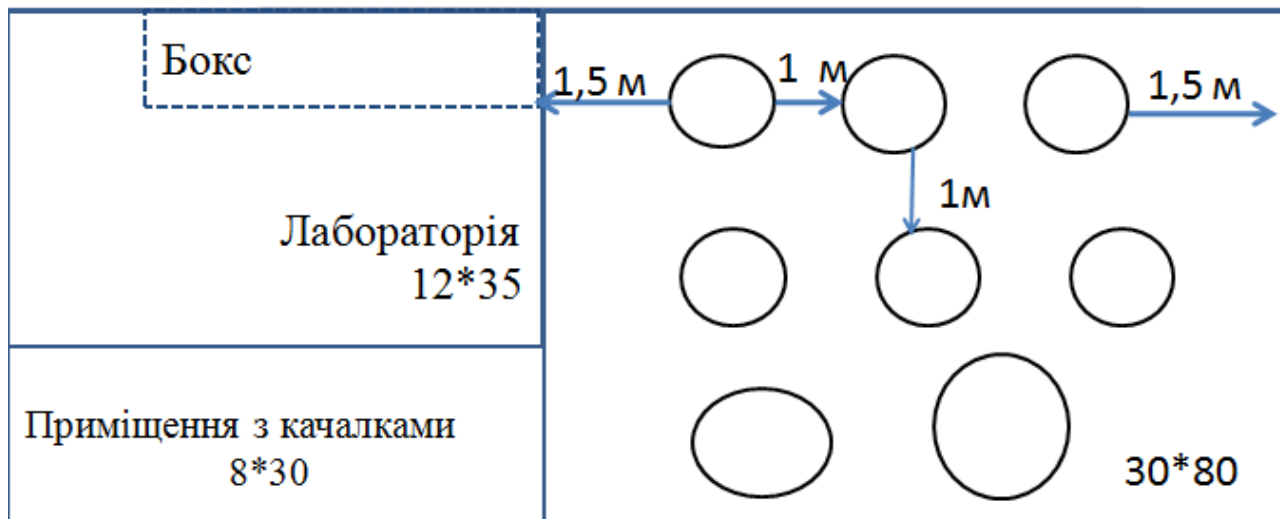


Рис. 5.4. Ескіз плану приміщень для біосинтезу аміносубтиліну

Габаритні розміри основного обладнання для синтезу аміносубтиліну

Таблиця 5.2

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	32 000	1,9	7,8
Реактор-змішувач для хлоридної кислоти	30	0,35	1,15
Реактор-змішувач для приготування натрію хлориду	30	0,35	1,15
Реактор-змішувач для приготування натрію гідроксиду	30	0,35	1,15
Інокулятор 30 л	30	0,35	1,15
Інокулятор 300 л	300	0,775	2,75
Інокулятор 3000 л	3000	1,2	4,36
Збірник змішування компонентів	20 000	1,5	6,8
Всього	55420		

З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня позмінно, тобто 124 рази. Генеральн еприбирання (стін, підлоги,вікон тощо) слід проводити раз на місяць, тобто двічі на 62дні. Для

розрахунку кількості миючого засобу необхідно розрахувати приблизну площу, яку потрібно обробити миючим або дезінфікуючим засобом, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту до 5 м. Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить 30 м², площа стін – $[(9 \times 2,5) + (15 \times 2,5)] \times 2 = 80 \text{ м}^2$, загальна площа – 110 м². Значення загальної площі поверхні обробки мийними засобами наведено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех біосинтезу	30	80	110
Мікробіологічна лабораторія	12	35	47
Приміщення з качалками	8	30	38
Загальна площа	50	145	185

Кількість виробничих циклів біосинтезу аміносубтиліну є 21. Оскільки миття обладнання відбувається перед запуском циклу, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 21+1 (миття після останнього циклу). Миття обладнань відбувається з використанням циркуляційної СІР-мийки. Він дозволяє зменшити витрати мийного розчину, тому об'єм мийного засобу для СІР-мийки для одного циклу буде становити 20% від кожного з об'ємів обладнання. Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$(55420 \times 22) = 1\,219\,240 \text{ л}$$

Узагальнені відомості щодо розрахунків площ миття та дезінфекції за весь період виробництва наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок площі миття та дезінфекції оброблюваних зон за весь час синтезу

Об'єкт миття та дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (л)	Кількість процесів миття та дезінфекції за весь період синтезу	Загальна площа миття та дезінфекції об'єкту за весь період синтезу, м² (л)
Обладнання	55420 л	22	243848 л
Підлога	80	124	9920
Стіни, двері, вікна	105	4	420

Дані з вибору мийних та дезінфікуючих препаратів наводяться у вигляді загальної таблиці (табл.5.5).

Таблиця 5.5

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва аміносубтиліну

Назва мийного/дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м2 (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л (CIP-мийка обладнання)	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода (NaOH)	Обладнання	1	1219240	243848	57	5,7	1389934
Засіб мийний ТМ "SUPER WASH"	Обладнання	10	1219240	243848	70	0,7	170694
Дезінфекційний засіб «ДЕЗаль»	Обладнання	0,25	1219240	243848	588	1,47	358457
Дезинфікуючий засіб «Стериокс»	Стіни, підлога, вікна, двері	0,01	10340	2068	125	0,25	517
«Вернедор-Преміум»	Стіни, підлога, вікна, двері	0,1	10340	2068	630	6,4	13235

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Середовище для виробничого отримання амілосубтиліну *Bacillus subtilis* МК1 має наступний склад (г/л) [21]:

- Крохмаль – 2
- Лактоза – 10
- Екстракт яловичини – 5
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,25
- $CaCl_2$ – 0,5
- K_2HPO_4 – 10

Час культивування – 72 години, рН = 7,0

Принцип поділу на композиції спирається на температурні режими стерилізації. Для накопичення біомаси доречно використовувати модернізоване середовище LB (Лурія Бертані) без агару, на якому не культивується такої високої кількості фермента, а лише збільшується кількість клітин.

Склад середовища LB , г/л [21]:

- Триптон – 10
- Дріжджовий екстракт – 5
- NaCl – 5

Початковий рН доводили до 9 перед стерилізацією при 121 °С протягом 20 хв. Час культивування 24 години при температурі $t = 35$ °С.

Виробниче культивування реалізують у ферментері об'ємом 32 м³, коефіцієнт заповнення становить 0,6. Напрацювання інокуляту здійснюють у чотири етапи (в колбах на качалці, інокуляторах 30, 400 л та 3,2 м³).

Стерилізацію поживного середовища для напрацювання інокуляту в колбах на качалках здійснюють в автоклаві, адже об'єм поживного середовища становить 1,92 л на цьому етапі. Приготування композиції А середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторах проводять у відповідних посівних апаратах, композицію Б для колб, інокулятора 30 та 400 л готують в колбах відповідної місткості, для посівного апарату 3,2 м³ у збірнику об'ємом 30 л.

Об'єм ферментера складає 32 м^3 , а кількість поживного середовища у ньому $17,455 \text{ м}^3$, тому стерилізацію поживного середовища здійснюють безперервним способом з використанням установки безперервної стерилізації. Такий об'єм поживного середовища стерилізують в УБС-20, продуктивність становить $20 \text{ м}^3/\text{год}$ [40].

Загальний час стерилізації середовища становить $\tau = 17,455/20 = 0,87 \text{ год}$.
Температура стерилізації – 121°C .

Особливості приготування композиція продемонстровано в табл. 5.6 та 5.7.

Таблиця 5.6

Приготування композицій поживного середовища для підготовки посівного матеріалу

Компонент	Колби – 1,92 л поживного середовища		Інокулятор 30 л – 18 л поживного середовища		Інокулятор 400 л – 178 л поживного середовища		Інокулятор 3,2 м ³ – 1763 л поживного середовища	
	Маса, г	Приготування	Маса, г	Приготування	Маса, г	Приготування	Маса, кг	Приготування
Композиція А								
Триптон	1,92	В колбі на 3 л	180	Збірник 400 л	1780	Збірник 400 л	17,63	Збірник 400 л
Дріжджовий екстракт	9,6		90		890		8,8	
Композиція Б								
NaCl	9,6	В колбі на 0,5 л	90	В колбі на 1 л	890	В колбі на 5 л	8,8	В збірнику на 30 л

Таблиця 5.7

Приготування композицій поживного середовища для виробничого біосинтезу

Компонент	Ферментер – 17 455 л поживного середовища	
	Маса, кг	Приготування
Композиція А		
Крохмаль	34,9	В збірнику на 20 м ³ Стерилізація – в УБС-20
Лактоза	174,5	
Яловичий екстракт	87,2	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	87,2	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,3	
CaCl ₂	8,7	
K ₂ HPO ₄	174,5	
Вода	15 710	
Конденсат	1 745	
Разом:	17 455	

Вирощування інокуляту в колбах на качалці

Тож, для стадії колб, інокулятора на 30 л, 400 л та 3,2 м³ поділ на композиції є наступним:

Композиція А: триптон, дріжджовий екстракт. Стерилізація проходить при 121 °С, протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl. Стерилізація проходить при 131 °С, протягом 40 хв.

На технічних вагах зважують триптон, дріжджовий екстракт, наважки переносять у колбу, додають воду питну, колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 30 хв при температурі 121°С. Дана композиція потребує нижчої температури стерилізації, оскільки у складі триптону та дріжджового екстракту містяться термолабільні сполуки. Хлорид натрію готують та стерилізують окремо в автоклаві за режиму, що підходить для стерилізації солей.

Таблиця 5.8

Композиції поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 1,92 л, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Триптон	10	1,92	А	1500
Дріжджовий екстракт	5	9,6		
Вода		1500		
NaCl	5	9,6	Б	420
Вода		420		
Разом:				

Вирощування інокуляту в посівних апаратах 30, 400 л та 3,2 м³

Стерилізація 18, 178 та 1763 л поживного середовища буде проходити у відповідних інокуляторах, тому композиції солей необхідно об'єднати.

Композиція А: триптон, дріжджовий екстракт. Стерилізація проходить при 121 °С, протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl. Стерилізація проходить при 131 °С, протягом 40 хв.

На технічних вагах зважують триптон, дріжджовий екстракт, наважки

переносять у збірник, додають воду питну, перемішують та стерилізують протягом 30 хв при температурі 121°C. Дана композиція потребує нижчої температури стерилізації, оскільки у складі триптоні та дріжджового екстракту містяться термолабільні сполуки. Хлорид натрію готують та стерилізують окремо в колбах та збірнику за режиму, що підходить для стерилізації солей.

Таблиця 5.9

Композиції поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 30 л

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 18 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Триптон	10	180	А	17,5
Дріжджовий екстракт	5	90		
Вода		15,8		
Конденсат		1,7		
NaCl	5	90	Б	0,5
Вода		0,5		
Разом:				18

Таблиця 5.10

Композиції поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 400 л

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 178 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Триптон	10	1780	А	175
Дріжджовий екстракт	5	890		
Вода		157,5		
Конденсат		17,5		
NaCl	5	890	Б	3
Вода		3		
Разом:				178

Таблиця 5.11

Композиції поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 3,2 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 1763 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Триптон	10	17,63	А	1748
Дріжджовий	5	8,8		

екстракт				
Вода		1573,2		
Конденсат		174,8		
NaCl	5	8,8	Б	15
Вода		13,5		
Конденсат		1,5		
Разом:				
				1763

Виробничий біосинтез у ферментері 32 м³

Для виробничого культивування використовується інше поживне середовище, зазначене вище. Тому, отримуємо наступну схему:

Композиція А: крохмаль, лактоза, яловичий екстракт, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, CaCl₂, K₂HPO₄.

Об'єм ферментера складає 32 м³, а кількість поживного середовища у ньому 17 455 л, тому стерилізацію поживного середовища слід проводити безперервним способом, використовуючи установку безперервної стерилізації. Такий об'єм поживного середовища можна простерилізувати в УБС-20, продуктивністю 20 м³/год [40]. Загальний час стерилізації середовища становить $\tau = 17,455/20 = 0,87$ год. Температура стерилізації – 121°C.

Таблиця 5.12

Композиції поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 32 м³

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст компоненту на 17,455 м ³ , кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	2	34,9	А	17 455
Лактоза	10	174,5		
Яловичий екстракт	5	87,2		
MgSO ₄ ·7H ₂ O,	5	87,2		
FeSO ₄ ·7H ₂ O,	0,25	4,3		
CaCl ₂ ,	0,5	8,7		
K ₂ HPO ₄	10	174,5		
Вода		15 710		
Конденсат		1 745		

Разом:	17 455
---------------	--------

Розчин усіх компонентів поживного середовища, що становлять композицію А, готують в одному реакторі-змішувачі перед подачею на УБС-20.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Для підтримання рН в середовищі для вирощування *B. subtilis* МК1 на рівні 7 передбачимо підготовку розчину титрувальних агентів – 6%-ві розчини соляної кислоти та натрію гідроксиду. Дані розчини вносяться у середовищі з розрахунку 2 мл кислоти чи лугу на 1 л середовища відповідно у випадку зміщення рН до значення, відмінного від оптимального.

Отже, для культивування амілосубтиліну передбачають проведення таких додаткових стадій:

1. підготовка аераційного повітря;
2. приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища для інокуляторів та ферментеру;
3. приготування 6% розчину NaOH для підлужнення середовища для інокуляторів та ферментеру;

Передбачають наявність такого додаткового обладнання (збірників):

1. для приготування 6% розчину HCl об'ємом 30 л;
2. для приготування та стерилізації 6% розчину NaOH об'ємом 30 л;
3. для приготування та стерилізації хлориду натрію: об'ємом 30 л;
4. для приготування та стерилізації композиції А: об'ємом 400 л;
5. для змішування та розчинення компонентів перед УБС-20: 20 м³.

5.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту

Наступним етапом біотехнологічного виробництва ферментного препарату Амілосубтиліну ГЗх є виділення та очищення цільового продукту з культуральної рідини. Згідно номенклатури ферментних препаратів, Амілосубтилін ГЗх це порошкоподібний препарат одержаний шляхом висушування концентрату культуральної рідини в розпилювальній сушарці [41].

Отже, процес очищення та виділення Амілосубтилін ГЗх повинен, складатись з наступних стадій:

- 1) Видалення біомаси
- 2) Концентрування
- 3) Сушіння

5.3. Пропозиції щодо підбору обладнання для реалізації післяферментаційних процесів

5.3.1. Видалення біомаси

В результаті одного виробничого циклу біосинтезу в ферментері об'ємом 32 м³, отримуємо 17,46 м³ культуральної рідини. На сьогодні найпоширенішими способами видалення біомаси є: фільтрування, центрифугування та сепарування [42]. Розглянемо більш детально переваги та недоліки даних методів, для визначення оптимального методу.

Переваги сепарації полягають у тому, що втрати активної речовини незначні, непотрібні фільтрувальні добавки, можлива автоматизація, обладнання компактне і ефективне для розділення великих клітин. Але враховуючи що потрібно обробити приблизно 17,5 м³ культуральної рідини та враховуючи морфолого-культуральні особливості продуцента, а саме невеликі за розміром клітини (клітина *Bacillus subtilis* в довжину приблизно 4–10 мікрометрів (мкм), а діаметр 0,25–1,0 мкм) та зважаючи на недоліки даного способу (великі витрати енергії), можна зробити висновок, що використання даного методу є економічно недоцільно.

Центрифугування має такі переваги, як висока продуктивність процесу, відсутність допоміжного обладнання та широкі можливості для механізації та автоматизації процесу, але також і недоліки, такі як висока складність конструкції, високі вимоги до точності виробничого вузла, високі витрати енергії на привід і висока вартість обладнання [42]. Підсумовуючи, центрифугування має ряд переваг, але через наявні недоліки можна зробити висновок, що даний метод також недоцільно використовувати.

На сьогодні в промислових масштабах фільтрування є основним способом відділення біомаси від культуральних рідини, та враховуючи що розглянуті

попередні способи виділення біомаси є недоцільними, фільтрування є оптимальним варіантом. Через великий об'єм культуральної рідини який необхідно профільтрувати, в якості фільтрувальної установки доцільніше буде використовувати мембранний або камерний фільтр-прес.

Отже, процес виділення біомаси буде відбуватись за допомогою фільтрування культуральної рідини. В якості фільтрувальної установки використовуватимемо мембранний фільтр-прес.

5.3.2. Концентрування

В результаті видалення біомаси залишається приблизно 16 м³ фільтрату, для стадії концентрування на сьогодні використовують декілька методів, це випарювання або ультрафільтрація. Враховуючи фізико-хімічні властивості ферментів, а саме що при температурі 90-100 °С альфа-амілаза денатурується, то можна зробити висновок що використання випарювання не є доцільним.

Отже, для концентрування будемо використовувати ультрафільтраційну установку, також враховуючи молекулярну масу альфа-амілази 55 - 57 кДа [43], необхідно встановити фільтрувальні касети з відсіканням молекулярної ваги в 50 кДа. Під час ультрафільтрації фільтрат буде сконцентровано в 4 рази.

5.3.3. Сушіння

Заключним етапом отримання порошкоподібного ферментного препарату є сушіння концентрату. Для сушіння можна використовувати, розпилювальну сушарку, сублімаційну сушарку або вакуум-сушильну шафу.

Враховуючи великий об'єм концентрату, який необхідно висушити, можна зробити висновок що використання сублімаційної сушарки та вакуум-сушильної установки є недоцільним.

Оптимальним варіантом буде використання розпилювальної сушарки, а також слід передбачити щоб нагрівання відбувалось до 90 °С для збереження активності ферменту. Продуктивність розпилювальної сушарки по випареній волозі має становити приблизно 5 м³/год.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

У таблиці 6.1 наведено специфікацію основної та допоміжної апаратури для біосинтезу амілосубтиліну, що представлено на апаратурній схемі у графічній частині роботи.

Таблиця 6.1.

Специфікація ділянки допоміжних робіт та культивування амілосубтиліну

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрязабірник відцентровий. Корпус із оцинкованої сталі. Робоча температура від -30 °С до +80 °С. Продуктивність 2500 м ³ /год. Виробник: «Dundar» (Туреччина) [44]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр з нетканого фільтрувального полотна. Ефективність очищення 60-65%. Компанія: «Технічні тканини України» (Україна) [45]
К-3	Компресор	1	Компресор поршневий повітряний масляний двохступінчатий. Максимальний тиск 8 МПа. Виробник: «ПТМЗ» (Україна) [46]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Рефрижераторний осушувач Crownwell, очищення стисненого повітря від вологи з точкою роси до +3 °С. Модель HEF-005 – пропускна спроможність 5 м ³ /хв. Компанія: «Crownwell» (Україна) [47]
Р-5	Ресивер	1	Повітрязбірник ресивер об'ємом 750 л. Укомплектований манометром, кранами, клапанами. Максимальна робоча температура 100 °С, тиск – 12 бар. Компанія: «KOMPRESORMASH-SERVIS» (Україна) [48]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач повітря водяний Вентс НКВ 250-4. Як теплоносій використовується вода. Водяні трубки виготовлені з міді, основний матеріал – алюміній. Максимальний робочий тиск трубок Вентс НКВ 250-4 1,6 МПа, а допустима температура води +100°С. Виробник: «VENTS» (Україна) [49]

НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
					Розділ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Сліпчук Т.О.					55	3
Перевір.		Карлаш О.В.				Кафедра БТМ 55		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження табл. 6.1

Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр базальтовий рукавний, діапазон робочих температур $\leq 450^{\circ}\text{C}$. Компанія: «АФФ+» (Україна) [50]
Ф-8 Ф-14 Ф-20 Ф-26	Індивідуальний фільтр	4	Фільтр змінний патронного типу з високоефективного синтетичного матеріалу, ефективність очищення до 99,9%. Компанія: «Фолтер-Україна» (Україна) [51]
ІН-9	Інокулятор 30 л	1	Реактор мобільний РС-30 об'ємом 30 л. З нержавіючої сталі AISI 304, 316L. Внутрішній діаметр 350 мм, довжина 1084 мм, ширина 600 мм, висота 1150 мм. Швидкість обертів мішалки від 0 до 300 об/хв. Компанія: «Промвіт» (Україна) [52]
Д-10	Дозатор рідин	1	Дозатор спіральний для рідин NPL-50-201 Hualian. Діапазон дозування: 5-50 л. Похибка дози (допустима): до 1%. Компанія: «ЦИКАДА» (Україна) [53]
3-11	Збірник для хлоридної кислоти	1	Реактор мобільний РС-30 об'ємом 30 л. З нержавіючої сталі AISI 304, 316L. Внутрішній діаметр 350 мм, довжина 1084 мм, ширина 600 мм, висота 1150 мм. Швидкість обертів мішалки від 0 до 300 об/хв. Компанія: «Промвіт» (Україна) [52]
Д-12 Д-16 Д-18 Д-22	Дозатор	4	Ваги технічні настільні ВТА-60/3-7. Діапазон дозування 1-3000 г. Похибка дозування 1%. Компанія: «Промприлад» (Україна) [54]
3-13	Збірник для гідроксиду натрію	1	Реактор мобільний РС-30 об'ємом 30 л. З нержавіючої сталі AISI 304, 316L. Внутрішній діаметр 350 мм, довжина 1084 мм, ширина 600 мм, висота 1150 мм. Швидкість обертів мішалки від 0 до 300 об/хв. Компанія: «Промвіт» (Україна) [52]
ІН-15	Інокулятор 400 л	1	Біореактор об'ємом 400 л нержавіючої сталі AISI 304. Є теплообмінна рубашка. Висота 2350 мм, діаметр 600 мм. Виробник: «Термо-S» (Україна) [55]
3-17	Збірник 400 л	1	Біореактор об'ємом 400 л нержавіючої сталі AISI 304. Є теплообмінна рубашка. Висота 2350 мм, діаметр 600 мм. Виробник: «Термо-S» (Україна) [55]
3-19	Збірник для хлориду натрію	1	Реактор мобільний РС-30 об'ємом 30 л. З нержавіючої сталі AISI 304, 316L. Внутрішній діаметр 350 мм, довжина 1084 мм, ширина 600 мм, висота 1150 мм. Швидкість обертів мішалки від 0 до 300 об/хв. Компанія: «Промвіт» (Україна) [52]

Продовження табл. 6.1

ІН-21	Інокулятор 3,2 м ³	1	Ферментер 3200 л. Матеріал нержавіюча сталь. Загальна висота 4200 мм, загальний діаметр 1700 мм. Є рубашка, перемішувачий пристрій. Компанія: «CZECH BREWERY SYSTEM» (Чехія) [56]
Д-23	Дозатор	1	Дозатор сипучих продуктів ДК-1. Межі дозування 0,05 - 5 кг. Похибка дозування +/- 3 г. Об'єм накопичувального бункера: 80 л. Компанія: «Кий-В» (Україна) [57]
З-23	Збірник для змішування компонентів	1	Промисловий реактор об'ємом 20 м ³ . Матеріал титан, є рубашка. Температура: 0 - 250 °С. Режим роботи мішалки 0-1200 об/хв. Компанія: «WeihaiHuixinChemicalMachineryCo., Ltd.» (Китай) [58]
Н-24 Н-28	Насос	2	Відцентровий насос SalvatoreRobuschi серії RG. Продуктивність: 300 м ³ /год. Максимальний напір 140 м. Виробник: «SalvatoreRobuschi» (Італія) [59]
УБС-25	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації, продуктивність 20 м ³ /год; Виробник: «Steritech» (Франція) [60]
ФР-27	Ферментер 32 м ³	1	Ферментатор з нержавіючої сталі об'ємом 32 м ³ . Діаметр 3200 мм, висота 9000 мм. Встановлено температурний датчик, запобіжні клапани, манометр. Компанія: «PerryVidex» (США) [32, 61]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема виробничого біосинтезу амілосубтиліну *Bacillus subtilis* МК1 передбачає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес, що включає підготовку посівного матеріалу та виробничий біосинтез амілосубтиліну.

Технологічну схему культивування *B. subtilis* МК1 наведено у графічній частині курсової роботи.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється за допомогою вертикальних труб з повітрязабірниками (ПЗ-1) у найвищій точці Н = 23 м.

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

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

ДР 1.3. Компресіювання повітря

Повітря стискається компресором (К-3) для забезпечення вентиляції, подолання гідравлічного та іншого опору в стовпі рідини ферментатора та для інших виробничих потреб. Відбувається нагрівання повітря до 120-200 °С, тиск становить 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-охолоджувачі (Т-4) до температури 25-30 °С для видалення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де усуваються пульсації руху

НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
					Розділ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу					
Розроб.		Сліпчук Т.О.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.							58	7
Реценз.								Кафедра БТМ 58		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 1.5. Підігрівання повітря

Для зменшення ризику конденсації вологи на основному фільтрі та окремих фільтрувальних матеріалах повітря підігрівається до 30-35°C за допомогою теплообмінника-нагрівача (Т-6).

ДР 1.6. Тонке очищення повітря

Нагріте повітря подають на головний фільтр очистки (Ф-7) класу очищення EU4, ефективність очищення становить $E=90-95\%$.

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Перед кожним інокулятором та виробничим ферментером (ІН-9, ІН-15, ІН-21, ФР-27), установлюють індивідуальні фільтри (Ф-8, Ф-14, Ф-20, Ф-26) патронного типу з високоефективного синтетичного матеріалу, ефективність очищення до 99,9.

ДР 2. Приготування титрувальних агентів для титрування поживного середовища

ДР 2.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживних середовищ

У збірник З-11 об'ємом 2 л через об'ємно-ваговий дозатор Д-10 подають 19,8 л води питної, вмикають мішалку і вносять 3,6 л 37 %-го розчину HCl. Приготований розчин кислоти не стерилізують.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживних середовищ

У збірник З-13 об'ємом 2 л, вносять 1,2 кг NaOH через дозатор Д-12, потім додають 20 л питної води, вмикають мішалку (50 об/хв). Розчин лугу стерилізують протягом 40 хв при температурі 131°C.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1,92 г триптону, 9,6 г дріжджового екстракту, наважки переносять у колбу на 3 л, додають 1500 мл питної води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 30 хв при температурі 120°C.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 9,6 г NaCl, наважку переносять у колбу на 1 л, додають 420 мл дистильованої води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131°C.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 30 л

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-16 зважують 180 г триптону, 90 г дріжджового екстракту, наважки переносять у збірник 3-17, подають 14,2 л питної води, перемішують. Початковий рН доводять до 9 перед стерилізацією подачею розчину лугу від ДР 2.2. Для повного розчинення компонентів підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух апарата й вмикають перемішуючий пристрій. Після цього стерилізують протягом 30 хв за температури 120°C.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 81 г NaCl, наважку переносять у колбу на 1 л, додають 0,5 л дистильованої води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131°C.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 400 л

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-16 зважують 1780 г триптону, 890 г дріжджового екстракту, наважки переносять у збірник 3-17, подають 157,5 л питної води, перемішують. Початковий рН доводять до 9 перед стерилізацією подачею

розчину лугу від ДР 2.2. Для повного розчинення компонентів підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух апарата й вмикають перемішувачий пристрій. Після цього стерилізують протягом 30 хв за температури 120°С.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 890 г NaCl, наважку переносять у колбу на 5 л, додають 3 л дистильованої води, перемішують. Колбу із розчином закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві протягом 40 хв при температурі 131°С.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі 3,2 м³

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах Д-16 зважують 17,63 кг триптон, 8,8 кг дріжджового екстракту, наважки переносять у збірник 3-17, подають 1573,2 л питної води, перемішують. Початковий рН доводять до 9 перед стерилізацією подачею розчину лугу від ДР 2.2. Для повного розчинення компонентів підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух апарата й вмикають перемішувачий пристрій. Після цього стерилізують протягом 30 хв за температури 120°С.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах Д-18 зважують 8,8 кг NaCl, наважку переносять у збірник 3-19 на 30 л, додають 13,5 л питної води, перемішують. З метоб повної розчинності компонентів досягають температури розчину до 40 °С шляхом подавання пари у кожух апарата, після цього вмикають перемішувачий пристрій. Після цього стерилізують протягом 1 год за температури 131°С.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 32 м³

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою дозатора Д-22 у збірник об'ємом 20 м³ 3-23 подають: 34,9 кг крохмалю, 174,5 кг лактози, 87,2 кг яловичого екстракту, 87,2 кг MgSO₄×7H₂O,

4,3 кг FeSO₄·7H₂O, 8,7 кг CaCl₂, 174,5 кг K₂HPO₄ та 15710 л питної води. Для повного розчинення компонентів підвищують температуру розчину до 40 °С подачею пари у кожух збірника й вмикають перемішувачий пристрій.

Одержану суспензію перекачують насосом Н-24 в установку безперервної стерилізації УБС-26, де відбувається стерилізація цієї композиції гострою парою за температури 121 °С протягом 5-7 хвилин.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури Bacillus subtilis МК1

Колекційну культуру штаму *Bacillus subtilis* МК1 зберігають у пробірках зі скошеним LB агаром при температурі 4°С, здійснюють пересіви кожні 2-3 місяці. При роботі з колекційною культурою забезпечуються строго асептичні умови.

ТП 4.2. Отримання Bacillus subtilis МК1 на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з LB агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашках Петрі з LB агаром в асептичних умовах. Вирощують при температурі 35°С упродовж 24 год.

ТП 4.3. Вирощування робочої культури Bacillus subtilis МК1 на агаризованому середовищі

Мікробіологічною петлею пересівають ізольовані колонії на пробірки зі скошеним LB агаром із розрахунку – одна ізольована колонія на окрему пробірку. Вирощування робочої культури здійснюють у пробірках при 35°С протягом 24 год.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

У колбу об'ємом 3 л із 1500 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять 420 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2). Розчин перемішують і розливають по 150 мл у 12 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірки з *Bacillus subtilis* МК1 (від ТП 4.3) вносять по 15 мл фізіологічного розчину, суспендують та додають у колби з поживним середовищем. Культивування клітин здійснюють у колбах на качалці при 200 об/хв при 35°С упродовж 24 год. По закінченню культивування відбирають

проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокулятор ІН-9 об'ємом 30 л подають композицію А (від ДР 3.2.1), подають 0,5 л розчину композиції Б від ДР 3.2.2. Вирощування продуцента проводять за рН 7,0, рН середовища до необхідного значення доводять титрувальними розчинами – 6%-ми розчинами соляної кислоти на натрію гідроксиду від ДР 2.1 та ДР 2.2 зі збірників З-11 та З-13. Потім додають інокулят з колб через засівну колбу від ТП 4.4, приводять в роботу перемішуючий пристрій, здійснюють аерацію, подають пару у кожух інокулятора.

Культивування клітин здійснюють упродовж 24 год при температурі 35°C, рН 7, в аеробних умовах при перемішуванні 200 об/хв. По закінченню культивування відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 4.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 400 л

В інокулятор ІН-15 об'ємом 400 л подають композицію А (від ДР 3.3.1), подають 3 л розчину композиції Б від ДР 3.3.2. Вирощування продуцента проводять за рН 7,0, рН середовища до необхідного значення доводять титрувальними розчинами – 6%-ми розчинами соляної кислоти на натрію гідроксиду від ДР 2.1 та ДР 2.2 зі збірників З-11 та З-13. Після цього подають інокулят від ІН-10 через трубу перетискування від ТП 4.5, вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух інокулятора.

Культивування продуцента здійснюють упродовж 24 год при температурі 35°C, рН 7, в аеробних умовах при перемішуванні 200 об/хв. В кінці культивування відбирають проби для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 4.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3,2 м³

В інокулятор ІН-21 об'ємом 3,2 м³ подають композицію А (від ДР 3.4.1), подають 13,5 л розчину композиції Б від ДР 3.4.2, який надходить самоплином зі збірника З-19. Вирощування продуцента проводять за рН 7,0, рН середовища до необхідного значення доводять титрувальними розчинами – 6%-ми розчинами соляної кислоти на натрію гідроксиду від ДР 2.1 та ДР 2.2 зі збірників З-11 та З-13. Після цього подають інокулят від ІН-15 через трубу перетискування від ТП

4.6, вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух інокулятора.

Культивування продуцента здійснюють упродовж 24 год при температурі 35°C, рН 7, в аеробних умовах при перемішуванні 200 об/хв. В кінці культивування відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 32 м³

У ферментер ФР-27 об'ємом 32 м³ подають простерилізоване в УБС-25 середовище (від ДР 3.5.1). Вирощування продуцента проводять за рН 7,0, рН середовища до необхідного значення доводять титрувальними розчинами – 6%-ми розчинами соляної кислоти на натрію гідроксиду від ДР 2.1 та ДР 2.2 зі збірників 3-11 та 3-13. Після цього подають інокулят від ІН-21 через трубу перетискування від ТП 4.7, вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух інокулятора.

Культивування клітин продуцента здійснюють упродовж 72 год при температурі 35°C, рН 7, в аеробних умовах при перемішуванні 200 об/хв. По закінченню біосинтезу відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та контролю кількості синтезованого цільового продукту – активність α -амілази 145,4 Од/мл.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Постадійний контроль виробництва амілосубтиліну *Bacillus subtilis* МК1 представлено у табл. 8.1.

НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
					Розділ 8. Контроль виробництва		
Розроб.		Сліпчук Т.О.					
Перевір.		Карлаш Ю.В.			Літ.	Арк.	Аркушів
Реценз.						65	14
Н. Контр.					Кафедра БТМ -5		
Затверд.		Стабніков В.П.					

Карта постадійного контролю виробництва амілосубтиліну

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
Кт1.1 Забір атмосферного повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	H=23 м
Кт1.2 Очищення від грубих домішок	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E=90%, тиск згідно паспорту
Кт1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Повітря після компресування	P=0,35 МПа, t=120-200°C
Кт1.4 Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=25-30°C, W=60-70%
Кт1.5 Підігрівання повітря	Підігріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	t=30-35°C
Кт1.6 Тонке очищення повітря	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	E=90-95%, тиск згідно паспорту
Кт1.7 Очищення повітря на індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	E=99,9995%
Кх2.1 Приготування 6% розчину HCl для підкислення поживних середовищ	Концентрація HCl	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=6%

Кх, Кт, Км 2.2 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для нейтралізації поживних середовищ	Концентрація NaOH, температура, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, термометр, таймер	Після приготування розчину, тиск і температуру перевіряють безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод	C=6%, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,1 МПа, t=120°C, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалці	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А для інокулятора 30 л	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,1 МПа, t=120°C, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 30 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А для інокулятора 400 л	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,1 МПа, t=120°C, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 400 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=40 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А для інокулятора 3,2 м ³	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,1 МПа, t=120°C, τ=30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 3,2 м ³	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	P=0,15 МПа, t=131°C, τ=1 год, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції А для ферментера 32 м ³	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=130°C, τ=5-7 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1 Підтримання колекційної культури <i>Bacillus subtilis</i> МК1	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=4°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.2 Отримання <i>Bacillus subtilis</i> МК1 на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, чашки Петрі з LB агаром, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=35°C, τ=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.3 Вирощування робочої культури <i>Bacillus subtilis</i> МК1 на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, пробірки з LB агаром, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=35°C, τ=24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування інокуляту в колбах на качалках	t=35°C, τ=24 год, ω=200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.5 Вирощування посівного	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура,	Термометр технічний, таймер, рН-датчик,	Під час вирощування інокуляту і в кінці	t=35°C, τ=24 год, рН 7,0, ω=200

матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л	pH, мікробіологічна чистота культури	тахометр, мікробіологічний контроль	культивування	об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 400 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, pH, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, pH-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=35°C, τ=24 год, pH 7,0, ω=200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 3,2 м ³	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, pH, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, pH-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	t=35°C, τ=24 год, pH 7,0, ω=200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 32 м ³	Культуральна рідина, температура, pH, тривалість культивування, концентрація амілази, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, pH-датчик, тахометр, хроматограф, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 4 години, концентрація амілази визначається після закінчення процесу культивування	t=35°C, τ=72 год, pH 7,0, ω=200 об/хв, C _a = 20,42 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль передбачає контроль стерильності поживного середовища та контроль чистоти культури, задля уникнення небажаної контамінації. Загальним методом вважається посів на поживні середовища. Для визначення чистоти культури додатково використовують мікроскоп.

Метод кількісного посіву досліджуваного матеріалу (в нашому випадку поживного середовища) на щільні поживні середовища застосовується найбільш часто. З приготованих серійних десятикратних розведень досліджуваної рідини або суспензії по 1 мл переносять у стерильні чашки Петрі (починаючи з більшого розведення, кожне розведення окремою піпеткою) і заливають розплавленим і охолодженим до 45-50 °С м'ясо-пептонним агаром – МПА (глибинний посів). Для перевірки на наявність грибів застосовується дещо інше середовище – сусло агар (СА). Для рівномірного змішування чашки злегка рухають по поверхні столу і після застигання агару поміщають в термостат. Після інкубації підраховують кількість життєздатних колоній, що вирости, і розраховують кількість життєздатних колоній на одиницю об'єму зразка з урахуванням розведення. Якщо посіви вирощували при 30 °С, то показником загального обсіменіння досліджуваного матеріалу є КМАФАнМ (або МАФАнМ) [23].

Для контролю чистоти культури, проводять суцільний посів газоном за допомогою шпателя. Для цього посівний матеріал наносять за допомогою петлі чи піпетки на поверхню поживного середовища біля краю чашки або у центрі її і потім шпателем розтирають його по всій поверхні середовища [23].

Якби наша культура була факультативним або облігатним анаеробом, посів можна проводити у товщу поживного середовища, розлитого у чашки Петрі. У цьому випадку у стерильну пусту чашку Петрі спочатку піпеткою вноситься бактеріальна суспензія у кількості 0,1 – 1 мл, а потім наливається 10 – 20 мл розплавленого і охолодженого до 50 – 55 °С середовища. Для перемішування мікробних клітин із середовищем чашку злегка похитують. Можна спочатку змішати у стерильній пробірці щільне поживне середовище, розплавлене і охолоджене, з невеликою кількістю матеріалу, а потім швидко

вилити вміст пробірки у чашку Петрі [23].

Щоб конденсаційна вода, яка утворюється, не заливала посіви, чашки Петрі перевертають догори дном і у такому положенні ставлять у термостат [23].

Мікроскопіювання проводять під світловим мікроскопом за допомогою імерсії. Для цього спочатку роблять мазок препарату [24].

Препарат-мазок для зафарбовування готується у декілька етапів [24]:

1. Виготовлення препарату.
2. Висушування мазка.
3. Фіксація мазка.
4. Зафарбовування мазка.

Для виготовлення препарату використовують предметні скельця – тонкі скляні пластинки розміром 76×26 мм із відшліфованими боками. Під час мікроскопування використовують покривні скельця товщиною 0,15–0,17 мм і розміром 18×18, 20×20, 18×24 мм. Скельця повинні бути чистими, знежиреними і завчасно підготовленими. Якщо скельце добре знежирене, то крапля води рівномірно розтікається на його поверхні, не утворюючи випуклих ділянок [24].

Висушування препарату виконують на повітрі або в термостаті. Підігрівати препарат не рекомендується, оскільки при цьому відбувається грубе згортання білків у результаті швидкої втрати вологи; при цьому клітини втрачають природну форму. Під час висушування препарат накривають скляним ковпаком, захищаючи від мух і попадання пилу. Фіксація висушеного препарату потрібна для забезпечення кращого присипання мікробних клітин до скла, а також для того, щоб убити мікроорганізми, оскільки мертві клітини легше зафарбовуються, ніж живі. Фіксацію препарату виконують над полум'ям спиртівки. Для цього предметне скло беруть за куточки великим і вказівним пальцями і, тримаючи мазком догори, повільно проводять скельце через полум'я не менш, ніж 3 рази. При цьому в сумі мазок повинен перебувати в полум'ї не більше 2 с. Тривала фіксація може змінити структуру мікробних клітин та їх форму. Якщо ж мазок недостатньо прогріли і погано зафіксували, він змивається зі скла при подальшій обробці [24].

Відрегулювавши освітлення мікроскопа, на предметний столик кладуть препарат і, закріпивши клемами предметне скло, проглядають його із слабким сухим об'єктивом. У центрі поля зору встановлюють потрібну ділянку препарату, піднімають тубус і обертанням револьвера переводять під нього імерсійний об'єктив. На препарат наносять краплину імерсійного масла. Використовуючи візуальне спостереження збоку, опускають тубус поворотом макрометричного гвинта до зіткнення лінзи з краплею і трішки її роздушують. Необхідно слідкувати за тим, щоб не зіпсувати лінзу об'єктива і не роздавити предметне скло. Після цього, дивлячись в окуляр, піднімають тубус макрометричним гвинтом до моменту появи зображення того предмета, який ви розглядаєте [24].

Щоб отримати чітке зображення, переходять до роботи з мікрометричним гвинтом, обертаючи його легкими рухами в той чи інший бік, але не більше, ніж на один повний оборот. Якщо під час повороту мікрометричного гвинта відчувається опір, значить, хід його пройдений до кінця. У цьому випадку повертають гвинт на один повний оборот назад, знову знаходять мікрокартинку з допомогою макрометричного гвинта і лише після цього знову переходять до роботи з мікрометричним гвинтом [24].

Після закінчення мікроскопування тубус піднімають, обертаючи макрометричний гвинт, препарат забирають, а фронтальну лінзу імерсійного об'єктива обережно витирають шматочком замші або чистої м'якої полотняної тканини, трішки змоченої в спирто-ефірній суміші або ксилолі. Не дозволяється залишати імерсійний об'єктив у маслі [24].

Для вивчення колоній мікроорганізмів, які вирости на щільних (густих) поживних середовищах і особливо для тривалого дослідження препаратів мікробів, користуються біноккулярними мікроскопами або біноккулярною насадкою, які дають стереозображення предмета і не так швидко втомлюють очі [2].

Культуру *B. subtilis* найчастіше за все вирощують на поживному або LB агарі [25, 62].

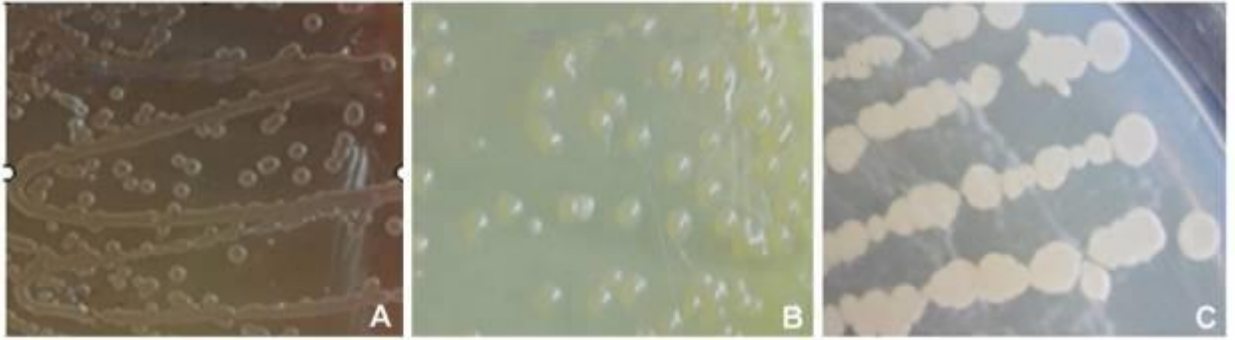


Рис.8.1.Культура *B. subtilis* на: А – курячому кров'яному агарі, В - TSA-агарі, що містить 5% фетальної телячої сироватки, С - поживному агарі [25]

Таблиця 8.1

Характеристика колоній *B. subtilis* на різних поживних середовищах[25]

Назва агару	Опис колонії бактерії
TSA-агар, що містить 5% фетальної телячої сироватки	сіро-біла, кругла, непрозора, нерівний край, гладкий, глянцева, колонія середнього розміру
LB агар	сіро-біла, кругла, непрозора, плоска, матова, колонія середнього розміру
Кролячий агар	сіро-біла, кругла, повністю гемолітична, непрозора, плоска, матова, колонія середнього розміру
Живильний агар	сіро-біла, кругла, непрозора, плоска, матова, колонія середнього розміру

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Оптичний (нефелометричний) аналіз біомаси широко застосовується в лабораторних мікробіологічних дослідженнях, оскільки він забезпечує швидке і точне вимірювання концентрації клітин в суспензіях і культуральних середовищах. [27].

Основою цього методу є вимірювання зменшення кількості світла під час його проходження через клітинну суспензію. У певних межах це в першу чергу спричинено розсіюванням світла на клітинах і пропорційно концентрації клітин.

Величина цього показника залежить від багатьох факторів (форми і розміру комірки, оптичних властивостей середовища, довжини хвилі падаючого світла тощо). Таким чином, нефелометричні методи придатні лише для спокійних мікроорганізмів, зростання яких рівномірно замутило середовище і не передбачає значних змін у формі або розмірі клітин, утворенні міцелію, плівки чи інших кластерів [27].

Поживні середовища для мікробних культур, у яких кількість клітин визначають за світлорозсіюванням, повинні бути оптично прозорими. Якщо помутніння середовища викликане випаданням в осад деяких солей, головним чином фосфатів, перед вимірюванням світлорозсіювання підкислюють його кількома краплями концентрованої соляної кислоти [27].

Зміни інтенсивності світла при проходженні через клітинну суспензію вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі, при якій поглинання світла клітинною суспензією мінімальне (зазвичай в діапазоні 540-650 нм). Наприклад, розсіювання світла суспензіями клітин у м'ясо-пептонному бульйоні або суслі найзручніше вимірювати за допомогою червоного фільтра, де оптична щільність таких середовищ мінімальна. Вищі концентрації клітин у культуральному середовищі призводять до вторинного розсіювання світла, що призводить до заниження результатів. Тому висококонцентровані суспензії слід розбавляти середовищем або водою перед вимірюванням світлорозсіювання. Неприпустимо розводити зразки одного і того ж живильного середовища різними рідинами, оскільки набухання і стискання клітин вплине на значення світлорозсіювання [27].

У деяких випадках щільність клітинних суспензій виражають нефелометричними показаннями. Однак більш поширеним є створення калібрувальної кривої залежності між величиною розсіювання світла та кількістю клітин або сухої біомаси в одиниці об'єму. Щоб створити стандартну криву, виконайте такі дії: вимірюють ступінь світлорозсіювання суспензій з різним вмістом клітин і одним із використаних методів визначають кількість

клітин або біомасу в кожній суспензії. Отриману залежність графічно відображають, відкладаючи на вертикальній осі значення ФЕК, а на горизонтальній – кількість клітин (г/л), що містяться в 1,0 мл суспензії або біомаси. Для шкірного мікроорганізму слід будувати свою калібрувальну криву [27].

8.2.2. Концентрація та активність амілази

Одним з найпоширеніших методів визначення білкових сполук – це метод Бредфорда, який передбачає додавання барвника кумасі [28].

Барвник Coomassie Brilliant Blue R-250 при розчиненні у фосфорній кислоті має червоно-коричневе забарвлення (аніонна форма), але при зв'язуванні з аргініном та гідрофобними амінокислотними залишками білка розвивається блакитне забарвлення ($\lambda_{\text{max}} = 595$ нм, катіонна форма). Отже, збільшення поглинання розчину при довжині хвилі 595 нм пропорційне кількості білка в розчині [29].

Метод полягає в додаванні барвника до розчину білка та вимірювання оптичної щільності. Отримані значення порівнюють з калібрувальною кривою, побудованою по білку з відомою концентрацією, найчастіше по бичачому сироватковому альбуміну (БСА) [29].

У порівнянні з методом Лоурі метод Бредфорда простіше, швидше і відрізняється більшою чутливістю за такої ж точності. Додає хороше значення концентрації білка в межах від 2 мкг/мл до 120 мкг/мл [29].

Матеріали та обладнання [29]:

Спектрофотометр, кювети, розчин БСА (10 мг/мл), розчин білка, що досліджується, барвник кумасі R-250, ортофосфорна кислота.

Розчини [29]:

Реагент Бредфорда. На 1л: 100 мг кумасі R-250 розчинити в 50 мл спирту і додати 100 мл ортофосфорної кислоти, довести до 1 л водою та профільтрувати через паперовий фільтр. Реагент дуже чутливий до білка (1-2 мкг/мл). Все має бути абсолютно чистим, інакше розчин посиніє та зіпсується. Чистий розчин має коричневий колір.

Методика [29]:

1. Довести обсяг зразка до 0,5 мл водою.
2. Додати 0,5 мл реагенту Бредфорда.
3. Перемішати і чекати на появу забарвлення (від 5 с, але не більше 30 хв).
4. Виміряти A595 в 1 мл кюветі.
5. Розрахувати концентрацію білка по калібрувальній кривій, побудованій за БСА.

Активність альфа-амілази вимірювали за методом Сомоджи-Нельсона з використанням розчинного крохмалю (2:5 вага:об'єм) як субстрату. Для одиниці амілолітичної активності передбачається така кількість ферменту, яка в строго певних умовах температури, рН і часу дії каталізує 1 г розчинного крохмалю (30% відведеного) до декстринів з різною молекулярною масою [29].

Коротко, 20 мл ферментного екстракту і 125 мл цитратного буфера рН 5 інкубували з 125 мл субстрату протягом 30 хв. Активність вимірювали шляхом розрахунку відновних цукрів, що виділяються при 600 нм [30].

8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену

Основним джерелом карбону в поживному середовищі є крохмаль. Найбільш поширені його реакції з йодом. Але також є доволі поширеним метод поляриметрії (перетворення крохмалю в цукор соляною кислотою).

Спочатку одержують надосад шляхом центрифугування культуральної рідини. До 5 мл супернатанту додають піпеткою 50 мл розчину 1,124 % соляної кислоти [31].

Колбу занурюють у киплячу водяну баню, покривають водою всю широку частину колби і витримують безперервне кипіння протягом 15 хв. Перші 3 хвилини обережно перемішуйте вміст круговими рухами, не знімаючи ванну. Через 15 хв вийміть колбу з бані, долийте холодною водою приблизно до 90 мл і швидко охолодіть до 20 °С. [31].

Для осадження білків і освітлення розчину додають 4-5 мл 4% розчину фосфорно-вольфрамової кислоти, перемішують вміст колби, доводять дистильованою водою, перемішують і фільтрують у суху колбу. Першу частину

фільтрату вилийте назад у лійку. Прозорий фільтрат поляризуйте в пробірці довжиною 200 мм. [31].

Знімають п'ять показань цукрового лічильника і визначають середнє значення. Допускається розбіжність між окремими показаннями цукроміра до 0,1 мм. [31].



Рис. 8.2. Загальний вигляд приладу Kjeltec Auto-1030-Analyzer [31]

Основним джерелом нітрогену виступають пептиди та амінокислоти яловичого екстракту. Амінокислоти за часту визначають методом ВЕРХ [31].

Для цього також попередньо одержують надосад. Хроматографічне розділення проводять на рідинному хроматографі Agilent 1200 ("Agilenttechnologies", США). Довжина колонки Zorbax AAA – 150 мм, внутрішній діаметр – 4,6 мм, діаметр зерна сорбенту – 3 мкм. Мобільна фаза А – 40 mM Na₂HPO₄, рН 7.8; В – ACN:MeOH:water (45:45:10, v/v/v). Режим розділення градієнтний із постійною швидкістю потоку 1,5 мл/хв. Температура термостата колонки – 40 °С. Вільні амінокислоти з наважки сировини екстрагували у віалі з додаванням водного розчину 0,1N кислоти хлористоводневої та витримували на ультразвуковій бані при 50 °С протягом 3 год. Суму вільних і зв'язаних амінокислот з наважки сировини екстрагували у віалі з додаванням водного розчину 6N кислоти хлористоводневої та поміщали в термостат при 110 °С. Гідроліз проводили протягом 24 год. 0,5 мл

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Згідно технологічної схеми виробничого біосинтезу препарату аміносубтиліну проводять допоміжні роботи (санітарна підготовка виробничих приміщень, підготовка та стерилізація обладнання та комунікацій, система підготовки аеруючого повітря, приготування та стерилізації поживних середовищ для підготування інокуляту та виробничого ферментування), ферментаційних технологічних процесів (одержання посівного матеріалу, культивування), та біосинтез аміносубтиліну.

Місця емісії рідких, твердих і газоподібних відходів представлені в таблиці 9.

Таблиця 9.1

Місця емісії твердих, рідких і газоподібних відходів, що потенційно виділяються на проектованому виробництві аміносубтиліну

Тип відходів	Назва відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Стадія виробництва	Приблизна кількість відходів за 1 цикл виробництва
Стічні води	1%-ий розчин каустичної соди	Натрій гідроксид	Миття обладнання та комунікацій	82500 м ³
Газоподібні	Відпрацьоване повітря з інокуляторів і ферментера	діоксид Карбону, клітини <i>Bacillus subtilis</i>	Культивування в інокуляторах 30,400, 3200 л та ферментері 32000 л	103245,12 м ³

НУХТ БТЕК 04.03.19 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
					Розділ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва					
Розроб.		Кравченко В.В.						Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Резніченко Ю.М.							79	6
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

	Біомаса продуцента після фільтрування	Клітини бацили	Післяферментаційна стадія	500 кг
Тверді	Пластикові тара для мийних засобів, пакувальні матеріали для компонентів поживного середовища	Поліетилен, поліпропілен	Допоміжні роботи, санітарна підготовка	-

*Тривалість процесу культивування складає 72 год. Аеруюче стерильне повітря подають в інокулятори з об'ємом культуральної рідини 18,95, 200, 1930 л і культивують послідовно 24 год, ферментер 19200 л зі швидкістю 1,2 л повітря на 1 л культуральної рідини за 1 хв. Розраховуємо об'єм повітря для аерації інокуляторів: $(18,95+200+1930) \cdot 1,2 = 2578$ л/хв. всього, враховуємо вирощування інокуляту 24 год: $2578(24 \cdot 60) = 3712320 \text{ л} = 3712,32 \text{ м}^3$. Ферментер: $19200 \cdot 1,2 = 23040$ л/хв., враховуємо 72 год культивування то: $23040 \cdot (72 \cdot 60) = 99533 \text{ м}^3$. Всього : $103245,12 \text{ м}^3$.

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

Біотехнологічні компанії генерують три типи стічних вод: промислові стічні води, побутові стічні води та атмосферні стічні води.

Середні за зміну витрати побутових стічних вод, що надходять від підприємства, $\text{м}^3/\text{зміну}$, обчислюють за формулою:

$$Q_e = q_e \cdot n = 2500 \text{ м}^3 \cdot 33 \text{ кг} = 82500 \text{ м}^3/\text{зміну}$$

де q_e – норма водовідведення в літрах на одиницю продукції, яку випускає підприємство (приймається $2500 \text{ м}^3/1 \text{ т}$ продукції);

n – кількість одиниць продукції що виробляється за зміну.

Середні за зміну витрати побутових стічних вод складають:

$$Q_n = q_n \cdot N = 0,025 \text{ м}^3 \cdot 8 = 0,2 \text{ м}^3/\text{зміну}$$

де q_n – норма відведення побутових стічних вод в л за зміну на одного робітника (приймаємо для холодного цеху 25 л за зміну на людину);

N – кількість робітників, що працюють у зміну.

Середні за добу витрати побутових стічних вод становлять:

$$Q_n = Q_{n'} \cdot N_{зм} \cdot 24/t = 0,2 \text{ м}^3 \cdot 3 \cdot 24/8 = 1,8 \text{ м}^3/\text{добу}$$

де $N_{зм}$ – кількість змін на добу (3).

t – тривалість однієї зміни (8 год)

Загальна витрата атмосферних стічних вод за рік орієнтовно приймається як в 5 разів менше за побутові стічні води:

$$Q_a = Q_n/5 = 0,2 \text{ м}^3/5 = 0,04 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Загальні витрати стічних вод за добу, що утворюються на підприємстві, становлять:

$$Q = Q_e + Q_n + Q_a = 82500 + 1,8 + 0,04 = 82502 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Згідно загальних витрат пропонується реактори типу SBR (Sequencing Batch Reactor) або РППД/РЦД (реактор послідовної та періодичної (циклічної) дії) компанії очисних споруд Xylem (OMNIFLO, США)– це біологічні реактори, технологічна схема роботи яких полягає у використанні одного і більше біологічних реакторів із функціями аеротенка та вторинного відстійника із чітко визначеними циклами роботи [63].

В одному басейні реактора система SBR виконує вирівнювання, аерацію та освітлення в певній послідовності. У звичайному процесі безперервного потоку для досягнення однакових цілей очищення потрібні кілька структур. Один цикл для кожного реактора складається з таких окремих періодів: заповнення, реакція, осідання, декантація. Цей підхід є унікальним у обробці припливних потоків, а також широкого діапазону органічних навантажень і промислових забруднювачів. Система OMNIFLO SBR ідеально підходить для застосувань, де необхідні нітрифікація, денітрифікація та біологічне видалення фосфору[64].

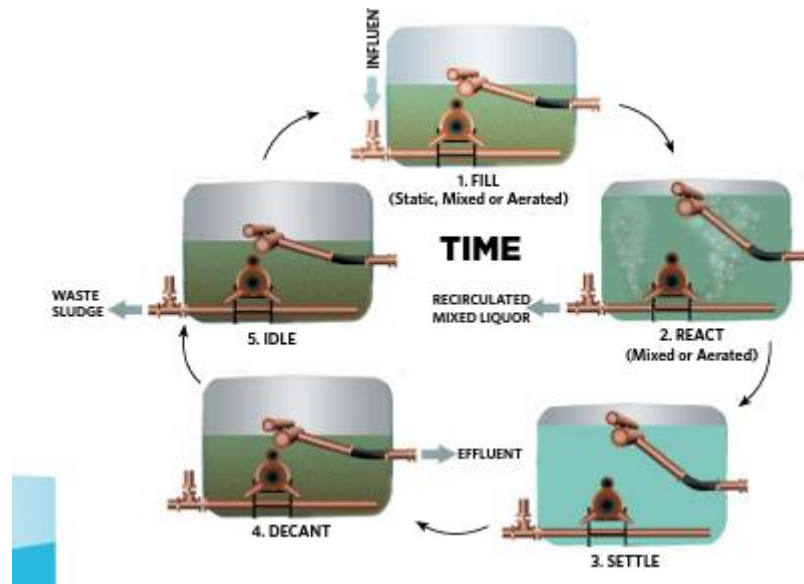


Рис.9.1 Етапи очищення стічних вод системою OMNIFLO SBR [64]

Кожна установка включає три резервуари SBR із системами струминної аерації для змішування та аерації змішаного розчину. Кожен басейн містить плаваючий декантатор, що виключає тверді частки, для відводу стоків, а також вхідний колектор для рівномірного розподілу потоку в товщі мулу. У кожному басейні також розташовані шламіві насоси для відведення осаду. Конструкція також включає резервуар після вирівнювання, який накритий для мінімізації росту водоростей у стічній воді, а також аеробний реактор. Резервуар вирівнювання стоків включає занурювальний насос для перекачування стоків SBR до фільтрів і резервуарів для контакту з хлором. Басейн аеробного в котла включає насоси для грубої бульбашкової аерації та перекачування мулу. Вхідна стічна вода проходить через тонкі сітки перед SBR. Система SCADA забезпечує дистанційний моніторинг і керування.

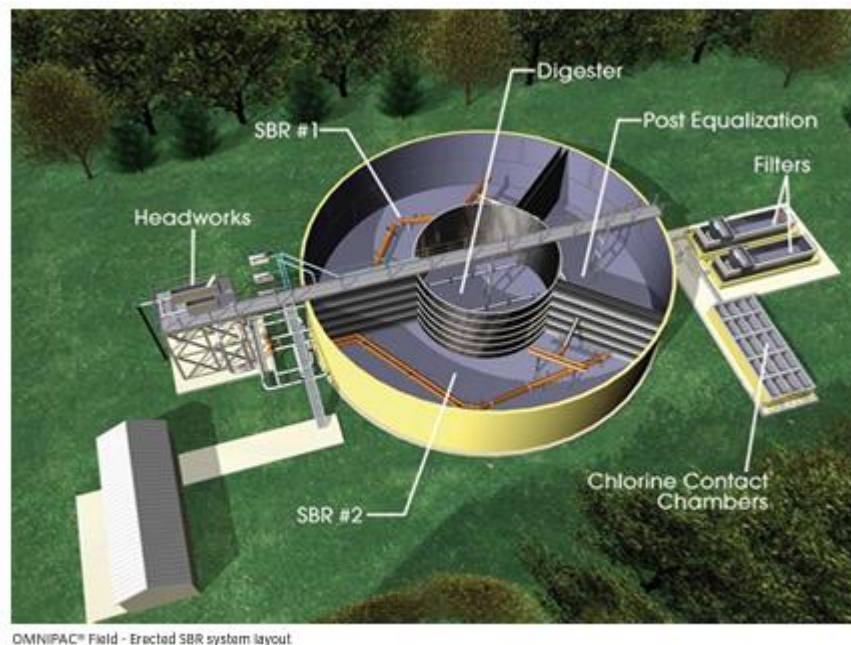


Рис.9.2. Схема установки біологічного очищення OMNIFLO SBR [64]

9.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

Згідно з утвореними атмосферними відходами пропонується біоскубери продуктивністю до 120 000 м³/добу фірми „Фудзі касуй кото” (Японія). Для стабілізації дії активного мулу і поліпшення процесу його регенерації до суспензії додають активоване вугілля. В установках очищення використовують активний мул із станцій очищення стічних вод. Повітря з колектора аспіраційних газів попередньо обезпилують в циклоні, після чого подають в реактор 1 з барботажним скруббером 2, де відбувається тонке очищення суспензією активного мулу [65].

Концентрацію активованого вугілля підтримують постійною шляхом внесення відповідних доз вугілля при заміні активованого мулу, який відновлюють 1 раз на добу (в кількості 5 м³). Використаний активний мул обробляють на вмонтованій віджимній центрифугі.

Установку виводять на робочий режим на протязі 20 діб з потенціальним збільшенням часу добової експлуатації до розрахункових 17 год. ХПК поглинача через 60 діб після початку експлуатації 200...250 мг/л. Аерацію реактора проводять повітрорудкою під час перерв у роботі [65].

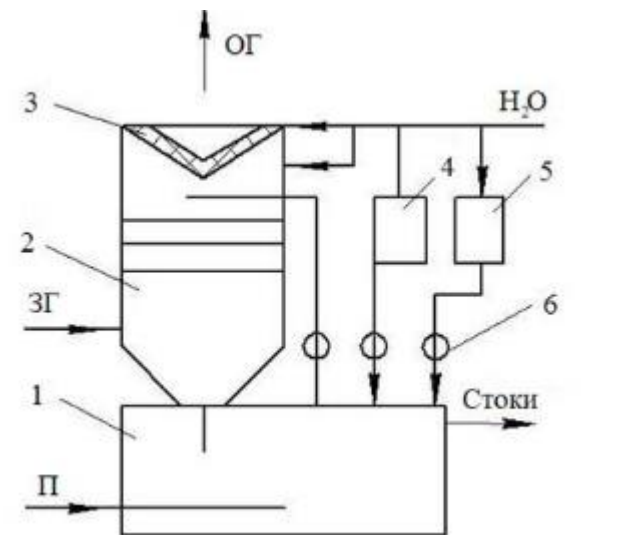


Рис.9.3. Схема установки для очищення аспіраційних газів стічними водами (Японія): 1 – реактор; 2 – абсорбер; 3 – краплиновловлювач; 4 – ємність для активованого вугілля; 5 – ємність для живильних речовин; 6 – насоси [65].

Таблиця 9.2

Технічна характеристика установки для очищення аспіраційних газів стічними водами (Японія)

Параметр	Величина
Продуктивність, м ³ /год.	126000
Температура газу, °С	10...35
Концентрація в поглиначі, мг/л:	
завислих речовин	5000...7000
активованого вугілля	500...1000
Витрати, кг/місяць:	
фосфорної кислоти	50
порошкоподібного активованого вугілля	135
технічної води, м ³ /місяць	210

9.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Під час фільтрування культуральної рідини виходить приблизно 500 кг біомаси продуцента. Економічно вигідно піддати її спалюванню.

Вся пластикова тара миється, сушиться і сортується, і передається на підприємство, яке забезпечує подальшу їх переробку.

**РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ,
ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА**

1. Міжнародні стандарти ISO серії 9000, 10000, 114000 та SA 8000
2. ДСТУ ISO 9000 – 2001 Системи управління якістю. Основні положення та словник. Вимоги.
3. ДСТУ 8115:2015 Біотехнологія. Методи попередження контамінації культур клітин
4. ДСТУ 7899:2015 Препарати ферментні для спиртового виробництва. Методи визначання органолептичних, фізико-хімічних і мікробіологічних показників
5. ДСТУ 5069:2008 Препарати ферментні для спиртового виробництва. Правила приймання, зберігання та методи відбирання проб
6. ДСТУ 4457:2005 Препарати ферментні. Загальні технічні умови
7. ДСТУ 8453:2015 Препарати ферментні. Методи визначення амілолітичної активності
8. ДСанПіН 9.9.5-153-2008. Державні санітарні норми і правила "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами"
9. ВПНРМ 512-88 . Відомчі виробничі норми витрати матеріалів на монтажні і спеціальні будівельні роботи. Монтаж технологічного устаткування підприємств мікробіологічної промисловості
10. ДСТУ 8056:2015 Реактиви та особливо чисті речовини. Методи готування розчинів індикаторів
11. Закон України від 23.05.2017 № 2059-VIII Про оцінку впливу на довкілля

					НУХТ БТЕК 04.03.30 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			Розділ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					85	2
Реценз.						Кафедра БТМ 85		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

12. Наказ від 14.01.2020 № 52 Про затвердження гігієнічних регламентів допустимого вмісту хімічних і біологічних речовин в атмосферному повітрі населених місць

13. ДСТУ EN 12460:2019 Біотехнологія. Великосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибирання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику (EN 12460:1998, IDT)

14. ДСТУ 4175:2003 Якість води. Оцінювання здатності до полного аеробного біологічного розкладання органічних сполук у водному середовищі. Метод аналізування біохімічного споживання кисню (метод закритої склянки) (ISO 10707:1994, MOD)

ЛІТЕРАТУРА

1. Дехтяренко Н. В. Виробництво ферментних препаратів в Україні. *Наукові вісті Національного технічного університету України Київський політехнічний інститут*. 2013, (3): 48-58.
2. Тіпанов В. В., Ткаленко С. І. Сучасна структура світового ринку біотехнологій. *Стратегія економічного розвитку України*. 2018, (42): 178-187.
3. Басова К. О., Гончарко М. Д., Зубарева І. М. Актуальність виробництва ферментних препаратів біотехнологічного походження. Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. 2019, 6: 75-76.
4. Варбанець Л. Д., Авдіюк К. В., Борзова Н. В. Мікробні α -амілази: виділення, властивості, практичне застосування. *Біотехнологія*. 2008, 1(2): 39-51
5. Шпирко Т. В. Розробка біотехнології переробки зернової сировини у харчові добавки /Автореф. дис. к-т техн. наук. Одеса, 2003. 18 с.
6. Альфа-амилаза общая. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://xn--d1aacvtbold.xn--p1ai/services/biokhimiya-krovi-fermenty/alfa-amilaza-obshchaya/>
7. Mikawlawng K. *Aspergillus* in biomedical research. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. 2016. P. 229-242. doi: 10.1016/B978-0-444-63505-1.00019-1
8. Tiwari S. P., Srivastava R., Singh C. S., Shukla K., Singh R. K., Singh P., et al. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J Global Biosci.* 2015, 36(3): 1886-1901.
9. Eck P. Recombinant DNA technologies in food. In *Biochemistry of Foods*. Academic Press. 2013. P. 503-556. doi: 10.1016/B978-0-08-091809-9.00013-3
10. Ghani M., Ansari A., Aman A., Zohra R. R., Siddiqui N. N., Qader S. A. U. Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pak J Pharm Sci.* 2013, 26(4): 691-697.
11. Elsayed E. A., Omar H. G., Galil S. A., El-Enshasy H. A. Optimization of fed-batch cultivation strategy for extracellular α -amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* in submerged culture. *JSIR.* 2016, 75: 480-486.
12. Shabbiri K., Adnan A., Noor B., Jamil S. Optimized production, purification

and characterization of alpha amylase by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using bio-statistical approach. *Annals of microbiology*. 2012, 62(2): 523-532. doi: 10.1007/s13213-011-0286-6

13. Benabda O., M'hir S., Kasmi M., Mnif W., Hamdi M. Optimization of protease and amylase production by *Rhizopus oryzae* cultivated on bread waste using solid-state fermentation. *Journal of Chemistry*. 2019, 2019. doi: 10.1155/2019/3738181.

14. Ali E. H., El-Nagdy M. A., Al-Garni S. M., Ahmed M. S., Rawaa A. M. Enhancement of alpha amylase production by *Aspergillus flavus* AUMC 11685 on mandarin (*Citrus reticulata*) peel using submerged fermentation. *European Journal of Biological Research*. 2017, 7(3): 154-164. doi: 10.5281/zenodo.818271

15. Kamaraj M., Subramaniam D. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation using cassava. *Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol.* 2020, 8(6): 82-87. doi: 10.7324/JABB.2020.80613

16. Sahnoun M., Kriaa M., Elgharbi F., Ayadi D. Z., Bejar S., Kammoun R. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: optimization of culture conditions. *International journal of biological macromolecules*. 2015, 75: 73-80.

17. Ahmed S. A., Abdella M. A., El-Sherbiny G. M., Ibrahim A. M., El-Shamy A. R., Atalla S. M. Application of one-factor-at-a-time and statistical designs to enhance α -amylase production by a newly isolate *Bacillus subtilis* strain-MK1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, 22: 101397. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101397

18. Sankaran K., Ravikumar S. Enhanced production and immobilization of alpha amylase using recombinant *Bacillus subtilis* (MTCC 2423). *International Journal of Current Research*. 2011, 2(1): 176-181.

19. Виробництво основних видів промислової продукції [Електронний ресурс].

Режим

доступу:

https://ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2006/pr/prm_ric/prm_ric_u/vov2005_u.html

20. Патент 35247. Спосіб одержання спиртових бражок із крохмалевмісної

сировини/ Жолнер І. Д., Самойліченко Р. В., Артюхов В. Я., Сизько В. Б., Жихарєв Ю. В., Сікач Л. П., Марінченко В. О., Циганков П. С., Гулий І. С., Олійнічук С. Т., Сосницький В. В., Домарецький В. А., Шиян П. Л., Королюк К.Є. Опубл.16.06.2003.

21. Ahmed S. A., Abdella M. A., El-Sherbiny G. M., Ibrahim A. M., El-Shamy A. R., Atalla S. M. Application of one-factor-at-a-time and statistical designs to enhance α -amylase production by a newly isolate *Bacillus subtilis* strain-MK1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, 22: 101397. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101397.

22. Bano S., Qader S. A. U., Aman A., Syed M. N., Azhar A. Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech*. 2011, 12(1): 255-261. doi: 10.1208/s12249-011-9586-1.

23. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tgw1916.net/Bacillus/subtilis.html>

24. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.pesticidy.ru/active_substance/bacillus_subtilis

25. *Bacillus Subtilis* under the Microscope. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://blog.microscopeworld.com/2015/06/bacillus-subtilis-under-microscope.html>

26. Naresh S., Shuit S. H., Kunasundari B., Peng Y. H., Qi H. N., Teoh Y. P. Immobilization of Cellulase from *Bacillus subtilis* UniMAP-KB01 on multi-walled carbon nanotubes for biofuel production. *IOP conference series: materials science and engineering*. 2018, 318(1): 012008. doi: 10.1088/1757-899X/318/1/012008

27. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sglab.com/product/columbia-blood-agar-5-defibrinated-horse-blood-contact-plate/>

28. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.gettyimages.com/detail/photo/bacilli-rod-shaped-bacteria-400x-at-35mm-royalty-free-image/139820129?adppopup=true>

29. Ben David N., Mafi M., Nyska A., Gross A., Greiner A., Mizrahi B. *Bacillus*

- subtilis* in PVA Microparticles for Treating Open Wounds. *ACS omega*. 2021, 6(21): 13647-13653. doi: 10.1021/acsomega.1c00790
30. Bartolini M., Grau R. Assessing Different Ways of *Bacillus subtilis* Spreading over Abiotic Surfaces. *Bio-protocol*. 2019, 9(22): e3425. doi: 10.21769/BioProtoc.3425
31. Ng, W. Possible odour-mediated attraction of flies to *Bacillus subtilis* NRS-762 stationary phase culture. *PeerJ PrePrints*. 2015: e1726. doi: 10.7287/PEERJ.PREPRINTS.541
32. 30000L Commercial Fermenter. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.brewhermann.com/productinfo_241.html
33. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
34. Ю.М. Пенчук. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс]: Конспект лекцій для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної та заочної форм навчання / Ю.М. Пенчук. – К.: НУХТ, 2018. –115 с.
35. «Стериокс» (Baltiachemi) [Електронний ресурс] режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/sterioks-baltiachemi-kiev#tab-custom1>
36. Засіб мийний універсальний з ароматом морської свіжості ТМ "SUPER WASH" [Електронний ресурс] режим доступу: <https://varus.ua/chistyaschij-sprej-super-wash-anti-zhir-500-ml>
37. Дезінфекційний засіб «ДЕЗаль» [Електронний ресурс] режим доступу: <https://prozorro.gov.ua/tender/UA-2020-05-19-003401-c>
38. Засіб для дезінфекції рук та шкіри спиртовмісний "SterillPlus" [Електронний ресурс] режим доступу: <https://pn.com.ua/md/4804684/>
39. Засіб дезінфекційний Dezoquatium 10 [Електронний ресурс] режим доступу: <https://ua.papyrus.com.ua/catalog/view/243183/>
40. Установки непрерывной стерилизации ЖПС [Електронний ресурс].

Режимдоступу:<https://thelib.info/tehnologii/3087954-ustanovki-nepreryvnoj-sterilizacii-zhps/>.

41. Мікробні α -амілази: виділення, властивості, практичне застосування / Л. Д. Варбанець, К. В. Авдіюк, Н. В. Борзова // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 2. — С. 39-51.

42. Карлаш Ю. В., Омельчук Є. О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Ю. В. Карлаш, Є. О. Омельчук. — К.: НУХТ, 2019. — 252 с.

43. Vano S., Qader S.A.U., Aman A. Purification and Characterization of Novel α -Amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech. 2011, 12(1): 255–261. doi:10.1208/s12249-011-9586-1

44. Вентилятор відцентровий Dundar CM 21.2 [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://www.ventilation-ukraine.com.ua/dundar-cm21.2>.

45. Матеріал для фільтрації повітря[Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://xn----8sbnoajtadb0ce9a3a8tc.xn--j1amh/%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B5%D1%80%D1%96%D0%B0%D0%B%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D1%84%D1%96%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97-%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D1%96%D1%82%D1%80%D1%8F/#:~:text=%D0%93%D1%80%D1%83%D0%B1%D0%B5%20%D0%BE%D1%87%D0%B8%D1%89%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F&text=%D0%A6%D0%B5%20%D0%BF%D0%B5%D1%80%D0%B2%D1%96%D1%81%D0%BD%D0%B5%20%D0%BE%D1%87%D0%B8%D1%89%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%B2%20%D1%81%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%B0%D1%85,%D0%BC%D0%B0%D1%88%D0%B8%D0%BD%20%D0%B2%20%D1%83%D0%BC%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%85%20%D0%B2%D0%B5%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D1%97%20%D0%B7%D0%B0%D0%BF%D0%B>

[8%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%96.](#)

46. Поршневої воздушний компресор ПКС [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://kms-market.com.ua/p92994945-porshnevoj-vozdushnyj-kompressor.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_term=&utm_content=g&google_ad=593783333944&utm_campaign=%D0%A2%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F%20%D0%9A%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%81%D0%BE%D1%80%D1%8B&gclid=Cj0KCQjwk5ibBhDqARIsACzmgLSNt5IMouf7bFG20Mo4zxjvZljLY9IR8Sh9-tJbNV811Vez8m627uYaAizBEALw_wcB .

47. Підготовка повітря [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://www.crownwell-compressor.com.ua/main-pidhotovka-povitrya.html>.

48. ПОВІТРОЗБІРНИК (РЕСИВЕР) 750 Л. [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://k-m-s.all.biz/uk/povitrozbirnyk-resyver-750-l-g7301801> .

49. Водяной нагреватель Вентс НКВ 250-4 [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://olvent.ua/vents-nkv-250-4/?gclid=Cj0KCQjwk5ibBhDqARIsACzmgLS9uGgqOpzHaybdYztZRgaZE_qSVuzRS2QkoFOvJRgTWshU7DeS-BgaAvxmEALw_wcB .

50. Базальтовый рукавный фильтр [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://www.aff.com.ua/bazaltovyi-rukavnyi-filtr> .

51. Патронні Фільтри Типу ФПІ-2А [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://prom.ua/ua/p936122717-patronnye-filtry-tipa.html> .

52. Реактор мобильный РС-30 [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://promvit.com.ua/reaktor-mobilnyj-rs-30/> .

53. Дозатор спіральний для рідин NPL-50-201 Hualian [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://cicada.in.ua/dozator-spiralnij-dlya-ridin-npl-50-201-hualian?gclid=Cj0KCQjwk5ibBhDqARIsACzmgLRCVXnBq0EjLxccc9kqq0PfozlzySPU1RIEdalOmW11nUwp5xKJ9TDUaAs7eEALw_wcB .

54. Ваги технічні ВТА-60/3-7 [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://www.ppr.com.ua/catalog/vahy-tekhnichni/vta-60-7>.

55. Ємність ЦКТ 400 літрів (циліндро-конічний танк ферментер, ЦКТ для

пива [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://obogrevaka.com.ua/ua/p1141944920-emkost-tskt-400.html> .

56. ССТ-SHP3-3000DE: Цилиндрически-конический универсальный ферментер 3000/3300 литров 3.0 бар (неизолированный / изолированный) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://eshop.czechminibreweries.com/ru/product/cct-shp3-3000de/>.

57. Ваговий дозатор ковшовий ТОП ДК-1 для сипучих продуктів [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kiy-v.ua/ua/vesovoj-dozator-kovshevoj-top-dk-1-dlja-sypuchih-produktov.html> .

58. Промышленный реактор химической облицовки из титана 20 м³ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://russian.alibaba.com/product-detail/20m3-Industrial-titanium-cladding-chemical-reactor-1600280511284.html> .

59. Відцентрові насоси загального застосування [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/vidcentrovi-nasosy-zagalnogo-zastosuvannya/> .

60. Гидростатический пастеризатор и гидростатический стерилизатор непрерывного действия: самые гибкие системы непрерывного действия пастеризации/стерилизации на рынке [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://steritech.eu.com/ru/systeme-en-continu/chp-et-chs/> .

61. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для здобувачів вищої освіти освіт. ступ. «бакалавр» спец.162 ««Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» ден. форми навч./ уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2022. – 79 с.

62. Naresh S., Shuit S. H., Kunasundari B., Peng Y. H., Qi H. N., Teoh Y. P. Immobilization of Cellulase from *Bacillus subtilis* UniMAP-KB01 on multi-walled carbon nanotubes for biofuel production. IOP conference series: material science and engineering. 2018, 318(1): 012008. doi: 10.1088/1757-899X/318/1/012008

63. SBR технології. Екополімер [Електронний ресурс] режим доступу:
<http://www.ecopolymer.kh.ua/technology/sbr/>
64. OMNIPAC® SBR Field-Erected Treatment System [Electronic resource]
access mode: <https://www.evoqua.com/en/evoqua/products--services/aerobic-wastewater-treatment/aerobic-systems/omnipac-sbr-field-erected-systems/>
65. Біохімічні реактори [Електронний ресурс] режим доступу:
https://web.posibnyky.vntu.edu.ua/iebmd/severin_priodoohoronni_tehnologii/6-6.html