

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

**Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Біотехнології і мікробіології**

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 20__р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

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

«__» _____ 20__р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: «Культивування *Bacillus subtilis* для одержання пробіотичного
препарату Біоспорин»

Виконав: здобувач 3 курсу, групи 1 ск

_____ Ремінна Рената Олегівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Карлаш Юрій Васильович _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (підпис)

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет): Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра: Біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь: бакалавр

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

“28” _____ жовтня _____ 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____ Ремінна Рената Олегівна _____

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Bacillus subtilis* для одержання пробіотичного препарату Біоспорин» _____

керівник роботи Карлаш Юрій Васильович доцент, к.т.н.

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2021 року

3. Вихідні дані до роботи: геометричний об'єм ферментера – 1м³; коефіцієнт заповнення ферментера – 0,6; цільовий продукт – Біоспорин; біологічний агент – *Bacillus subtilis*

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

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту, РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми, РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми, РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

технологічна схема виробництва Біоспорину формату А1 - 1 аркуш, апаратурна схема виробництва Біоспорину формату А1 - 1 аркуш

Зміст

РЕФЕРАТ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	9
РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента.....	13
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування.....	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	20
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту.....	21
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	24
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	30
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	30
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	30
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	31
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	32
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	34
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	34
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера...34	
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	37
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	38
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	40
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	41
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	45
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	55
7.1. Карта постадійного контролю.....	55
7.2. Мікробіологічний контроль.....	66
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	67

7.3.1. Концентрація біомаси.....67

7.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....68

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....71

ГРАФІЧНА ЧАСТИНА

Схема біосинтезу цільового продукту (у відповідному підрозділі 2.4).

Технологічна схема виробництва

Апаратурна схема виробництва

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва пробіотичного препарату Біоспорин культивуванням штаму *Bacillus subtilis*. Біоспорин широко застосовується для корекції порушень мікрофлори (дисбактеріоз), викликаних нераціональним застосуванням антибіотиків, порушенням харчування, перенесеними інфекційними захворюваннями, для профілактики і лікування гострих кишкових інфекцій.

Розрахована потужність його виробництва становить 86,68 м³ культуральної рідини. Технологія виробництва субстанції складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу), що наведені в технологічній та апаратурній схемах. Дипломний проект викладений на 74 ст. друкованого тексту, містить 11 таблиць, 3 рисунка і складається з реферату, вступу, семи розділів, списку використаної літератури (38 джерел) та графічної частини.

Ключові слова: біоспорин, штам-продуцент, мікроорганізми *Bacillus subtilis*, меляса, біосинтез, виділення, біомаса.

ВСТУП

Актуальність теми. Зміни, що відбулися останнім часом кардинальні перетворення середовища існування, урбанізація умов життя, зміни структури і якості їжі, води і повітря, включаючи мікробно-антигенну контамінацію, обумовлюють дезадаптаційні порушення гомеостазу у дедалі більшої кількості людей, що зачіпають перш за все функції імунної та нейроендокринної систем, що забезпечують стійкість організму до стресорів, в тому числі інфекційних, соматичних, онкологічних та інших хвороб. На тлі таких гострих і хронічних хвороб часто розвивається дисбактеріоз.

Лікування, що проводиться при дисбактеріозах, здійснюється комплексно з урахуванням змін в процесі травлення, моторних функцій кишечника, вироблення і засвоєння вітамінів, макро- і мікроелементів, а також порушень нормофлори кишечника і стану реактивності організму.

В даний час, традиційно існував дефіцит бактерійних і біопрепаратів в основному знятий зусиллями нових промислових структур. більш того, крім таких «знайомих» лікарських препаратів, як Біфідумбактерин, Лактобактерин, Колібактерин і Біфікол, з'явилося безліч нових. [1,2].

Особлива увага приділяється такому лікарському про біотичному препарату, як Біоспорин. Його основу складають мікроорганізми *Bacillus subtilis* і *Bacillus licheniformis* в вегетативних і спорових формах. Це лікарський препарат, який був розроблений фахівцями інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

З 1996 р. він випускається у флаконах, а з 2003 р. Біоспорин випускається також і в таблетках.

НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ремінна Р.О.				Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						7	2
Реценз.	Стойко В.І.					ДКафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Однак, з огляду на значну ефективність і в зв'язку з цим певну привабливість Біоспорину, використання таких традиційних форм його прийому, є недостатнім. Тому розширення асортименту лікарських форм Біоспорину правомірно і актуально. Особливо в цьому відношенні можуть бути значущими відповідні лікарські форми з пролонгованим ефектом.

Хоча додаткові економічні витрати, пов'язані з виробництвом таких продуктів, поки не сприяє подальшому розвитку в їх виробництві.

Новизна: Обраний для виробництва пробіотиків штам *B. subtilis* 1.1, на відміну від штамів, які наразі використовуються, виявляє не лише антагоністичну активність відносно патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, а й продукує широкий спектр гідролітичних ферментів та сполуку каротиноїдної природи, що робить його перспективним компонентом з пробіотичними та провітамінними властивостями. [3,4].

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Серед пробіотичних препаратів, що випускаються в Україні і за кордоном, на особливу увагу заслуговує Біоспорин, основу якого складають спорові і вегетативні форми *Bacillus subtilis* 3 (ВКПМNB-2335) і *Bacillus licheniformis* 31 (ВКПМNB-2336). Лікарський препарат Біоспорин розроблений і запатентований ІМВ ім. Д. К. Заболотного НАН України [5].

Препарат Біоспорин являє собою ліофільно висушену мікробну масу живих бактерій з додаванням сахарозо-желатинового середовища. Препарат випускають в ампулах і флаконах.

Якісний та кількісний склад

Діючі речовини: одна доза Біоспорину містить живих мікробних клітин *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 та *Bacillus licheniformis* УКМ В-5514- 1,1-109 - 10-109.

Допоміжні речовини: сахароза (або цукор дрібнокристалічний), желатин, натрію хлорид.

Форма випуску. Порошок для оральної суспензії.

Основні властивості:

кристалічна або пориста ліофілізована маса живих мікробних клітин *Bacillus subtilis* УКМ В-5007 і *Bacillus licheniformis* УКМ-5514 від світло-сірого до бежевого або темно-сірого кольору (можливо з світло- або темно-коричневим відтінком), специфічного запаху; солонкуватого смаку.

					НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 1	Літ.	Арк.	Акрушіє
Розроб.	Ремінна Р.О.						9	4
Перевір.	Карлаш Ю.В.							
Реценз.	Стойко В.І.							
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							
						Кафедра БТМ		

Д

Два штаму - *B. subtilis* і *B. licheniformis*, що входять в Біоспорин, доповнюють один одного по спектру антагоністичної активності, продукції ферментів і амінокислот, не пригнічують при цьому резидентні мікроорганізми.

Активність препарату проявляється щодо кандід, стафілококів, кампілобактерій, в тому числі і антибіотикостійких. При цьому антагоністична активність біоспорину значно вище в порівнянні з Бактисубтілом, Цереобіогеном і Ентерогерміном

Біоспорин широко застосовується для корекції порушень мікрофлори (дисбактеріоз), викликаних нераціональним застосуванням антибіотиків, порушенням харчування, перенесеними інфекційними захворюваннями, для профілактики і лікування гострих кишкових інфекцій.

Показання до застосування препарату біоспорин наступні:

- гострі кишкові інфекції (ГКІ) легких і середніх форм, а також важких форм (у пацієнтів з протипоказаннями до антибіотикотерапії), викликаних патогенними і умовно-патогенними (в т.ч. стійкими до антибіотиків) мікроорганізмами (*Salmonellaspp.*, *Shigellaspp.*, ентеропатогенних *E. coli*, *Proteusspp.*, *Staphylococcusspp.*, *Candidaspp.*);
- осіб, які перенесли ГКІ (у разі виділення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, а також при дисфункції кишечника); з метою корекції мікрофлори кишечника (при дисбактеріозах, що виникли внаслідок антибіотикотерапії або інших причин);
- з метою профілактики гнійно-септичних ускладнень в післяопераційному періоді;
- в гінекологічній практиці: при вульвовагінальному кандидозі у жінок репродуктивного віку, в т.ч. вагітних; при бактеріальному вагінозі (з метою реабілітації після закінчення курсу антибактеріальної терапії);
- в стоматологічній практиці: при хронічному рецидивному стоматиті у дітей.[6].

Механізм лікувально-профілактичної дії біоспорину

У літературі описаний можливий механізм лікувально-профілактичної дії біоспорину.

Вважається, що після прийому препарату мікробні клітини починають функціонувати, надаючи пряму бактерицидну дію на патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, і опосередковане - шляхом активації специфічних і неспецифічних систем захисту макроорганізму.

Є дані, що препарат за рахунок імуномодуляції робить позитивний вплив на імунну систему людини, підвищуючи неспецифічну резистентність до інфекційних захворювань (включаючи кишкові інфекції бактеріальної та грибкової природи) за допомогою індукції ендогенного інтерферону, стимуляції фагоцитарної активності лейкоцитів крові, а також синтезу імуноглобулінів.

Бактеріальні клітини пробіотика активно продукують ферменти, амінокислоти, антибіотичні речовини та інші фізіологічно активні субстрати, беручи участь в травленні і доповнюючи комплексне лікувально-профілактичну дію препарату

Біоспорин має виражену антиалергенну і детоксикаційну дію. Ці ефекти пояснюються як імуномодулюючими властивостями, так і синтезом мікроорганізмами *B.subtilis* і *B.licheniformis* ряду замінних і незамінних амінокислот, вітамінів, ферментів (протеїнази, амілази, ліпази, целюлази і ін.) і інших біологічно активних речовин в кишечнику, асимілюються макроорганізмом, а також зменшенням або повним припиненням освіти і всмоктування в шлунково-кишковому тракті продуктів гнильного бродіння за рахунок підвищення ферментолізу їжі і її засвоюваності.

Відзначаючи різноманітні механізми лікувально-профілактичної дії препаратів з бацил, важко стверджувати, які з них є головними, а які - другорядними. При різних гострих і хронічних захворюваннях шлунково-кишкового тракту, що реєструються у людини і тварин, терапевтична дія в одних випадках може досягатися переважно за рахунок антагоністичних властивостей бацил, в інших - за рахунок продукції ними ферментів, по-третє -

за рахунок активації захисних реакцій. Слід вважати, що участь в процесі одночасно приймають кілька факторів.

Отже, лікувально-профілактичну дію біоспорину обумовлено комплексом його властивостей, що впливають як на макроорганізм в цілому, так і на патогенну і умовно-патогенну мікрофлору[7].

Препарат має досить широким спектром антагоністичної дії. Це пов'язано з тим, що крім високих концентрацій мікроорганізмів в терапевтичній дозі, не менше 50% мікроорганізмів представлені у вигляді спорової форми бактерій. Останнє забезпечує високу виживаність в шлунку і початкових відділах тонкої кишки з кислою реакцією середовища і вираженою ферментативної активністю. Крім того, препарат чинить додатковий антимікробну дію за допомогою «популяційного тиску» - конкурентного витіснення патогенних і умовно-патогенних бактерій з шлунково-кишкового тракту

Відсутність антагонізму препарату в цілому та складових його мікроорганізмів, зокрема по відношенню до нормальної мікрофлори.

Шлунково-кишкового тракту людини, а також до бактерій, які є основою біфідум-, і лактобактерій, дозволяє використовувати біоспорин для санації кишечника як самостійно (що краще при інфікуванні або підозрі на нього), так і в поєднанні з відповідними біопрепаратами (наприклад, з БІФІДУМБАКТЕРИН і ін.) в стадії реконвалесценції або при хронічних дисбактеріозах [7,8].

РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента

2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування

В даний час при відборі і характеристиці виробничих культур мікроорганізмів для отримання пробіотиків враховуються такі показники біологічної характеристики: спектр та рівень антагоністичної активності і здатність до швидкого накопичення біомаси, стійкість до виживання, а також спектр антибіотикорезистентності виробничих штамів:

Здатність спороутворюючих бактерій проявляти дію привела до розробок на їх основі препаратів, віднесених до покоління так званих самоелімінуючих антагоністів. У підсумку на сьогоднішній день в світі створено понад півсотні препаратів, які повністю або частково складені на основі спороутворюючих бактерій.

Для вибору продуцента пробіотику потрібно порівняти умови культивування, вихід біомаси, а також склад поживного середовища, всі ці дані наведено в табл 2.2.

					НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 2</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Ремінна Р.О.</i>						<i>13</i>	<i>17</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Карлаш Ю.В.</i>							
<i>Реценз.</i>	<i>Стойко В.І.</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог Т.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

Порівняння технологічних параметрів отримання пробіотиків на основі бацилл, для використання у ветеринарії

Штам	Склад поживного середовища	Тривалість культивування, год.	Концентрація клітин, КУО/мл у культуральній рідині	Посилання на літературу
<i>Bacillus pulvifaciens</i> В-4348 (Ендобактерин)	Натрій хлорид – 0,6; Натрій вуглекислий – 0,6; Калій фосфорнокислий двозаміщений – 0,6; Амоній молібденовокислий – 0,06; Залізо сірчанокисле закисне – 0,06; Підсирна сироватка – 998мл	24	4*10 ⁸	Среда для культивирования бактерии-симбионта <i>Bacillus pulvifaciens</i> или <i>Bacillus subtilis</i> – продуцента -пробиотика/ Полянцев,Н.И., РобаеваЛ.В., Подберезный В.В. – Оpubл.27.12.1997[9]

<i>B. subtilis</i> 2335/105 (Субалін)	пептон – 10; глюкоза – 20; NaCl – 1; CaCl ₂ - 0,05; MgSO ₄ – 0,25; MnSO ₄ - 0,3; FeSO ₄ - 0,01; Кукурудзяний екстракт – 30;	48	10*10 ⁸	Патент РФ № 2432393.Способ производства пробиотического препарата на основе спорообразующих <i>Bac.</i> <i>subtilis</i> и <i>Bac.</i> <i>licheniformis</i> /Иваненко А. А. Оpubл.27.10.2011[10]
<i>Bacillus subtilis</i> 12 В-ДЕП (Споровіт)	триптон - 2,5 пептон 5, хлорид натрію- 5, глюкоза - 10,	48	10*10 ⁸	Патент РФ № 2169767. Штаммбактерій <i>Bacillus subtilis</i> , облада-ющий широким спектром антаго- нистической актив-ности и устойчи-востью к антибио- тикам / Байгузина Ф.А., Кузнецова Т.Н., Баданова С.Ч. – Оpubл. 27.06.2001 [11]
<i>Bacillus subtilis</i> 1.1	меляса (ДСТУ 3696- 98) – 23; K ₂ HPO ₄ – 2,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4,6; Цитрат натрію MgSO ₄	36	1*10 ⁸	О. О. Нечипуренко, М. А. Хархота, Л. В. Авдеева. Вплив джерел карбону, нітрогену та солей металів на продуктив-ність каротинсинтезувальних штамів <i>Bacillus subtilis</i> 1.1 та <i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113. Мікробіологічний журнал- 2010. – Т. 72, № 6. – С. 46– 51.[12]

Проте така порівняльна характеристика пробіотичних препаратів (див.табл. 2.1) є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агенту порівнювали вартість поживних середовищ використовуваними продуцентами даних препаратів (табл.2.2).

Вартість компонентів поживного середовища для культивування продуцентів

Продуцент	Компоненти поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн./кг	Вартість компонента (грн.) на 1л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus pulvifaciens</i> В-4348	NaCl - 0.6	6	0,0036	20
	NaCO ₂ – 0.6	84	0,05	20
	K ₂ HPO ₄ - 0,6	50	0,03	20
	(NH ₄) ₂ MoO ₄ - 0,06	100	0,006	20
	FeSO ₄ - 0,06	42	0,0025	20
	Підсирна сироватка – 998мл	3	2,99	22
	Вартість 1 л середовища – 3,14 грн			
<i>B. subtilis</i> 2335/105	пептон – 10;	720	7,20	23
	глюкоза – 20;	53	1,06	24
	NaCl – 1;	6	0,006	20
	CaCl ₂ - 0,05;	15	0,00075	20
	MgSO ₄ – 0,25;	20	0,005	20
	MnSO ₄ - 0,3;	25	0,0075	20
	FeSO ₄ - 0,01;	42	0,00042	20
	Кукурудзяний екстракт – 30;	55	1,65	20
	Вартість 1 л середовища –9,93 грн			
<i>Bacillus subtilis</i>	Триптон - 2,5	720	1,8	20

12 В-ДЕП	Пептон – 5	720	3,60	20
	NaCl– 5	6	0,03	20
	Глюкоза – 10	53	0,53	20
	Вартість 1 л середовища – 5,48 грн			
<i>Bacillus subtilis</i> 1.1	меляса– 23;	14,3	0,33	21
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 4,6;	19,2	0,088	20
	K ₂ HPO ₄ – 2,0;	50	0,1	20
	Цитрат натрію	39	0,050	20
	MgSO ₄	45	0,081	20
	Вартість 1 л середовища – 0,65грн			

Примітка: * - Ціна наведена станом на березень 2020 р. 1 - <https://prom.ua>; 2 – <http://tehnchem.com.ua>, 3 - <https://kiev.flagma.ua>,4 - <https://www.systopt.com.ua>.

Дані в таблиці 2.3, засвідчують, що середовище для культивування *Bacillus subtilis* 1.1 є найбільш дешевим, відносно інші порівнювані середовища. Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховали умовну вартість колоній утворюючих одиниць(одиниць біомаси) (табл.2.3).

Умовна вартість цільового продукту

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Концентрація клітин у препараті КУО*10 ⁻⁸ /л	Умовна вартість, грн/КУО*10 ⁻⁸	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту, КУО*10 ⁻⁸ /год
<i>Bacillus pulvifaciens</i> В-4348	3,14	4,0	0,78	24	0,17
<i>B. subtilis</i> 2335/105	9,93	10,0	0,99	48	0,21
<i>B. subtilis</i> 2335/105	5,48	10,0	0,55	48	0,21
<i>Bacillus subtilis 1.1</i>	0,52	1	0,52	36	0,027

Узагальнивши всі дані, можна зробити висновок, що доцільніше обрати продуцента для одержання біомаси, як основи препарату біоспорин, а саме *Bacillus subtilis 1.1*. Зважаючи на те, що *Bacillus subtilis 1.1* має менш короткий час культивування (накопичення біомаси), середовище культивування досить дешеве та містить за основу мелясу – відход виробництва цукру, що має невисоку вартість. Інші компоненти також недорогі та досить доступні. А також беремо до уваги, що середовище для культивування *Bacillus subtilis 1.1* дає можливість утворити продуцентом $1 \cdot 10^8$ КУО/мл. Відповідно вартість біомаси досить низька: всього 0,65 грн/10⁸ КУО.

Отже для культивування з метою одержання біомаси обираємо штам *Bacillus subtilis 1.1*.

Середовище для вирощування інокуляту: (рН = 7,0±0,3) (г/л):
Na₃C₆H₅O₇×3H₂O – 1,29, (NH₄)₂HPO₄ – 4,75, KH₂PO₄ – 9,60, MgSO₄ – 0,18,
глюкоза – 20,0.

Норма внесення інокуляту кожної культури бактерій складала 5об. %, що відповідало 10⁷–10⁸ колонієутворювальних одиниць на 1 мл середовища (КУО/мл). Культивування бактерій здійснювали на качалках (n = 200 об/хв) за температури 37 С протягом 36 год.

Середовище для виробничого біосинтезу: (рН = 7,5±0,2) (г/л): м'яса (ДСТУ 3696-98) – 23; K₂HPO₄ – 2,0; (NH₄)₂SO₄ – 4,6; Цитрат натрію(Na₃C₆H₅O₇)-1,29; MgSO₄ – 0,18.

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Клітини *Bacillus subtilis* - прямі палички з закругленими кінцями. Розташовуються поодинокі або в парах, іноді утворюють ланцюжки. Розмір клітин: 0,5-1,5 мкм. При фарбуванні за Грамом (кристалічним фіолетовим та подальшою обробкою розчином Люголя, спиртом і фуксином) отримана позитивна реакція, тобто грам-позитивні, утворюють сферичні ендоспори. Розмножуються простим поділом.

Клітини рухливі, на (МПА) клітини штаму утворюють колонії брудно-білого кольору. Не виділяють пігменти в поживне середовище. На МПА (31 ° С, 48 год) утворюють різко-облямовані колонії брудно-білого кольору. Старі колонії жовтіють. На (рис 3.2.1) показано мікроскопіювання бактерій за грамом. На (рис 3.2.2) наведено зображення продуцента на агаризованому середовищі.

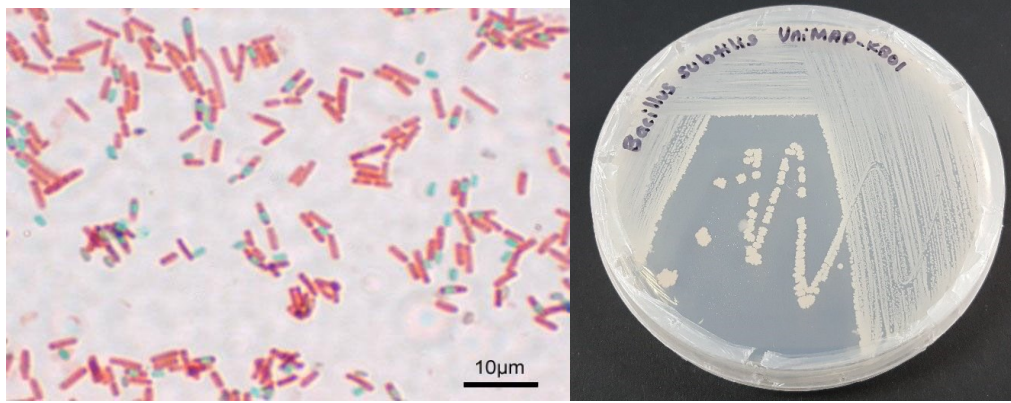


Рисунок 3.2.1, 3.2.2 *Bacillus subtilis* при мікроскопіюванні за грамом та на агаризованому середовищі.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Бактерії продуцента за типом живлення є хемоорганогетеротрофами, тобто використовують як донор електронів, джерело вуглецю – органічні речовини, а джерело енергії – хімічні реакції. По відношенню до осмотичного тиску є осмотолерантним. Температурний діапазон оптимальних умов росту складає близько 35-37 ° С, оптимальна температура. Оптимальне рН культивування 6.8-7,2.

По відношенню до кисню аероби тобто потребує кисню для окиснювальних процесів дихання в звичайних умовах, Можуть асимілювати і споживати різні моно і дисахариди такі як глюкоза маноза, галактоза, сахароза мальтоза, інші, деякі полісахариди, може споживати пептон, і інші продукти білкової природи. [13].

2.3. Таксономічний статус біологічного агенту

Бактерії класифікують за способами їх за морфолого-культуральними (форма клітини, наявність джгутиків, рухливість утворення спор інш) та фізіолого-біохімічним ознаками(синтез певних ферментів споживання певних субстратів, джерел біогенних елементів) а також за генетичними ознаками найменш змінених генів.

Класифікація бактерій є більш консервативною ніж у грибів, оскільки мало разів змінювалася Єдина класифікація бактерій наведена у «Визначнику Берги», більш пізні видання –основана на морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознаках , більш пізні видання на цих та на філогенетичних ознаках(підходах).

Перша комплексна класифікація базувалися лише на морфолого-фізіологічних бактерій і була викладена у першому виданні Визначника бактерій Берги у 1923р , наступні видання враховували й належність видів до певних місць існування та їх адаптацію до цих умов заносили стосовно нових відкритих мікроорганізмів за вищезазначеним підходом до 1986 р до 9 видання визначника Берги.

З 10 видання Визначника Берги у ньому наведено філогенетичну класифікацію бактерій основану на дослідження генів, що кодують рибосомальні білки. Після цього видання більшість доменів бактерій у систематиці змінили свої місця докорінно і перейшли на нові. У 1980 -1990 рр. було розроблену першу класифікацію дріжджів, яка базувалася на морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних ознаках, а саме у 1984 р.

Тож нові видання після опублікування філогенетичної класифікації спираються тепер не тільки на фізіологічні та культуральні а й на генетичні ознаки бактерій, що дає більш точну класифікацію [14].

Наводимо класифікацію наведену у Визначнику Берги за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками(*Табл 3.1.1*) та філогенетична класифікація бактерій (*Табл 3.1.2*).

Таблиця 3.1.1

Класифікації *Bacillus subtilis* (за останнім виданням керівництва Берги, що спиралася на морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки)

Таксономічна група	Класифікація за м-к та ф-б ознаками[9].
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Firmibacteria</i>
Номер частини	18: Палички та коки, які не утворюють ендоспору
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>subtilis</i>

Таблиця 3.1.2

Класифікації *Bacillus subtilis* за філогенетичною класифікацією

Таксономічна група	Класифікація за м-к та ф-б ознаками[9].
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Bacili</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>subtilis</i>

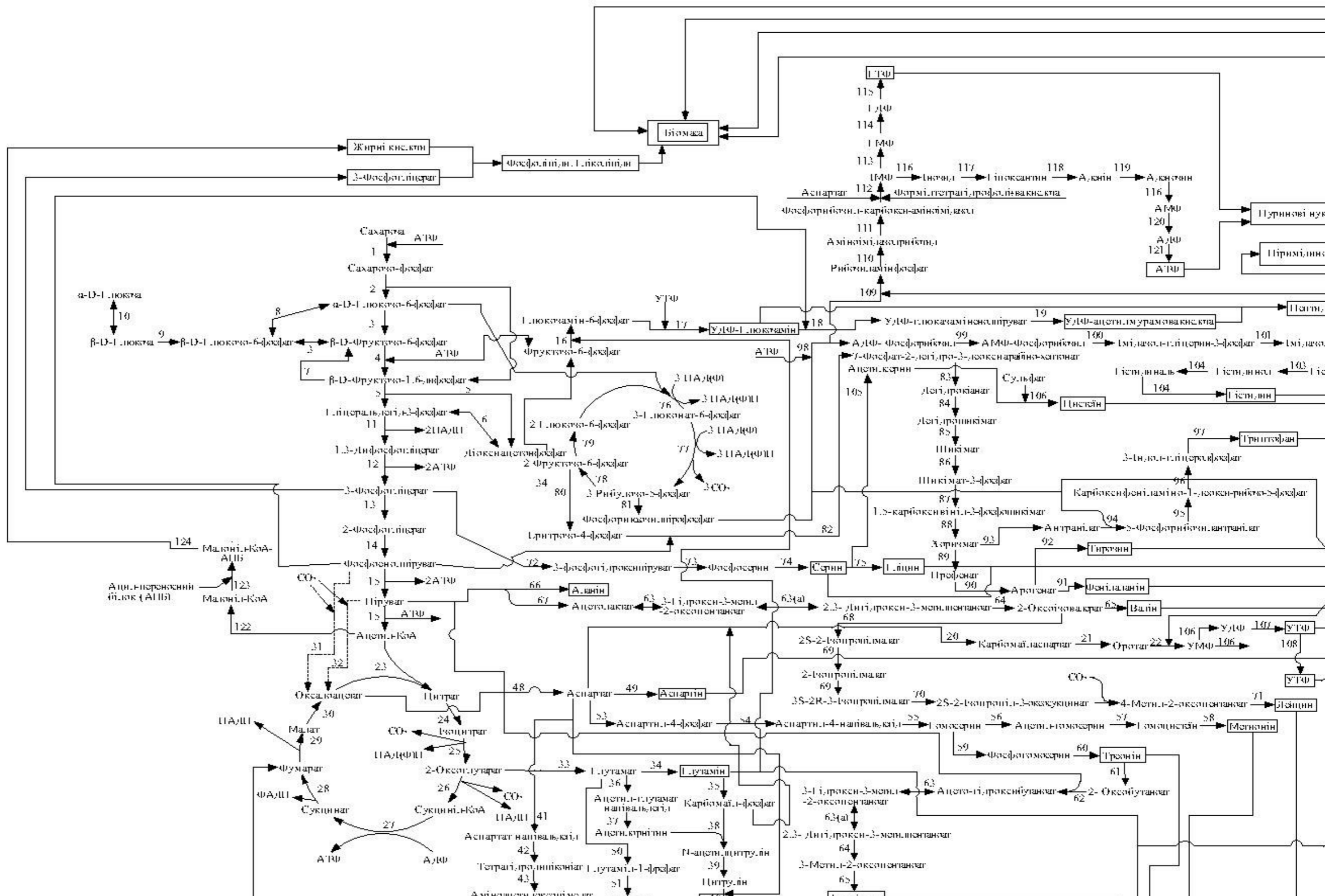
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Bacillus subtilis* на середовищі з м'ясою. Де джерелом вуглецю є сахароза з м'яси, яка за допомогою гліколізу перетворюється на

Ацетил-Ко-А, піруват, та ще деякі попередники амінокислот, а також переходить у лимонну кислоту, що включається у ЦТК та продукує решту ключових попередників амінокислот: 2- оксоглутарат, оксалоацетат. Також попередники з ЦТК утворюють решту амінокислот разом з попередниками з пентозо-фосфатного циклу. Решта амінокислот в основному ароматичної структури.

Компоненти клітинної стінки такі як пептидоглікан синтезуються з глюкози у гліколізі та у ЦКТ, що стосується глютамінової кислоти, яка входить як попередник глюкозаміну та ацетилмурамової кислоти, що становлять основу пептидоглікану.

Основа для ліпідів, зокрема жирні кислоти синтезують з ацетил-КоА, а гліцерин як основа ліпідів синтезується з 3-фосфогліцерату. *рис.3.4.1*



Умовні позначення: Суцільна лінія- основний шлях метаболізму, штрихова- анаплеротичні реакції.

Ферменти: 1- Сахарозофосфорилаза (КФ 2.3.4.21); 2- бетафруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26), гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 3 - фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 4 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 5 – фруктозо-біфосфатальдолаза клас 2 (КФ4.1.2.13); 6 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – фруктозо-1,6-біфосфатаза клас 2 (КФ3.1.3.11); 8- глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9), глюкозо-6-фосфатепімераза (КФ 5.1.3.15); 9 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 10 – альдозо-1-епімераза (КФ 5.1.3.3); 11- гліцеральдегід- 3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 12- фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 13 – 2.3 – біфосфатзалежнафосфогліцератмутаза (КФ5.4.2.11); 14 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 15- піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)[7]; 16- глутамінфруктозотрансаміназа (КФ2.6.1.16); 17 УТФ-ацетилглюкозаміндифосфорилаза (КФ2.6.1.16); 18- УДФ-ацетилглюкозамінкарюоксивінілтрансфераза(КФ 2.5.1.7); 19 – УДФ-ацетилмураматдегідрогеназа(КФ1.3.1.98.); 20- аспартаткарбомаїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 21- дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3), дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.14); 22- оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10), орнітинфосфатдекарбоксілаза (КФ 4.1.1.23); 23- цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 24 - аконітатгідратаза (КФ4.2.1.3); 25 - ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 26 - дигідроліпоаміддегідрогенази (КФ 1.8.1.4); 27 - сукциніл-КоАсинтаза, альфа-субодиниця (КФ 6.2.1.5); 28 - сукцинатдегідрогеназа, цитохром b 556 субодиниця; 29 — фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 30 — малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 31 —фосфоенолпіруваткарбоксілаза (КФ 4.1.1.31); 32 - піруваткарбоксілаза (КФ 6.4.1.1) 33 – глутаматсинтаза НАДН/НАДФН залежна(КФ,1.4.1.13), глутаматсинтаза НАДН залежна(КФ,1.4.1.14); 34 – глутамінсинтаза(КФ6.3.1.2); 35 –карбомаїл-фосфат синтаза (КФ 6.3.5.5); 36- ацетилглутаматсинтаза (КФ 2.3.1.1), ацетилглутаматкіназа (КФ 2.7.2.8), ацетил-гама-глутамінфосфатредуктаза (

КФ 1.2.1.38); 37 – ацетил-орнітинамінотрансфераза (КФ 2.6.1.11) 38 – ацетил-орнітин-карбомал-трансфераза (КФ.2.1.3.9); 39- ацетил-орнітиндеацетилаза (КФ 3.5.1.16); 40- аргініно-сукцинатсинтаза (КФ 6.3.4.5), аргініно-сукцинатліаза (КФ 4.3.2.1);41 – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4), аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 42 – тетрагідродипіконіатсинтаза (КФ 4.3.3.7), дипіконіатредуктаза (КФ 1.17.1.8); 43 – ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.89), 44 – амінотрансфераза (КФ 2.6.1.-), 45 ацетилдіамінопімелатдиацетилаза (КФ3.5.1.47); 46 – діамінопімелатепімераза (КФ 5.1.1.7); 47 – діамінопімелатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 48 –аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 49 – аспаргінсинтаза (КФ 6.3.1.1); 50 – глутаматкіназа (КФ 2.7.2.11) 51 – глутамат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.41); 52 – пролін-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 53 – аспартаткіназа (КФ 2.7.2.4); 54 – аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.11); 55 – гомосериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.3); 56 – гомосерин-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.31); 57 – ацетил-гомосеринліаза (КФ 2.5.1.49), цистеїн-гамасинтаза (КФ 2.5.1.48); 58 – гомосерин-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.10), бетаїн-гомоцистеїн-метил-трансфераза (КФ 2.1.1.5), метіонінсинтазакобаламін незалежна (КФ 2.1.1.14), метіонінсинтазакобаламін залежна (КФ 2.1.1.13); 59 – гомосеринкіназа (КФ 2.7.1.39); 60 – треонінсинтаза (КФ 4.2.3.1); 61 – треоніндеаміназа (КФ 4.3.1.19); 62 – ацето-лактатсинтаза (КФ 2.2.1.6); 63(а) – кеторедуктоізомераза (КФ 1.1.1.86), (в) 2-ацетолактатмутаза (КФ 5.4.99.3); 64 – дигідроксидегідратаза (КФ 4.2.1.9); 65 – трансаміназа В (КФ 2.6.1.42), лізиндегідрогеназа (КФ 1.4.1.9); 66 – аланіндегідрогеназа (КФ 1.4.1.1); 67 – ацетолактатсинтаза (велика субодиниця) (КФ 2.2.1.6); 68 – 2-ізопропілмалатсинтаза (КФ 2.3.3.13); 69 – ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.33); 70 – 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.85); 71- лейцинтрансфераза (КФ 2.6.1.6); 72-3-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95); 73- фосфосеринамінотрансфераза (КФ 2.6.1.52); 74-

фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 75 – гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1); 76- глюкозо-6-фосфатгідрогеназа (КФ1.1.1.49); 77 - глюконат-6-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.44), фосфоглюконатдегідрогеназадекарбоксілювальна (КФ 1.1.1.343); 78 - трансальдолаза (КФ 2.2.1.1); 79 - глюкозо-6-фосфатізомереза (КФ 5.3.1.9); 80 - транскетолаза (КФ 2.2.1.1); 81-рибозофосфатпірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 82 - 3-дезоксиглікозид-7-фосфоглюкозилтрансфераза (КФ 2.5.1.54); 83 - дегідрокіанатсинтаза (КФ 4.2.3.4); 84 - 3-дегідрокіанатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.10) 85- шикіатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.10); 86 - шикіаткіназа (КФ 2.7.1.71); 87- 3-фосфогліколат-1-карбоксиглікозилтрансфераза (КФ 2.5.1.19); 88 - хорионатсинтаза (КФ 2.5.1.19); 89 - хорионатмутаза (КФ 5.4.99.5); 90 - амінотрансфераза ароматична (КФ 2.6.1.57), аспартат-префенатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.78), глутамат-префенатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.79); 91 - префенатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.51), 92-ахрогенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.43), ахрогенатдегідрогеназа НАДФ⁺ залежна (КФ 1.3.1.78), ахрогенатдегідрогеназа НАД(Ф) + залежна (КФ 1.3.1.79); 93 – антранілатсинтаза (КФ 4.1.3.27); 94 – антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.18); 95 – фосфорибозилантранілатізомереза (КФ 5.3.1.24); 96 – індол-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ 4.1.1.48); 97 – триптофансинтаза (КФ 4.2.1.20); 98 – АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.17); 99- АТФ-дифосфорибозилтрансфераза (КФ 3.6.1.31); 100- фосфорибозил-АМФ-циклогідролаза (КФ 3.5.4.19), імідазолкарбоксамідізомереза (КФ 5.3.1.16); 101 – імідазол-гліцеролфосфатдегідрогеназа (КФ 4.2.1.19); 102 – гістидиномфосфаттрансаміназа (КФ 2.6.1.9); 103 – гістидиномфосфатаза (КФ 3.1.3.15); 104- гістидиномдегідрогеназа (КФ1.1.1.23); 105 – серинацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.30); 106 – уридинкіназа (КФ 2.7.4.22); 107 – нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 108 – ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 109 – амінодифосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.14); 110 –

фосфорибозиламінлігаза (КФ 6.3.4.13),
фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (КФ 2.1.2.2),
фосфорибозилгліцинамідсинтаза (КФ 6.3.5.3),
фосфорибозилгліцинамідлігаза (КФ 6.3.3.1), 111 – карбоксиламіно-імідазол –
рибонуклеотидсинтаза (КФ 6.3.4.18), карбоксиламіно-
імідазолрибонуклеотидсинтаза (КФ 5.4.99.18); 112 – імідазол-
сукцинокарбоксиламідсинтаза (КФ 6.3.2.6), аденіло-сукцинатліаза (КФ
4.3.2.2), ІМФ- циклогідролаза (КФ 2.1.2.3), 113 –
інозидмонофосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.205), ГМФ – синтаза (КФ
6.3.5.2); 114 – гунідинкіназа (КФ 2.7.4.8); 115- нуклеозиддифосфаткіназа (
КФ 2.7.4.6); 116 – нуклеотидфосфоестераза (КФ 3.1.3.5); 117 –
пуриннуклеозидфосфорилаза (КФ 2.4.2.1); 118 – аденін-діаміназа (КФ
3.5.4.2); 119 – пуриннуклеозидфосфорилазаDeoD тип (КФ 2.4.2.1); 120 –
аденілаткіназа (КФ 2.7.4.3); 121 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40),
нуклеозиддифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 122- ацетил- КоА-карбоксилаза (КФ
6.3.4.14), біотинкарбоксилаза (КФ 6.4.1.2); 123 – маліл-переносний білок (
трансилаза) (КФ 2.3.1.39); 124 – енол-АПБ- редуктаза (КФ 1.3.1.9)(FabI),
енол-АПБ-редуктаза НАДН залежна (КФ 1.3.1.104).[27-36].

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Біоспорин широко застосовується для корекції порушень мікрофлори (дисбактеріоз), викликаних нераціональним застосуванням антибіотиків, порушенням харчування, перенесеними інфекційними захворюваннями, для профілактики і лікування гострих кишкових інфекцій.

В Україні щорічно реєструється 50-60 тис. випадків з гострими кишковими інфекціями [15,16].

Так як препарат широкого спектру застосування, тому точно прорахувати пацієнтів, в яких порушена мікрофлора кишківника, не вдасться. Припустимо, що 800 000 пацієнтів потребуватиме прийому пробіотиків для відновлення мікрофлори.

Виробник Біоспорину ПрАТ «БІОФАРМА». Адреса. Україна, 03680, м. Київ, вул. М Амосова, 9. [17].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Розрахуємо кількість Біоспорину, яку необхідно виробити в рік, щоб забезпечити потреби населення. Спосіб застосування даного пробіотика в середньому становить – по 2 фл 2 рази на добу. Курс лікування становить – 3тижні. Отже, 84 флакони – кількість доз Біоспорину, необхідних на один курс лікування.

Зробимо розрахунок потреби Біоспорину в Україні на рік:

$60\ 000 + 800\ 000 = 860\ 000$ пацієнтів.

					НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ремінна Р.О.				Розділ 3	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.					Д	30	4
Реценз.	Стойко В.І.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Враховуючи, що виробництво Біоспорину в Україні, то ми хочемо забезпечити 100% річної потреб в Біоспорині на ринку:

$$860\,000 * 84 \text{ фл} = 72\,240\,000 \text{ фл.}$$

Розрахунок потужності виробництва для культивування *Bacillus subtilis*, щоб отримати 72 240 000 фл. Біоспорину.

Оскільки в складі препарату не тільки бактерії роду *Bacillus subtilis* і його концентрація не менше ніж $1 \cdot 10^8$ (тобто 1 мл), то розрахуємо об'єм культуральної рідини *Bacillus subtilis* за рік:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 72,24 \text{ м}^3.$$

Окрім цього, нам необхідно врахувати втрати, які можуть виникнути в процесі виробництва, вони становлять 20%, отже, з урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 72,24 + (72,24 \times 0,2) = 86,68 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300.

Ефективний фонд робочого часу **Неф.** = $300 \times 24 = 7200$ год.

1. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 36 + 13 = 49 \text{ (год)}, \text{ де}$$

$T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (4 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = \frac{\text{Неф.} - 7200}{T_{\text{цф}} - 49} = 147$$

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

$$V_{\text{кр}}^{\text{н}} = V_{\text{кр}}^{\text{річ}} / n_{\text{ц}} = 86,68 / 147 = 0,589 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом 1 м^3 з допустимим коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,5 \dots 0,65$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Загальний об'єм ферментера, в якому здійснюється культивування пробіотичних штамів *Bacillus subtilis* становить 1 м^3 . Коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап.}} = 0,6$.

Робочий об'єм ферментера:

Робочий об'єм ферментера $V_{\text{рф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,589 / (1 - 0,1) = 0,65 \text{ м}^3$,
де $E_{\text{ф}}$ – втрати КР при біосинтезі від краплевиносу - $0,1 \dots 0,2$ частки.

Можливий геометричний об'єм ферментера

$$V_{\text{гф}} = V_{\text{рф}} / K_3 = 0,65 / 0,6 = 1,08 \text{ м}^3$$

Найближчий стандартний об'єм $-V_{\text{стф}} - 1,0 \text{ м}^3$. Уточнюємо K_3

$$K_3 = V_{\text{рф}} / V_{\text{стф}} = 0,589 / 1 = 0,59 \text{ Що допустиме } K_3 = 0,5 \dots 0,65.$$

Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу.

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 600 л культуральної рідини потрібно:

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

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

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

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

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням бактерій у інокуляторі об'ємом 10 л .

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

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

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

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу Біоспорину у ферментері об'ємом 1 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи, четвертим етапом буде сам процес біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Обґрунтування вибору розчинів для регулювання рН

Оскільки під час культивування рН необхідно підтримувати на рівні 7,0, враховуючи те, що розчин поживного середовища має певну буферність, що не дозволить змістити рН до критичного рівня упродовж терміну культивування. Тож приготування стерильних розчинів для корекції рН не є необхідним.

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Bacillus subtilis - вид грампозитивних спороутворюючих аеробних ґрунтових бактерій. Культивування бактерії відбувається у періодичному режимі.

Всі форми та види ферментаційних систем створюються, маючи за основну мету забезпечення однакових умов для всіх компонентів, що містяться в реакторі. Біореактор повинен бути сконструйований так, щоб виключити можливість потрапляння забруднюючих мікроорганізмів, а також забезпечити збереження потрібної мікрофлори. Об'єм культивуємої суміші повинен залишатися постійним. Рівень розчинного кисню повинен підтримуватися вище критичних рівней керування культури аеробних організмів; параметри зовнішнього середовища, такі як температура, рН та інші повинні постійно контролюватися. Культура при вирощуванні має добре перемішуватись.

Головне завдання апаратів для глибинної ферментації - забезпечення високої інтенсивності масо- і енергообміну клітин із середовищем. За структурою потоків ферментери можуть бути апаратами повного переміщення або повного витіснення.

					НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 4	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Ремінна Р.О.					Д	34	7
Перевір.	Карлаш Ю.В.					Кафедра БТМ		
Реценз.	Стойко В.І.							
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Конструктивні відмінності ферментерів визначаються в основному способами підвода енергії та аерації середовища:

- ферментер з підведенням енергії до газової фази;
- ферментер з підведенням енергії до рідкої фази;
- ферментер з комбінованим підведенням енергії

Ферментери з підведенням енергії до газової фази. В апаратах цього типу аерація і перемішування культуральної рідини здійснюються стисненим повітрям, яке подається в ферментер під певним тиском. До таких ферментерів відносять:

- Барботажні ферментери (біореактори), подача повітря в яких здійснюється через барботажні пристрої, розташовані в нижній частині апарату;
- Апарати з дифузором (ерліфтні аератори);
- Трубчасті ферментери (газліфтні);
- Ферментери з форсунковим повітрярозподільником;
- Ферментери колонного типу.

Ферментери (біореактори) з підведенням енергії до рідкої фази. До таких апаратів відносять:

- апарати із самозасмоктувальною турбіною;
- ферментер з турбоежекторними пристроями;

Ферментери з комбінованим підведенням енергії. У цих апаратах здійснено підведення енергії до газової фази для аерації й до рідкої фази для перемішування. Ферментери зазвичай представляють собою герметичні циліндричні ємності, висота яких в 2-2,5 рази перевищує діаметр. Найчастіше їх виготовляють із нержавіючої сталі. Для підтримки температури в апараті є подвійний кожух або теплообмінник типу змійовика.

Головна вимога до апаратів - збереження стерильності, тому вони повинні бути герметичними, всі лінії трубопроводів повинні бути доступні для обробки гарячою парою.

Тип ферментерів (біореакторів) для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань.

Культивування *Bacillus subtilis* передбачається здійснювати глибинним способом в ферментерах. В представленій роботі передбачено використання ферментеру з комбінованим підводом енергії.

Проведення культивування *Bacillus subtilis* передбачає забезпечення інтенсивного перемішування середовища.

Обраний ферментер забезпечений пристосуваннями для достатнього перемішування культури, підтримки необхідної температури, а також контрольно-вимірювальним приладами

Підтримання температури, оптимальної для гарного росту біомаси і прояву їм підвищеної фізіолого-біохімічної активності, забезпечується сорочкою ферментера або системою змійовиків. Змійовики використовуються також для подачі пари в процесі стерилізації або води для охолодження.

Спостереження за основними процесами життєдіяльності організму здійснюється контрольно-вимірювальною апаратурою, що дозволяє підтримувати на заданому рівні температуру всередині ферментера, рН середовища, тиск в середині ферментера та інші параметри.

Ферментер забезпечений пристосуваннями для перенесення інокуляту, внесення додаткових поживних речовин, необхідних для покращення розвитку продуцента та пристроєм для взяття проб [18].

Для забезпечення стерильності процесу ферментації в обраному ферментері передбачено використання торцевих ущільнень валу перемішуючого пристрою з паровим захистом. За допомогою застосування такої конструкції вдається практично повністю запобігти потраплянню атмосферного повітря в апарат, що є дуже важливим для збереження асептичних умов культивування.

Для культивування термотолерантного аеробного мікроорганізму *B. subtilis* 1.1 обрано періодичне глибинне культивування за таких умов: температура – 37,1 °С,

інтенсивність аерації 1 л/л хв, інтенсивність перемішування – 220 об/хв, корекцію рівня рН упродовж культивування не проводять.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Основний продуцент *Bacillus subtilis* свідноситься до аеробних мікроорганізмів тож при культивуванні з метою одержання біомаси необхідно підтримувати достатню концентрацію кисню у культуральній рідині на кожній стадії культивування мікроорганізму. Для підготовки повітря його забирають через повітрезабірну шахту висотою 30 м, аби повітря було максимально чистим, далі подається на фільтри грубої очистки де звільняється від великих часточок(ступ. очищення 80 %) такий відсоток очищення може дати фільтр з грубим базальтовим волокном чи з тканиною Камінської, тож на даному етапі обираємо тканину Камінської, далі повітря під дією компресора стискається і подається переохолодження задля видалення зайвої вологи на краплевловлювач після воно подається на ресивер, щоб урівноважити його швидкість і звільнити від ривкової подачі, це необхідно для ефективної фільтрації повітря. Після цього воно подається на фільтри другого і третього ступенів очистки де очищається на 98 % такий ступінь очистки можуть дати фільтри Петрянова, або фторопластовий фільтр високого тиску. обираємо фільтр фторопластовий оскільки він дає досить високий ступінь очистки та може забезпечити стабільну роботу після температурної обробки чи обробки паром та витримує досить високі тиски, що необхідно при подачі аераційного повітря.. Перед ферментером повітря охолоджується до температури 30-40 °С , аби не мати негативного впливу на культуру і проходить через його індивідуальний фільтр. Для даної задачі обираємо індивідуальний фторопластовий фільтр з діаметром пор 0,1 мкм.

Очищення відпрацьованого повітря: Після проходження ферментерів відпрацьоване повітря подається на аналогічного типу фільтри де доочищається та знезаражується . Після цього викидається в атмосферу[19].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Підготовка миючих засобів проводиться з метою очищення обладнання від залишків попереднього культивування та бруду, які здатні контамінувати культуральну рідину при виробничому культивуванні. Тому, для попередження таких забруднень використовують миючі засоби.

Для миття частин обладнання, які забруднені сторонніми речовинами передбачено використовувати різні миючі засоби, а саме, розчин кальцинованої соди.

Гарячі (1-2)% розчини кальцинованої соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу не падають. Рекомендується використовувати 0,5% розчини каустичної соди температурою (45 ± 5) °C для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також (1-2)% розчини температурою (55 ± 5) °C для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій.

З метою миття та дезінфекції виробничих приміщень та обладнання використовують такі сучасні засоби, як, Хлорантоїн 0,2%, Дезактін.

Дезактін – дезінфікуючий засіб з миючим ефектом. Активною речовиною є дихлорантин. До складу засобу введені аніонні поверхнево-активні речовини, диспергатор, наповнювач. Являє собою порошок від білого до жовтуватого кольору із слабким запахом хлору. Розчинність у воді не менше 20 мг/дм. Для прискорення розчинення Дезактіну допускається використовувати теплу воду температурою (40 ± 5) °C.

Водні розчини Дезактіну не кородують об'єкти, котрі виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, деревини, кахлю, порцеляни, фаянсу, а також поверхні технологічного обладнання та устаткування з лако-фарбовим, полімерним та гальванічним покриттям, не фіксують білкові та жирові забруднення на оброблених поверхнях, виявляють змочувальні та мийні властивості, добре змиваються.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007). Не виявляє кумулятивних, шкірно-подразнюючих, сенсibiliзуючих властивостей. У сухому вигляді та концентрованих розчинах подразнює слизову оболонку очей.

Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника у критих складських приміщеннях не більше ніж у 3 яруси осторонь від джерел відкритого вогню та тепла.

Дезактін виявляє бактерицидні, туберкулоцидні та фунгіцидні властивості.

Вартість 1 кг Дезактіну на 2020 р.- 588грн (<https://prom.ua/p971665313-dezaktin.html>)

Хлорантоїн має бактерицидні, туберкулоцидні, вируліцидні (включаючи збудника поліомієліту, усіх типів грипу, парагрипу, коронарною респіраторно-синцитиальною, ротавірусною, аденовірусною інфекцій, SARS, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні і фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, плісневих грибів) властивості. Крім того, Хлорантоїн застосовується у вогнищах особливо небезпечних інфекцій (чума, холера, сибірська виразка і тому подібне). Хлорантоїн видаляє механічні білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів і порожнеч виробів медичного призначення. По дезинфікуючій активності Хлорантоїн перевершує в 5-10 разів звичайні дезинфікуючі засоби і виключає застосування лужних миючих засобів. Використання Хлорантоїну дозволяє поєднати в одній операції стадії миття, дезинфекції і передстерилізації, скоротити тривалість санітарної обробки. [20].

Вартість Хлорантоїну 1 кг – 453 грн (<https://1sa.com.ua/hlorantoin-1-kg.html>)

Отже, порівнявши вартість, ефективність та безпечність мийно-дезинфікуючих засобів, обираємо Хлорантоїн.

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для одержання інокуляту обрано поживне середовище складу (г/л): глюкоза – 20,0; дигідрофосфат калію (KH_2PO_4) - 9,6; діамонійфосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) - 4,75; цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) - 1,28; сульфат магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,18. Для приготування його необхідно розділити на такі композиції (залежно від режиму стерилізації та можливого взаємного впливу певних компонентів):

Композиція I (A): глюкоза для виробничого культивування)(режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II (B): дигідрофосфат калію(KH_2PO_4), діамонійфосфат($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (режим стерилізації: 131°C, 50 хв).

Композиція III (B): сульфат магнію($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)(режим стерилізації: 131°C, 50хв)винесений у окрему композицію, оскільки за умови спільної стерилізації із іншими солями можливе утворення нерозчинного фосфату магнію.

Для виробничого біосинтезу обрано поживне середовище складу: (рН = 7,5±0,2) (г/л): меляса (ДСТУ 3696-98) – 23; K_2HPO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6; Цитрат натрію($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), MgSO_4

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

Композиція I (A): меляса (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II (B): дигідрофосфат калію(KH_2PO_4), діамонійфосфат($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (режим стерилізації: 131°C, 50 хв).

Композиція III (B): сульфат магнію($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)(режим стерилізації: 131°C, 50хв)

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання наведеного на технологічній схемі розписана у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач для приготування розчину для миття обладнання для	2	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод ХимическогоМашиностроения типу «СРЕН»об'ємом 60 л оснащений мішалкою та рубашкою [8].
P-2	Реактор для приготування композицій А	1	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод ХимическогоМашиностроения типу «СРЕН»об'ємом 0,05 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [9].
P-3, P-4	Реактори для приготування композицій В та Б	1	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод ХимическогоМашиностроения типу «СРЕН»об'ємом 0,02 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [9].

НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Ремінна Р.О.			
Перевір.	Карлаш Ю.В.			
Реценз.	Стойко В.І.			
Н. Контр.				
Затверд.	Пирог Т.П.			
Розділ 5				
			Літ.	Арк.
			Д	41
			Кафедра БТМ	
			4	

ПЗ-5	Повітрязабірник	1	Повітрязабірникрадіальний DunarСМ 21,4[5]
Ф-6	Фільтр грубої очистки	1	Фильт для сжатоговоздуха з акрилового волокна WHFIT 030 525PP част до 3 мкм E=90% продукт 315 м ³ /год <u>«ТОВ OMEGA Air»</u> [5]
К-7	Компресор	1	Компресор GX 7фірми AtlasCopco, потужн 14 л/с, робоч тиск 1 МПа[5]
Т-8	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник- охолоджувач серії AFR 11 «Уралкомпресормаш»[5]
РЕ-9	Ресивер	1	Ресивер РВ 320/10 «Уралкомпресормаш» [5]
Т-10	Теплообмінник -нагрівач	1	Теплообмінник ВОП_NAirone(Росія)[5]
Ф-11	Фільтр тонкої очистки	1	Фильт для сжатоговоздуха з боросилікатного волокна WHFIT 030 525PM част до 0.1 мкм E= 99,99 % продукт 315 м ³ /год <u>«ТОВ OMEGA Air»</u> [5]
Н-12,Н- 13, Н- 14....Н- 18	Насоси перистатичні	7	Насос перистатичнийRotho PSF1 30-2700л/годфірми <u>ТОВ «Ватерпасс»</u> [11]

Н-19	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий 6 потужністю 0 м ³ /год фірми ТОВ «Ватерпасс» [11]
Р-15,	Реактор для приготування композицій А	1	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод ХимическогоМашиностроения типу «СРЕН» об'ємом 0,5 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [9].
Р-16, Р-17	Реактори для приготування композицій Б та В	2	Реактор змішувач фірми «НПОФастовський Завод ХимическогоМашиностроения типу «СРЕН» об'ємом 0,2 м ³ оснащений мішалкою та рубашкою [9].
ФІ-15	Ферментер-інокулятор	1	Інокулятор обладнаний стандартною системою функцій для технологічного процесу на 100 л «БИОТЕХНО»[8]
ФРВ-16	Ферментер виробничий	1	Ферментер об'ємом 1 м ³ компанії «BIORUS» обладнаний системою багатофункціонального культивування аеробних мікроорганізмів[8]
Ф-31 Ф-32	Фільтри індивідуальної очистки	2	Фильт для стисненого повітря воздуха 3 боросилікатного волокна

			WHFIT 030 525PS част до 0,01 мкм продукт 315 м ³ /год <u>«ТОВ OMEGA Air»</u> ,E=99,9999 [10]
Д-33,Д-34 Д-35,Д-36 Д-37, Д-38. Д-39,Д-40	Дозатори об'ємно вагові	4	Дозатор фірми «АСВІК ЦЕНТР» ДВП-6 [12]

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.

Технологічна схема біосинтезу включає допоміжні роботи (скорочено «ДР», що включає підготовку і стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (скорочення «ТП», що включає підготовку посівного матеріалу і біосинтез пробіотичної біомаси *Bacillus subtilis*). А також технологічну схему біосинтезу, що наведена в додатку. Для необхідності піногасіння обираємо силікатний піногасник FLOFOAMT[36]. Кількість піногасника по співвідношенню 100 г на 1000 л. (Для ефективності дії необхідно піногасник розводити до 10 %).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1 Підготовка розчинів мийних та дезинфікувальних засобів

Для дезинфекції та миття поверхонь приміщення використовують 0,2% розчин концентрату Хлорантоїну. Для обробки площі прибирання (приймаємо генеральне для розрахунку максимального об'єму миючого засобу).

ДР 1.1.1. Приготування 0,2% розчину Хлорантоїну

У збірник для миючого розчину вносять відміряну кількість сухого засобу хлорантоїну і доливають певну кількість води питної, вмикають перемішуючий пристрій на 5 хвилин та одержують робочий розчин Хлорантоїну готовий до застосування.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину кальцинованої соди для миття обладнання.

Для приготування даного розчину у реактор для приготування миючого розчину вносять попередньо зважену кількість кальцинованої соди та доливають відміряну кількість води питної та одержують потрібний робочий розчин вміщенням мішалки на 5 хв.

					НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 6	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Ремінна Р.О.					Д	45	10
Перевір.	Карлаш Ю.В.					Кафедра БТМ		
Реценз.	Стойко В.І.							
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР1.2.1 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться 1 раз на 30 днів.(для генеральної мийки витрата робочого 0,2% розчину засобу Хлорантоїн становить 48 л . При генеральному прибиранні миються всі мертві зони приміщення, вікна, двері підлога інші поверхні.

ДР1.2.2 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання. Мийка здійснюється способом миття та протирання поверхні з використанням 0,2 % розчину засобу Хлорантоїн (від ДР 1.1.1). Мийка проводиться 1 раз на добу.

Перед початком роботи персонал повинен пройти санітарно-гігієнічну підготовку, а саме миття рук туалетним або господарським милом та дезінфікацію 70%-им етиловим спиртом. Також обов'язковим є наявність медичного халату та шапочки.

ДР1.3 Підготовка обладнання

ДР1.3.1 Технічний огляд обладнання

Проходить такі етапи: Загальний технічний огляд, перевірка на герметичність, пробний пуск, настройка параметрів.

ДР1.3.2 Перевірка на герметичність.

Дана стадія стосується в першу чергу основного ферментера та всіх інокуляторів та посівних апаратів. Для цього у апарат, на якому герметично затягнута вся арматура, подається аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-МПа, Перекривають прохід повітря, та фіксують показання манометра на протязі 40-60 хв. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дане значення перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і знаходять місце розгерметизації методом омилення апарата (його опорних з'єднань) або з використання галогенів (для цього в апарат під тиском подають галоген, апарат нагрівають до 80 °С. і збільшують тиск до 0,2 МПа і проводять щупом газоаналізатора-галогеношукача у місцях ймовірного

розгерметизування і при відхиленні стрілки фіксують місце. Тривалість операції від 0,5-до1,5 години).

При знаходженні місця розгерметизації затягують з'єднальну арматуру. І повторюють операцію, якщо це не дало результатів то міняють прокладки з'єднань.

ДР1.3.3 Миття обладнання

Миття обладнання буде проводитися циркуляційною мийкою з використанням розбризкувальних головок на кожній одиниці обладнання. Мийка проводиться робочим розчином кальцинованої соди. Кількість 2% робочого розчину(від ДР1.1.2) на 1 миття становить 5,6 м³ для всього обладнання. Температура миття 70⁰С.

ДР1.3.4 Ополіскування обладнання (температура 20⁰С)

ДР1.3.5 Стерилізація.

Стерилізація проводиться подачею гострої пари у апарат за температури 135⁰С, упродовж 1 години.

ДР 2 Підготовка аераційного повітря

ДР2.1 Забір атмосферного повітря

Для підготовки повітря його забирають через повітрезабірну шахту висотою 3м.

ДР2.2. Очищення від грубих часток та пилу

Повітря подається на фільтри грубої очистки де звільняється від великих часточок(ступ. очищення 80 %)(Ф-2) (Фільтр для стисненого повітря з акрилового волокна)

ДР 2.3 Стиснення повітря

Повітря під дією компресора стискається і нагрівається до температури 120-250. ⁰С

ДР 2.4. Охолодження і видалення вологи

Далі повітря подається на переохолодження для видалення вологи на краплевловлювач де охолоджується до температури 25-30 ⁰С. після воно подається на ресивер

ДР2.5 Нагрівання повітря

Повітря нагрівається до температури 37 °С після переохолодження на теплообміннику.

ДР2.6 Фільтрування на фільтрах високої очистки

Повітря піддається високій очистці на фільтрах другого і третього ступенів очистки з боросилікатного волокна.

ДР 2.7 Фільтрування на фільтрах індивідуальної очистки перед ферментерами.

Перед ферментером чи інокулятором повітря проходить через його індивідуальний фільтр (Фторопластові фільтри з діаметром пор 0,01 мкм де очищаються до 99,999 %.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування і стерилізація 600 мл поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 540 мл поживного середовища.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 540 мл середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 540 мл, г	Композиція	Об`єм композиції, мл
Глюкоза	20	10,8	А	270
КН ₂ РО ₄	9,6	5,18	Б	135
(NH ₄) ₂ НРО ₄	4,75	2,56		
Цитрат натрію	1.29	0,69		

MgSO ₄	0,18	0,097	В	135
			Разом:	540

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 10,8 г глюкози, переносять у колбу місткістю 500 мл, наливають 270 мл води, закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 5,184 г дигідрофосфату калію, 25,65 г діамоній фосфату, 0,696 г цитрату натрію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додаємо 135 мл питної води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ДР 3.1.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,097 г магній сульфату, наважку поміщають у колбу місткістю 500 мл додають 135 мл води питної. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ДР 3.2 Приготування і стерилізація 6 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у інокулятор об'ємом 10 л.

Оскільки середовище буде вноситись з поправкою на інокулят (6 л) у кількості, що на 10 % менша від загального об'єму. Тож остаточний об'єм середовища становитиме 5,40 л.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,4 л середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 5,40 л, г	Композиція	Об'єм композиції, л

Глюкоза	20	108	А	2,70
КН ₂ РО ₄	9,6	51,84	Б	1,35
(NH ₄) ₂ НРО ₄	4,75	25,65		
Цитрат натрію	1,29	6,96		
MgSO ₄	0,18	0,97	В	1,35
			Разом:	5,40

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 108 г глюкози, переносять в інокулятор місткість 10 л, наливають 2,7 л води і стерилізують при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 51,84 г дигідрофосфату калію, 25,65 г діамоній фосфату, 6,96 г цитрату натрію. Наважку поміщають в інокулятор об'ємом 10 л, додаємо 13,5 л питної води і стерилізують при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ДР 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,97 г магній сульфату, наважку поміщають в інокулятор місткістю 10 л додають 13,5 л води питної і стерилізують при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ДР 3.3 Приготування і стерилізація 60 л поживного середовища для одержання посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 100 л.

Оскільки середовище буде вноситись з поправкою на інокулят (6л) у кількості, що на 10 % менша від загального об'єму. Тож остаточний об'єм середовища становитиме 54 л.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 54 л середовища.

Компоненти	Концентрація	Кількість	Композиція	Об'єм
------------	--------------	-----------	------------	-------

ПОЖИВНОГО середовища	КОМПОНЕНТІВ г/л	КОМПОНЕНТІВ ПОЖИВНОГО середовища на 54 л, г		КОМПОЗИЦІЇ, л
Глюкоза	20	1080	А	27
КН ₂ РО ₄	9,6	518,4	Б	13,5
(NH ₄) ₂ НРО ₄	4,75	256,5		
Цитрат натрію	1.29	69,6		
MgSO ₄	0,18	9,7	В	13,5
			Разом:	54

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 1080 г глюкози, переносять у реактор місткістю 50 л, наливають 27 л води, Закривають перемішують, потім стерилізують в реакторі при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 518,4 г дигідрофосфатукалія, 256,5 г діамоній фосфату, 69,6 г цитрату натрія. Наважку поміщають у реактор об'ємом 50 л, добавляємо 13,5 л питної води, перемішують. Закривають і стерилізують в реакторі при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ДР 3.3.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 9,7 г магній сульфату, наважку поміщають у реактор місткістю 50 л додають 13,5 л води питної. Закривають і стерилізують в реакторі при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ДР 3.4 Приготування і стерилізація 600 л поживного середовища для виробничої ферментації. Оскільки середовище буде вноситись поправкою на інокулят(60 л) у кількості, що на 10 % менша від загального об'єму. Тож остаточний об'єм середовища становитиме 540 л.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 540 л середовища.

Компоненти поживного середовища	Концентрація компонентів г/л	Кількість компонентів поживного середовища на 540 л, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	23	12,42	А	270
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	9,6	5,18	Б	135
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4,75	2,56		
Цитрат натрію	1,29	0,66		
MgSO_4	0,18	0,097	В	135
			Разом:	540

ДР 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий відважують 12,42 кг меляси, переносять у реактор місткістю 500 л, наливають 270 л води, Закривають перемішують, потім стерилізують в реакторі при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 5,18 кг дигідрофосфатукалія, 2,56 кг діамоній фосфату, 0,66 кг цитрату натрію. Наважку поміщають у реактор об'ємом 500 л, добавляємо 135 л питної води, перемішують. Закривають і стерилізують в реакторі при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ДР 3.4.3 Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,097 кг магній сульфату, наважку поміщають у реактор місткістю 500 л додають 135л води питної. Закривають і стерилізують в реакторі при температурі 131 °С упродовж 50 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* зберігають у вигляді замороженої клітинної суспензії в ампулах з додаванням кріопротектору поміщених у кріокамеру при -70°C . Культуральна рідина одержана на середовищі МПА.

ТП 4.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру відновлюють, в пробірках з МПА, потім розсівають мікробіологічною петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощують при температурі 37°C упродовж 48 годин.

ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії (від ТП 4.2) пересівають в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1-2 см. Тривалість вирощування – 48 год, температура 30°C .

ТП 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу у стерильну колбу місткість 3 л додають а асептичних умовах весь об'єм композиції А (від ДР 3.1.1), композиції Б (від ДР 3.1.2) та композиції В (від ДР 3.1.3).

Перемішують і розливають по 150 мл в 4 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл. Туди вносять посівний матеріал з пробірок з МПА засіяних продуцентом раніше.

Параметри культивування : температура 37°C , тривалість 36 годин.

ТП 4.5 Вирощування культури в інокулятор 10 л (коефіцієнт заповнення 0,6 – отримання культури об'ємом 6 л

В інокулятор об'ємом 10 л, додають стерильну композицію А (ДР 3.2.1), композицію Б (ДР 3.2.2), композицію В(ДР 3.2.3), Потім додають 600 мл ПМ зі стадії вирощування на качалках (ТП 4.4) в асептичних умовах, перемішують та починають процес культивування. починають процес культивування. Параметри культивування : рН- 7 температура 37°C , тривалість 36 годин, аерація. Перемішування 200 об/хв.

ТП 4.6 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 100 л (коефіцієнт заповнення 0,6 – отримання культури об'ємом 60 л)

У посівний апарат об'ємом 100 л додають стерильну композицію А зі (ДР 3.3.1) , композицію Б зі (ДР 3.3.1) , композицію В зі (ДР 3.3.3) Потім подають 6 л посівного матеріалу через трубу перетиснення, від інокулятора на 10 л (ТП.4.5). Перемішують та починають процес культивування. Параметри культивування : рН- 7, температура 37⁰С, тривалість 36 годин, аерація. перемішування 200 об/хв.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 1 м³ в асептичних умовах вносять композиції А (від ДР 3.4.1), композиції Б (від ДР 3.4.2), композиції В (від ДР 3.4.3), і посівний матеріал через трубу перетиснення (60л) від посівного апарата на 100 л (ТП 4.6). Починають процес культивування. Під час процесу культивування підтримують аерацію на рівні розчиненого кисню на рівні 60 % від насичення повітрям. Параметри культивування: температура 37⁰С, рН 7, 0 перемішування 200 об/хв. Тривалість культивування становить 36 години. Кожні 5 годин відбирають проби для аналізу процесу ферментації, концентрація біомаси кількість джерела вуглецю і азоту у культуральній рідині, концентрація біомаси. Процес ферментації орієнтовно продовжують до 36 годин, остаточну зупинку процесу здійснюють при досягненні концентрації живих клітин у $1 \cdot 10^8$ КУО/мл.

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

7.1. Карта постадійного контролю

Упродовж виробничого культивування періодично (кожні 5 годин) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю і азоту.

Для точного контролю стадій технологічного процесу та показників контролю наводимо карту постадійного контролю.

					Д НУХТ БТЕК 03.01.07 ДП ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Ремінна Р.О.</i>				<i>Розділ 7</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Карлаш Ю.В.</i>						55	16
<i>Реценз.</i>	<i>Стойко В.І.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							

Карта постадійного контролю біотехнологічного виробництва.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, 1.1.1 Приготування розчину хлорного вапна	Концентрація розчину хлоратоїну	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,2 %
Кх, 1.1.2 Приготування розчину засобу Біомой	Концентрація розчину кальциновоаної соди	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=2 %
Кт 1.2.1 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду

Кт 1.3.1 Миття розбірних частин обладнання	Розбірні частини обладнання, мийний розчин, його температура, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції	$T = 70^{\circ}\text{C}$
Кт 1.3.2 Миття обладнання	Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	$T = 70^{\circ}\text{C}$ $t - 5 \text{ хв.}$
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тис визначається безперервно під час виконання операції	$t - 0,5 \text{ год}$ $P = 0.1 - 0,2 \text{ мПа}$

1	2	3	4	5
Кт 1.3.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час виконання операції	t- 1год T=135 ⁰ C
Кт 2.2.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтрів грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра	Після очистки повітря на фільтрі грубої очистки	E= 80
Кт 2.2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр технічний	Після компресування повітря	P= 0,35-0,5 МПа, t= 220-250 ⁰ C
Кт 2.2.4 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура	термометр технічний	Після охолодження повітря	t= 25-40 ⁰ C
Кт 2.2.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W=60%
Кт 2.2.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	термометр технічний	Після нагрівання повітря	t= 37 ⁰ C

<p>Кт 2.2.7</p> <p>Тонке очищення повітря</p>	<p>Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків</p>	<p>Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра</p>	<p>Після очищення повітря у фільтрі тонкої очистки</p>	<p>E= 99%</p>
---	--	---	--	---------------

Кт 2.2.8 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорта фільтра	Під час очищення повітря у фільтрі	E= 99,99%
Кт, Км 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=121 ⁰ C t=30хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=131 ⁰ C t=50хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 Приготування і стерилізація	Композиція В, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний	Температура визначається безперервно під час	T=131 ⁰ C t=50хв

композиції В		контроль	стерилізації, мікробіологічний контроль- після	Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.1 Приготування стерилізація композиції А	і Композиція А , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=112^{\circ}\text{C}$ $t=30\text{хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.2 Приготування стерилізація композиції Б	і Композиція Б , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^{\circ}\text{C}$ $t=50\text{хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування стерилізація композиції В	і Композиція В , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації,	$T=131^{\circ}\text{C}$ $t=50\text{хв}$ Відсутність

			мікробіологічний контроль- після	мікробіоти
Кт, Км 3.3.1 Приготування стерилізація композиції А	і Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=121 ⁰ C t=20хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування стерилізація композиції Б	і Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=131 ⁰ C t=30хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.3 Приготування стерилізація композиції Б	і Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний	T=131 ⁰ C t=30хв Відсутність мікробіоти

			контроль- після	
Кт, Км 3.4.1 Приготування стерилізація композиції А	і Композиція А , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=121^{\circ}\text{C}$ $t=20\text{хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування стерилізація композиції Б	і Композиція Б , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^{\circ}\text{C}$ $t=30\text{хв}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.3 Приготування стерилізація композиції Б	і Композиція Б , температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$T=131^{\circ}\text{C}$ $t=30\text{хв}$ Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км, Кх 4.1 Підтримання колекційної культури	чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час зберігання	T=- 70 °C Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН- метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	T=37°C t=48год Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 100	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура,	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН- метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	T=37°C t=36год Відсутність сторонньої

л	швидкість перемішування, чистота культури			мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.1 Виробничий біосинтез у ферментері на 1000 л	Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація доксорубіцину.	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН- метр мікробіологічний контроль, фотоколориметричний метод визначення концентрації доксорубіцину	Під час вирощування культури в ферментері, відбір проб: кожні 5 годин	T=37 ⁰ C t=36год Відсутність сторонньої мікробіоти, C = 250 мг/л

7.2.Мікробіологічний контроль мікроскопіюванням (фарбування за Грамом). Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, або з імерсійною системою на $\times 90$. При оцінці морфолого-культуральних ознак продуцента перш за все звертають увагу на характерні особливості клітин [21].

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

Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек.. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2 хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. Грам-позитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, а грам-негативні у червоний[22].

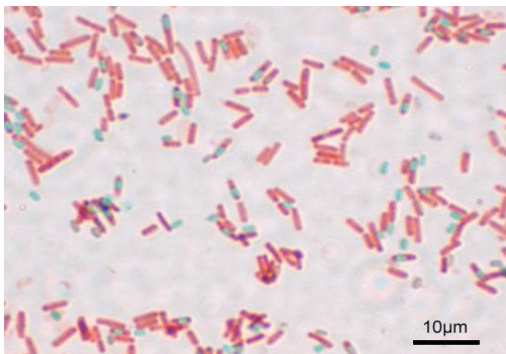


Рис 5.1, Мікроскопія *Bacillus subtilis* за грамом.

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

Визначення біомаси мікроорганізмів ваговим методом

Метод не може бути використаний при культивуванні мікроорганізмів на середовищах, до складу яких входять з'єднання, не розчинні у воді. Визначення біомаси складається з трьох послідовних операцій: доведення маси центрифужних пробірок до постійного значення, відділення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини, визначення їх маси.

Виділення мікроорганізмів центрифугуванням (отримання супернатанту).

Визначення біомаси.

Щоб визначити масу сухих клітин, центрифужну пробірку з осадом клітин мікроорганізмів поміщають в сушильну шафу, висушують і зважують. Режим висушування і зважування такий, який використовували і при визначенні маси пробірок або фільтрів. Суху біомасу визначають по формулі :

$$M = \frac{(A - B) \times 1000}{V}$$

де M — суха біомаса в г/л; A — маса центрифужної пробірки (фільтру) з осадом в г; B — маса центрифужної пробірки (фільтру) без осаду в г; V — об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) в мл.

Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища і ретельністю зважування.

Метод Коха: використовується для визначення загальної кількості бактерій.

В ряду послідовних десятикратних розведень досліджуваного зразка з 2 останніх розведень (ступінь розведення залежить від кількості КУО в 1 мл досліджуваного препарату). Роблять кілька послідовних десятикратних розведень культуральної рідини, орієнтовно 7-8 штук. Далі по 0,1 мл мікробної суспензії висівають на чашки Петрі з поживним середовищем (МПА або Гаузе-2). Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища шпателем Дрігальського або за допомогою скляних бус до повного вбирання (висихання) суспензії. Чашки закривають і поміщають перевернутими догори дном в термостат

для інкубації. Посіви інкубують при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ протягом 12- 24 год. Метод придатний для визначення лише живих клітин, та досить тривалий у часі. Після інкувації підраховують кількість колоній, що вирости після неї та множать на розведення культуральної рідини і множать на їх кількість. Після число перемножують на 1 мл суспензії і отримують кінцеве значення[23].

7.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Концентрацію амонійного азоту можна визначити методом Неслера.

Метод Неслера базується на утворенні забарвленої важкорозчинної сполуки при взаємодії реактиву Неслера (K_2HgI_4) з аміаком в нейтральних або лужних розчинах: $2\text{HgI}_4 + \text{NH}_3 + \text{OH} = \text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3 + 5\text{I}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Великого надлишку луку слід уникати, оскільки може відбутися розкладання $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ з утворенням оксиду ртуті. Забарвлена сполука $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ схильна до утворення негативно заряджених колоїдних частинок. Для отримання рівномірної і стійкої суспензії в розчин вводять захисний колоїд – желатин, полівініловий спирт. При малих концентраціях аміаку колоїдні розчини мають жовте забарвлення, при збільшенні концентрації з'являється бурий відтінок. Отримання в ході аналізу колоїдних розчинів, здатних до коагуляції, знижує відтворюваність результатів аналізу, одержуваних методом Неслера. Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Неслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400–425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Фотометричному визначенню азоту методом Неслера заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і утворюють нерозчинні сполуки з йодид-іонами та іонами ртуті (Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} і інші, що утворюють із лугом забарвлені нерозчинні гідроксиди). Щоб позбутись впливу перелічених вище іонів, до досліджуваного розчину спочатку додають 50%-ний розчин сегнетової солі $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, а вже потім – реактив Неслера.

Для отримання супернатанту використовують метод **виділення мікроорганізмів центрифугуванням**:

Для цього в центрифужну пробірку наливають точно зміряний об'єм ретельно перемішаної рідкої культури, котрий в залежності від її густини коливається від 5 до 20 мл. Час центрифугування і число обертів залежать від розмірів клітин. Чим вони менше, тим більше потрібно оборотів і тим продовжуючи повинен бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15—20 хв при 5—10 тис. обертів в хв. Після центрифугування рідину обережно зливають, осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої НС1 на 1 л води) і знов центрифугують при тому ж числі обертів. Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги. Інакше частина осаду може бути втрачена.[24]

Визначення концентрації сахарози (джерела вуглецю) ,що входить в мелясу)

Визначення масової частки сахарози в поживному середовищі буде здійснюватися за методами з використанням поляриметричних трубок різної довжини. Перед початком визначення розчин з проби освітлюють. Як освітлювач в використовують в основному ацетат свинцю, що є розчином основної солі складу $2\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$, який отримують при розчиненні свинцевого глету PbO в розчині оцтово-свинцевої солі $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, взятих в еквімолекулярних кількостях.

Ацетат свинцю освітлює розчин, осаджуючи кислоти: щавелеву кислоту, оксикислоти, білки, сапоніни, барвні речовини, пектинові речовини, продукти розкладу редукувальних речовин, меланоїдини.

Як дуже сильний освітлювач (під час аналізів утфелюостанької кристалізації та меляси) застосовують основний нітрат свинцю, який утворюється з двох розчинів: Герлес I і Герлес II. Компоненти цих розчинів – $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ і NaOH зберігаються окремо. Використовують кожного реагенту по 7-10 см³. Для освітлення в розчин меляси додають в 3-4 прийоми рівними частинами: спочатку додають 2-3 см³ розчину нітрату свинцю, а після перемішування – 2-3 см³ розчину їдкого натру.

Концентрації розчинів Герлес I і Герлес II підбирають так, щоб утворився основний ацетат свинцю.

Об'ємний метод визначення сахарози ґрунтується на тому, що в мірну колбу з двома мітками (100/110 або 50/55 см³) наливають до першої мітки досліджуваний розчин, потім додають освітлювач, доводять об'єм розчину в колбі дистильованою водою до другої мітки. Вміст колби перемішують, фільтрують через один паперовий фільтр, а фільтрат заливають у поляриметричну кювету і визначають за допомогою поляриметра величину поляризації .

Масову частку сахарози, %, в досліджуваному розчині знаходять за формулою:

$$C_x = \frac{0,26 \cdot P_{200} \cdot 1,1 \cdot 100}{100 \cdot d} = \frac{0,26 \cdot P_{200} \cdot 1,1}{d} \%,$$

де 1,1 – коефіцієнт, який враховує розбавлення розчину в колбі 100/110 см³ або 50/55 см³; 100 – об'єм нормальної колби, см³; d – густина розчину, г/см³ .[25]

Список використаної літератури :

1. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – ст: 102-354
2. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://vagcel.ru/uk/obsledovanie-i-operacii-na-pochkah/lechenie-disbakterioza-bakterialnye-preparaty-primenyaemye-dlya.html>
3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <file:///C:/Users/ZAV/Downloads/90038-272609-1-PB.pdf>
- 4.[Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.imiamn.org.ua/journal/4_2014/PDF/3.pdf
5. [Електронний ресурс] - Режим доступу: file:///C:/Users/ZAV/Downloads/Zdzh_2013_7_18.pdf
- 6.[Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://uapatents.com/7-109232-sposib-viznachennya-efektivnosti-vikoristannya-biosporinu-i-subalinu-dlya-individualnogo-likuvannya-zakhvoryuvan-viklikanikh-umovno-patogennoyu-i-patogennoyu-mikrobiotoyu.html>
7. [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://biopharma.com.ua/preparats/biosporin/>
- 8.[Електронний ресурс] - Режим доступу: [file:///C:/Users/ZAV/Downloads/54750-111311-1-SM%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/ZAV/Downloads/54750-111311-1-SM%20(1).pdf)
- 9.Среда для культивирования бактерии-симбионта *Bacillus pulvifaciens* или *Bacillus subtilis* – продуцента -пробиотика/ Полянцев, Н.И., Робаева Л.В., Подберезный В.В. – Оpubл.27.12.1997
10. Патент РФ № 2432393. Способ производства пробиотического препарата на основе спорообразующих *Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis* /Иваненко А. А. Оpubл.27.10.2011
11. Патент РФ № 2169767. Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, обладающий широким спектром антагонистической активности и устойчивостью к антибиотикам / Байгузина Ф.А Кузнецова Т.Н. Баданова С.С. – Оpubл. 27.06.2001

12. О. О. Нечипуренко, М. А. Хархота, Л. В. Авдєєва. Вплив джерел карбону, нітрогену та солей металів на продуктивність каротинсинтезувальних штамів *Bacillus subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. Мікробіологічний журнал-2010. – Т. 72, № 6. – С. 46–51.
13. [Електронний ресурс] - Режим доступу: https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BF%D0%BE%D1%81%D0%BE%D0%B1%D0%B8_%D0%B6%D0%B8%D0%B2%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F_%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D1%96%D0%B7%D0%BC%D1%96%D0%B2
14. Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://studfile.net/preview/2299661/page:24/>
15. <https://svyat.kyivcity.gov.ua/news/25786.html>
16. <http://myrgorod.pl.ua/news/jak-vberegtyjsja-vid-gostryh-kyshkovyh-infektsij-ta-harchovyh-otrujen>
17. <https://compendium.com.ua/dec/341518/>
18. [Електронний ресурс] - Режим доступу https://studopedia.com.ua/1_229434_tehnika-farbuвання-za-gramom.html
19. Пирог. Т.П., Ігнатова О.А Загальна біотехнологія: - К : НУХТ, 2009 – ст 47-102
20. [Електронний ресурс] - <https://www.add.ua/hlorantoin-1kg.html>
21. [Електронний ресурс] - Режим доступу http://mikrobiologiyahvtk.blogspot.com/2017/03/blog-post_9.html
22. https://studopedia.com.ua/1_229434_tehnika-farbuвання-za-gramom.html
23. [Електронний ресурс] - Режим доступу <http://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-lb11.pdf>
24. Загальні технології харчової промисловості: Лабораторний практикум . для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» за освітньо-кваліфікаційним рівнем «бакалавр» денної форми навчання / Уклад.: С.П. Олянська, О.В. Грабовська, О.М. Молодницька –К.: НУХТ, 2014.–ст 15
25. [Електронний ресурс] - Режим доступу <https://studfile.net/preview/5194726/page:3/>

26. Ферментер. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://bio-rus.ru/primeryi-specyfikaczi/?page=2>
27. Реактори типа «СРЕН» , интернет магазин: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pwg.in.ua/>
28. Насоси відцентрові Електронний ресурс: [режим доступу] : https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/nasosyi_s_vortex_impellerom
29. Фільтри для стисненого повітря. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.omega-air.com.ua/filtr-szhatogo-vozduha-whfit-seriya>
30. Дозатори об'ємно-вагові: Електронний ресурс: [режим доступу] <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/29>
31. [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00030.
32. [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00240
33. [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00340
34. [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00250
35. [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00300
36. [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00290
37. [Електронний ресурс] - Режим доступу: http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00260
38. Патент [48073-96534-1-PB \(1\) \(1\).pdf](#)