

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)  
Наталія Грегірчак  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » червень 2022 р.

«До захисту допущено»  
Завідувач кафедри  
Віктор Стабніков  
(підпис) (прізвище та ініціали)

« \_\_\_ » червень 2022 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 використання у рослинництві

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 2

Вовк Тетяна Андріївна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Слободян Ольга Петрівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Алла ТИМЧУК  
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2022 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології  
і мікробіології  
Віктор СТАБНИКОВ  
“ 04 ” квітня 20 22 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВОВК Тетяни Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus subtilis* для використання у  
рослинництві  
керівник роботи СЛОБОДЯН Ольга Петрівна к. т. н., доц.  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)  
затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кс
2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022
3. Вихідні дані до роботи *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, ферментер об'ємом  
1 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,5
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
характеристика цільового продукту, обґрунтування вибору та характеристика  
біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування  
вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної  
схеми, контроль виробництва \_\_\_\_\_
5. Перелік графічного матеріалу  
Апаратурна схема формату А1 – 1 аркуш, технологічна схема формату А1 –  
1 аркуш

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	04.04.2022-11.04.2022	
2	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	11.04.2022-18.04.2022	
3	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	18.04.2022-25.04.2022	
4	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	25.04.2022-02.05.2022	
5	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	02.05.2022-09.05.2022	
6	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	09.05.2022-23.05.2022	
7	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	23.05.2022-01.06.2022	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Тетяна ВОВК** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Ольга СЛОБОДЯН** \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота присвячена одержанню біомаси *Bacillus subtilis* для використання у рослинництві з використанням штаму *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 . Даний штам синтезує цільовий продукт за коротший термін (24 год.) і на дешевшому середовищі (0,53 грн./л), по відношенню до інших порівнювальних продуцентів.

Робота складається зі вступу, семи розділів, графічної частини (технологічної і апаратурної схеми) та списку використаної літератури з 43 найменувань. Загальний обсяг проекту 69–сторінок, 2 рисунків, 10 таблиць, 2 креслення формату А1.

У роботі дано обґрунтування та викладено технологічний процес біосинтезу *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 для використання у рослинництві, який включає блок допоміжних робіт (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері.

Наведено склад поживного середовища для культивування *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. З урахуванням складу поживного середовища запропоновано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу.

Технологічна і апаратурна схема процесу представлена у графічній частині проекту на 2 аркуша формату А1.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, біопрепарат, біосинтез

## ЗМІСТ

<u>РЕФЕРАТ</u> .....	
<u>ВСТУП</u> .....	7
<u>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</u> .....	7
<u>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</u> .....	13
<u>2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування</u> .....	13
<u>2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента</u> .....	21
<u>2.3. Таксономічний статус біологічного агента</u> .....	23
<u>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</u> .....	24
<u>3.1. Потреба у цільовому продукті</u> .....	24
<u>3.2. Розрахунок потужності виробництва</u> .....	26
<u>3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів</u> .....	27
<u>3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу</u>	
<u>РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</u> .....	31
<u>4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу</u> .....	31
<u>4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера</u> .....	30
<u>4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря</u> .....	34
<u>4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів</u> .....	35
<u>4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища</u>	
<u>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</u> .....	40
<u>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</u> .....	45
<u>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</u> .....	58
<u>7.1. Мікробіологічний контроль</u> .....	58
<u>7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту</u> .....	59
<u>7.2.1. Концентрація цільового продукту (біомаси)</u> .....	59
<u>7.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту</u> .....	60
<u>ЛІТЕРАТУРА</u> .....	64

## ВСТУП

Інтенсивне застосування мінеральних добрив і пестицидів у рослинництві дає можливість покращити розвиток культурних рослин і підвищити їх врожайність. Проте такий підхід супроводжується забрудненням довкілля хімічними речовинами, що негативно впливає на природні екосистеми та здоров'я людей. Тому сьогодні все більшої актуальності набуває питання про обмеження застосування хімічних добрив і пестицидів у рослинництві та більш широкої біологізації цієї галузі виробництва шляхом впровадження мікробних препаратів для підвищення врожайності рослин, їх захисту від фітопатогенів і фітофагів[1].

Для досягнення цієї мети створюються мікробні препарати для рослинництва на основі окремих високоефективних штамів мікроорганізмів. Ці препарати значно стимулюють ріст і розвиток рослин і підвищують їх врожайність. Однак ще помітніший вплив зазвичай спричиняють препарати комплексної дії, що створюються шляхом застосування двох або більшої кількості штамів бактерій [2].

Високоактивні штами бактерій роду *Bacillus*, здатні мобілізувати фосфор з його органічних та важкорозчинних неорганічних сполук. Ці мікроорганізми характеризуються високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів і бактерій. На основі фосфатмобілізуючих та азотфіксуючих бактерій створені мікробні композиції і гранульовані бактеріальні препарати комплексної дії на рослини. Ці препарати характеризуються високим вмістом життєздатних клітин. Вони істотно покращують розвиток рослин і підвищують їх врожайність [3].

На основі багаторічних досліджень взаємодії бактерій, що стимулюють ріст рослин, з глинистими мінералами співробітниками Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України розроблено

					НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Вовк Т.А.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Слободян О.П.					5	2
Реценз.					Кафедра БТМ <sup>7</sup>		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

гранульований комплексний бактеріальний препарат для рослинництва АЗОГРАН.

Він є мікробним препаратом нового покоління, значно покращує ріст, розвиток рослин і істотно підвищує їх врожайність. До складу препарату введені два високоактивні штами бактерій. Одним з них є штам азотфіксуючих бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076, які характеризуються не тільки високою активністю фіксації молекулярного азоту, його перекладу в мінеральні форми, але і здатністю синтезувати біологічно активні речовини фітогормональної природи, що стимулюють ріст і розвиток рослин. Другим штамом, який введений до складу гранульованого комплексного бактеріального препарату, є фосфатмобілізуючих бактерії *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023. Ці бактерії здатні підвищувати доступність для рослин фосфору, який входить до складу органічних сполук у ґрунті і важкорозчинних неорганічних речовин. Ці фосфатмобілізуючих бактерії також здатні синтезувати і виділяти в навколишнє середовище біологічно активні речовини. Крім того, вони помітно пригнічують розвиток широкого кола фітопатогенних бактерій і грибів, здатних викликати хвороби рослин. Таким чином, препарат АЗОГРАН покращує азотне і фосфорне живлення рослин, стимулює їх ріст і розвиток біологічно активними речовинами і захищає рослини від хвороб, що викликаються фітопатогенними грибами і бактеріями.

Отже, **актуальність** даної роботи є біологізації у рослинництві шляхом виробництва мікробних препаратів. **Новизною** є використання штаму *Bacillus subtilis* 5-РК для одержання препарату, що поліпшує фосфорне живлення рослин за рахунок його мобілізації із важкорозчинних неорганічних (трикальційфосфат) і органічних сполук (гліцерофосфат, фітин), що захищає рослини від фітопатогенів і підвищує врожайність овочевих культур [4].

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Особливо перспективними для рослинництва є комплексні мікробні препарати, створені на основі двох чи більшої кількості штамів, що забезпечують синергічний позитивний вплив на онтогенез рослини і їх продуктивність[5].

Одним із таких препаратів є Азогран — це новий комбінований бактеріальний препарат комплексної дії. Він містить в своєму складі два біологічні компоненти (агента) –біопротектор *Bacillus subtilis* і біостимулятор *Azotobacter vinelandii* (поєднання двох бактеріальних культур для більш широкого спектру дії) [6].

Першим компонентом є *Bacillus subtilis* – відомий антагоніст широкого спектру збудників корневих та плодкових гнилей, а також грибкових і бактеріальних хвороб рослин. Має здатність до фосфат мобілізації (локального розчинення важкорозчинних фосфатів ґрунту і переведення їх в доступні для рослин хелатні форми), а як відомо до 70% фосфору ґрунту знаходиться у складі важкорозчинних органофосфатів і є не доступними для рослин. Таким чином, *Bacillus subtilis* не тільки захищає рослини від хвороб, але і значно покращує їх фосфорне живлення.

Другим компонентом є *Azotobacter vinelandii*– який має азотфіксуючі властивості (переводить азот з повітря в амонійні сполуки, що доступні для рослин), збагачуючи ґрунти амонійними джерелами азоту і покращуючи азотне живлення рослин. *Azotobacter vinelandii* також є активним продуцентом біологічно активних речовин, біостимуляторів росту. Саме тому, азотобактер вважають основним чинником родючості ґрунту [7].

					НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Розроб.	Вовк Т. А.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Слободян О.П.					7	4
Реценз.					9		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.						

Діючим біологічним агентом у даному препараті є комбінація двох корисних мікроорганізмів: *Bacillus subtilis* IMB B-7023, що забезпечує бактеріальний захист рослин від фітопатогенів та *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076, що є активним азотфіксатором і продуцентом рістстимулюючих речовин.

В даний час Азогран виготовляється в гранульованій, сипкій і рідкій формах[8].



*Рис. 1.1.Форми випуску Азогран*

Дія на рослину: Препарат ефективно стимулює енергію проростання насіння і його схожість до 25 %. Збільшує врожайність озимих до 18% і ярих культур до 25%, овочевих на 30 % і більше. Ефективно бореться зі збудниками бактеріальних і грибкових інфекцій, та корневих гнилей [9].

Окрім позитивного впливу на кореневе живлення рослин, цей препарат має антагоністичний вплив на широкий спектр фітопатогенних мікроорганізмів [10–11], також він здатний пригнічувати деякі види фітофагів [12].

Ефект від застосування: Азогран забезпечує підвищення урожаю зернових, овочевих та технічних культур на 15-40 %.

Застосування препарату забезпечує:

- більш раннє проростання паростків, більш інтенсивний ріст і розвиток рослин;
- постачання рослинам зв'язаного азоту;
- покращення фосфорного живлення рослин;
- підвищення польової схожості й енергії проростання насіння;
- формування розвиненої кореневої системи;
- збільшення кореневої та наземної маси рослин;
- інтенсифікацію використання поживних речовин;
- підвищення коефіцієнту засвоєння мінеральних добрив;
- підвищення стійкості рослин до захворювань;
- покращення фітосанітарного стану ґрунту;
- збільшення кількості квітконосів (для декоративних культур).

**Застосування:** Технологія застосування: передпосівна обробка насіння, внесення в ґрунт, обробка рослин по вегетації.

*Таблиця 1.1*

### Культура та норма витрати

Культура	Норма витрати препарату, г/л/сотку	Мета застосування	Спосіб та час обробки	Кількість обробок
Овочеві (картопля, помідори, огірки, капуста, та інш.) Декоративні та квіткові рослини	20г/10л води/2 сотки	Для стимуляції росту та розвитку рослин, та захисту від корневих гнилей	Полив ґрунту при висадці розсади	1
Зернові (жито, пшениця, овес, ячмінь)	10г/2л води/10 кг насіння	Для стимуляції росту та розвитку рослин, та захисту від корневих гнилей	Замочування насіння перед сівбою	1

1. Препарат по вегетації застосовують як регулятор росту.

2. Препаратом рекомендовано обробляти солому разом з препаратом «Триходермин БТ» (деструкція соломи). Після обробки солому необхідно задискувати. При такому агроприйомі поліпшується розкладання соломи, фітосанітарний стан полів, підвищується біологічна активність ґрунту. Якщо кількість соломи на полі не перевищує 3 т, то вносити додатково мінеральні добрива не варто. Досить буде роботи азотфіксуючих бактерій.

**Сумісний з хімічними протруйниками:** Вітавакс, Фундазол, Раксіл та іншими, від використання яких можна відмовитись.

Обробку насіння проводити напередодні або в день посіву. Внесення в ґрунт – сівалкою, саджалкою картоплі при посіві. Обробку насіння проводять механізовано із застосуванням машин для протруювання, при посіві, якщо сівалка має відповідні пристрої, або вручну ранцевим розприскувачем.

**Застереження:** оброблене насіння захищають від попадання прямого сонячного проміння.

**Зберігання:** зберігати в сухому темному приміщенні при температурі від 4°С до 20°С. Термін придатності 6 місяців.

Азогран – зареєстрований препарат, відповідає санітарно-гігієнічним нормам, не токсичний, безпечний для людини, теплокровних, бджіл та інших комах, сільськогосподарських культур, не викликає забруднення навколишнього середовища (4 клас токсичності). Виробляється за ліцензією Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України [13].

## РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Азогран – покращує ріст і розвиток декоративних, квіткових, хвойних рослин, забезпечує підвищення врожаю зернових, овочевих та технічних культур на 15 - 40 %. До складу препарату введено фосфатмобілізувальні бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7023 – антагоніст широкого спектра фітопатогенів – збудників корневих гнилей, грибних і бактеріальних хвороб рослин. Має здатність до фосфатмобілізації (забезпечує перехід нерухомих сполук фосфору ґрунту у форми, доступні для рослин), що еквівалентно внесенню понад 100 кг фосфорних добрив у фізичній вазі. Підвищує коефіцієнт засвоєння мінеральних добрив [14].

У таблиці 2.1 наведено порівняння складу поживного середовища для одержання *Bacillus subtilis*

					НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вовк Т. А.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.					11	12
Реценз.						13		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 2.1

## Порівняльна характеристика продуцентів

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація, КУО/мл	Особливості процесу біосинтезу	Джерело
	Компонент	Концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	Меляса Кукурудзяний екстракт K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O NaCl CaCO <sub>3</sub>	15,0 2,0 0,2 0,2 0,3 0,3 3,0	24	1,3·10 <sup>10</sup>	Колби Ерленмейера, об'ємом 0,75л. t <sup>0</sup> =28 <sup>0</sup> C, значення масопереносу кисню 0,4-0,6 г O <sub>2</sub> /л·год рН – 6,8 – 7,2	Царенко И.Ю. Оптимизация питательной среды для культивирования <i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023 / И. Ю. Царенко, А. А. Рой, И. К. Курдиш // Микробиологический журнал. - 2011. - Т. 73, № 2. - С. 13-19

Закінчення табл. 2.1

<i>Bacillus subtilis</i> ІБ-22	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	24	(1,6±0,2)10 <sup>8</sup>	Бацилли вирощують у періодичних умовах при 28 °С на качалці (240 об/хв) в колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл	И. А. Скороход, А. А. Рой, А. И. Мелентьев, И. К. Курдиш Влияние биологически активных веществ фосфатминерализующих штаммов рода <i>Bacillus</i> на семена растений, подвергнутые оксидативному стрессу / <u>Мікробіологія і біотехнологія</u> . - 2013. - № 2. - С. 41-51.
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,3				
	NaCl	0,3				
	KCl	0,3				
	MnSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,0013				
	FeSO <sub>4</sub>	0,001				
	CaCO <sub>3</sub>	5,0				
	Гліцерофосфат кальція	2,0				
	Глюкоза	10,0				
<i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	72	(2,1±0,1)10 <sup>8</sup>	Середовище розливають по 100мл у колби Ерленмейер вирощують при перемішуванні (240 об/хв) протягом 3 діб при 28°С, рН=6,5-7,0	Деклараційний патент України № 54923А. Штамм <i>Bacillus subtilis</i> для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
	MgSO <sub>4</sub>	0,2				
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2				
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2,0				
	Глюкоза	10,0				
	Дріжджовий екстракт	2мл				

З таблиці 2.1 бачимо, що у *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 за 24 год культивування кількість життєздатних клітин бацил сягала  $1,3 \cdot 10^{10}$  КУО/мл. Цей показник є найбільшим серед наведених штамів [15].

На наступному етапі порівнювали вартість поживних середовищ (табл. 2.2) з метою визначення їх рентабельності для культивування того чи іншого продуцента цільового продукту.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживних середовищ для культивування *Bacillus subtilis*

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
Bacillus subtilis ІМВ В-7023	Меляса	15	18	0,27	1
	Кукурудзяний екстракт	2	100,8	0,2016	2
	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,2	120	0,024	1
	$KH_2PO_4$	0,2	72	0,0144	2
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3	15	0,0045	2

Продовження табл. 2.2

	NaCl	0,3	6	0,0018	1
	CaCO <sub>3</sub>	3	5	0,015	1
<b>Вартість 1 л середовища -0,53 грн</b>					
Bacillus subtilis ІБ-22	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	50	0,025	2
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,3	15	0,0045	2
	NaCl	0,3	6	0,0018	1
	KCl	0,3	18	0,0054	2
	MnSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,0013	120	0,000156	2
	FeSO <sub>4</sub>	0,001	38	3,8E-06	2
	CaCO <sub>3</sub>	5	5	0,025	1
	Гліцерофосфат кальція	2	196	0,392	4
	Глюкоза	10	29.40	0,294	3
	<b>Вартість 1 л середовища -0,74 грн</b>				

Закінчення табл. 2.2

Bacillus subtilis IMB B-7023	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	50	0,025	2
	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,2	15	0,003	2
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2	45,99	0,009198	2
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2	54	0,02508	2
	Глюкоза	10	29.40	0,294	3
	Дріжджовий екстракт	2	1 100	2,2	2
	<b>Вартість 1 л середовища -2,55 грн</b>				
Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2021 р. 1 - <a href="http://www.kiev.flagma.ua">www.kiev.flagma.ua</a> , 2 - <a href="http://prom.ua">http://prom.ua</a> , 3 - <a href="https://www.systopt.com.ua">https://www.systopt.com.ua</a> ; 4 - <a href="https://www.chemicalbook.com">https://www.chemicalbook.com</a>					

Завдяки табл. 2.2 бачимо, що вартість середовища у *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 є найвигіднішою. Запропонований склад середовища значно дешевший від інших середовищ, які використовуються для культивування мікроорганізмів цього виду, і може бути рекомендований для використання як в лабораторних, так і в виробничих умовах [15]. Щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Щоб заповнити табл. 2.3, потрібно розрахувати теоретичний вихід біомаси для усіх біологічних агентів.

*Розрахунок біомаси для Bacillus subtilis ІМВ В-7023 з середовищем із м'ясою і кукурудзяним екстрактом*

Концентрація доступного для бактерій органічного Нітрогену (за елементом N) у кукурудзяному екстракті становить 1,9 %. Отже, у 2 г кукурудзяного екстракту міститься  $(1,9 \times 2) / 100 = 0,038$  г Нітрогену. Крім того, аміний Нітроген входить до складу м'яси (0,5 % до маси сухих речовин).

Розрахуємо кількість Нітрогену, що міститься у 15 г м'яси. Вміст сухих речовин у м'ясі становить 75 %, тобто у 15 г м'яси міститься  $15 \times 0,75 = 11,25$  г сухих речовин. Отже, вміст амінного Нітрогену у м'ясі становить  $(0,5 \times 11,25) / 100 = 0,05625$  г. Сумарний вміст Нітрогену у кукурудзяному екстракті та м'ясі становить  $0,038 + 0,05625 = 0,09425$  г/л. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,09425 г азоту можна одержати:

0,9425 г/л біомаси.

*Розрахунок біомаси для Bacillus subtilis ІБ-22 з середовищем із сульфат амонієм*

Вміст азоту в біомасі бактерій становить 10 – 14% від маси сухої речовини. Для визначення рівня біомаси, якого можна досягнути при культивуванні бактерій на середовищі з 0,5 г/л сульфат амонію потрібно розрахувати вміст елементного азоту в даній солі. Молекулярна маса  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -132.13952. Отже, у 132.13952 г сульфат амонію міститься 28.0134 г азоту, а в 0,5 г цієї солі вміст азоту становить

$(0,5 \cdot 28,0134) / 132,13952 = 0,105$  г. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,105 г азоту можна одержати 1,05 г/л біомаси.

*Розрахунок біомаси для Bacillus subtilis IMB B-7023 з середовищем із дріжджовим екстрактом і сульфат амонієм*

У дріжджовому екстракті загальний вміст азоту становить 4%. Отже, у 2 г дріжджового екстракту міститься  $(4 \times 2) / 100 = 0,08$  г Нітрогену. Концентрація доступного для бактерій органічного азоту (за елементом N) у  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  становить 21%. Отже, у 0,5 г сульфату амонію міститься  $(21 \times 0,5) / 100 = 0,105$  г азоту.

Вміст азоту в біомасі бактерії становить 10 – 14 % від маси сухої речовини. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то із дріжджового екстракту і сульфат амонію  $(0,08 + 0,105 = 0,185$  г) можна одержати: 1,85 г біомаси.

Таблиця 2.3

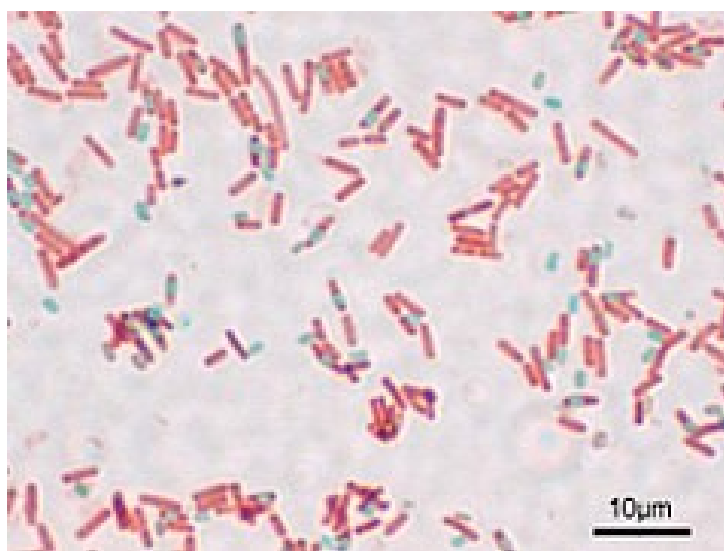
Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні *Bacillus subtilis*

Біологічний агент	Теоретично можливий рівень біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість цільового продукту, синтезованого за год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/л
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus subtilis</i> ІМВ В-7023	0,9425	24	0,039	0,53	0,56
<i>Bacillus subtilis</i> ІБ-22	1,05	24	0,043	0,74	0,70
<i>Bacillus subtilis</i> ІМВ В-7023	1,85	72	0,025	2,55	1,37

Найважливішою стадією у виробництві бактеріальних препаратів є отримання максимуму біомаси їх компонентів за мінімальний час культивування з досягненням максимального економічного ефекту[16]. Отже, з табл 2.3 бачимо, що економічно вигіднішим є виробництво *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 на середовищі з м'ясою і кукурудзяним екстрактом.

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

*Bacillus subtilis* (сінна паличка) – безбарвні колонії або сірувато-білі, трохи зморшкуваті або утворюють бархатистий наліт, край хвилястий, розгалужений, щільно прилягає до агарового середовища. Палички короткі й тонкі завдовжки 3 – 6 мкм. Спори овальні, розташовані ексцентральні.



**Рис. 2.2.1. *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* на КА формують великі зморщені колонії 10–15 мм, непрозорі, світло-кремового кольору із хвилястим краєм. У м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) бактерії ростуть у вигляді зморщеної плівки з утворенням пластівцевого осаду. Клітини в мазках із бульйонних культур розміщуються поодиноці або інколи утворюють ланцюжки по 2–3 клітини. Бактерії аероби засвоюють глюкозу, сахарозу, арабінозу, лактозу, мальтозу, манозу, манітол, сорбітол, інозитол; відношення до рамнози, галактози, рафінози варіабельне. Розріджують желатин та крохмаль, редукують лакмусову сироватку, не

засвоюють сечовину, оксидазонегативні і каталазопозитивні.

### **Морфолого-культуральні ознаки**

Як і всі представники цього роду, клітини *Bacillus subtilis* мають форму бруса із закругленими кінцями. Вони мають ширину приблизно 1 мкм та довжину 2-3 мкм. Вони зустрічаються окремо або в невеликих ланцюжках.

При спостереженні під мікроскопом у центрі бактеріальної клітини видно сферичну спору, яка не змінює форму бактерій.

На культурах кров'яного агару вони утворюють колонії, які можуть здаватися гладкими, грубими або слизовими. Його краї можуть бути розправлені посередині або бути хвилястими. Середній розмір колоній становить від 2 до 4 мм у діаметрі.

Бактеріальна клітина має товсту клітинну стінку, що складається з пептидоглікану, відомого як муреїн. Що стосується геному, то бактерія має єдину кругову хромосому, яка містить 4100 генів, що кодують експресію певних білків.

З поверхні клітини відриваються деякі розширення, джгутики. Вони сприяють рухливості клітини.

### **Фізіолого-біохімічні ознаки**

Піддаючись процесу фарбування за Грамом, бактерії набувають типового фіолетового забарвлення для грампозитивних бактерій. Це пов'язано з наявним у його клітинній стінці пептидогліканом.

З іншого боку, коли бактерії вирощуються на кров'яному агарі, спостерігається повний характер гемолізу. Це ставить їх до групи бета-гемолітичних бактерій, здатних викликати повний лізис еритроцитів.

Коли справа стосується метаболізму, *Bacillus subtilis* здатний гідролізувати тригліцериди, але не фосфоліпіди або казеїн.

Донедавна вважалося, що ця бактерія є суворою аеробною. Однак останні дослідження показали, що він може вижити в середовищі без наявності кисню. В анаеробних умовах ферментація може здійснюватися за

допомогою бутандіольного шляху. Ви також можете провести амонізацію нітратами.

*Bacillus subtilis* це вид бактерій, який можна зустріти в різних середовищах. Він був ізольований від наземного та водного середовища. Однак, перебуваючи в оточенні ворожих умов, він має механізм виживання.

Цей механізм полягає у виробництві спор, які мають високу стійкість до мінливих умов зовнішнього середовища. Як тільки навколишнє середовище знову сприятливе, спори проростають і бактерії починають знову розмножуватися.

Серед його властивостей можна зазначити, що він має фермент каталази, що дозволяє йому розділяти молекулу пероксиду водню на її складові: воду та кисень.

Іншими важливими ферментами, які він має, є нітрат-редуктази, особливо дві, які є унікальними. Один з них використовується для засвоєння нітрату водню, а другий - для дихання нітрату.

Що стосується екологічних вимог, то *Bacillus subtilis* Він може рости і розвиватися при температурі від 15 ° C до 55 ° C. Він також здатний виживати в сольових концентраціях до 7% NaCl[17].

### **2.3. Таксономічний статус біологічного агента**

Згідно з дев'ятим виданням керівництва Бергі з систематики бактерій *Bacillus subtilis* належить[18]:

Царство: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *Bacillus subtilis*

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Однією з найважливіших сільськогосподарських культур України є пшениця озима, посівні площі якої складають понад 6 млн га. Для покращення росту і розвитку рослин, поряд з використанням мінеральних добрив, розроблено низку мікробних препаратів, застосування яких в агроecosистемах дозволяє корегувати мікробні процеси в кореневій зоні і суттєво підвищувати урожайність сільськогосподарських культур [5].

За даними на сайті Державної служби статистики України станом на 2020 рік можна побачити, що обсяг унесених мінеральних добрив, а саме добрива комплексні азотно-фосфорні до яких належить Азогран у фізичній масі склала 167038,7 т, а обсяг добрив унесених для збільшення врожайності пшениці склала 51857,7 т. [19].

					НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Вовк Т. А.						
Перевір.		Слободян О.П.					23	7
Реценз.						26		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

## Порівняння обсягу внесення мінеральних добрив на ринку України

Таблиця 3.1

<b>Унесення мінеральних добрив за видами під урожай сільськогосподарських культур 2020 року</b>			
<i>Use of inorganic fertilizers by type for the harvest of agricultural crops in 2020</i>			
Добрива	Код виду засобу / <i>Code of fertilizer type</i>	Обсяг унесених мінеральних добрив, т / <i>The volume of inorganic fertilizers, tonnes</i>	
		у фізичній масі / <i>in physical mass</i>	у поживних речовинах / in nutrients
<b>Під урожай звітного року / <i>For the harvest of the reporting year</i></b>			
Добрива мінеральні азотно-фосфорні	FRNP	382191,0	204901,7
Амофос (моно-амонійфосфат)	2401	176293,8	112827,3
Діамонійфосфат	2402	38858,5	25258,4
Добрива комплексні азотно-фосфорні інші	2409	<b>167038,7</b>	66816,0
<b>Пшениця / <i>Wheat</i></b>			
Добрива мінеральні азотно-фосфорні	FRNP	112931,1	59924,9
Амофос (моно-амонійфосфат)	2401	51599,4	33023,4
Діамонійфосфат	2402	9474,0	6158,5
Добрива комплексні азотно-фосфорні інші	2409	<b>51857,7</b>	20743,0

\* Примітка: дані щодо посівів площ на сезон 2020 року в Україні наведено згідно Державної служби статистики:

[http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2018/sg/vmod/arch\\_vmodsg\\_u.htm](http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2018/sg/vmod/arch_vmodsg_u.htm)

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

Розрахунок будемо проводити на прикладі «УКРПРОМІНВЕСТ-АГРО» - однієї із провідних вертикально-інтегрованих агропромислових компаній України. Площа для засіву озимої пшениці складатиме 1100000 га [20].

Будемо вважати, що 90% полів для пшениці будуть обробляти Азограном.

100% - 1100000га

90%- x -?

X= 990000 га

На сьогоднішній день наявні підписані ліцензійні договори на використання технології випуску комплексного бактеріального препарату Азогран (Україна): ДП «Ензим» м. Ладижин, Вінницької обл.; «Аграрні біотехнології», м. Харків; «Агро-Адмірал», м.Одеса; «Біохім-Сервіс», м. Харків [21].

Для збільшення врожайності до 18% по вегетації препарат потрібно внести 1 раз з розрахунку 10г/2л води/10 кг насіння. Згідно з численними рекомендаціями, оптимальна норма висіву становить 4,0-5,0 млн. насіннин на 1 га, або 200-250 кг/га [22]. Для обробки 1 гектару потрібно обробити 250 кг насіння.

Оскільки на 10 кг насіння використовують 10 г препарату, то для обробки 1 га потрібно 250 г препарату.

1 га- 250 г

990000га –x?

X= 247500000 г або 247500 кг

На сьогоднішній день існує 4 виробники даного біодобрива, ми можемо вважати, що ми покриємо потребу у препараті для обробки насіння на 100%.

Згідно інформації, яка наведена в патенті, для виготовлення 784 г препарату, потрібно 150 мл суспензії *Bacillus subtilis* IMB B-7023[23]. Отже, для отримання 247500 кг препарату нам потрібно виготовити:

784 г- 150 мл

247500000г- х?

$X=47353316$  мл або  $47353,316$  л

Враховуючи сумарні втрати цілового продукту при виділенні (близько 10 %) необхідно отримати таку кількість культуральної рідини

$V_{кр} = 47353,316 / (1-0,10) = 52615$  л

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

Для забезпечення «УКРПРОМІНВЕСТ-АГРО» біодобривом, яке необхідно виготовити у кількості 247500000 г або 247500 кг; потрібно виробити 52615 л або  $52,615 \text{ м}^3$  – *Bacillus subtilis* IMB B-7023 за рік.

$G_{нт} - 52,615 \text{ м}^3$

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

Для проведення подальших розрахунків приймемо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 24 + 8 = 32 \text{ год,}$$

де  $T_{ф}$  – час культивування;  $T_{по}$  – час проведення підготовчих операцій (миття та огляд апарата (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год));

$K_1$  – коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) приймемо  $K_1 = 1,1$ . Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях

виділення готового продукту), частка  $E_{CB} = 0,15$ . СР в готовому продукті, частка (0,9-0,95)

Мінімально можлива кількість робочих днів, які можуть бути використані для виробництва продукції, становить 30 днів, максимальна – 330 днів. Приймаємо кількість робочих трудоднів 140 ( $T_{рд}$ ).

Кількість ферментацій (циклів) на рік

$$N_{цк} = 24 * T_{рд} / T_{цф}$$
$$N_{цк} = 24 * \frac{140}{32} = 105 \text{ циклів}$$

Кількість продукту за цикл, кг /цикл

$$G_{цк} = G_{нт} / N_{цк}$$
$$G_{цк} = \frac{52,615}{105} = 0,5 \text{ кг /цикл}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні  $E_{CB}$ ,  $m^3$

$$V_{кр} = K1 \cdot G_{цк} * CР_{гп} / X_{кр} \cdot (1 - E_{CB})$$

Для розрахунку об'єму культуральної рідини необхідної для виготовлення 425000 г потрібно розрахувати теоретично можливий вихід біомаси із середовищем наступного складу (г/л): М'яса-15,0, Кукурудзяний екстракт-2,0,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ -0,2,  $KH_2PO_4$  -0,2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,3,  $NaCl$ -0,3,  $CaCO_3$ -3,0[1].

Концентрація доступного для бактерій органічного Нітрогену (за елементом N) у кукурудзяному екстракті становить 1,9 %. Отже, у 2 г кукурудзяного екстракту міститься  $(1,9 \times 2) / 100 = 0,038$  г Нітрогену. Крім того, аміний Нітроген входить до складу м'яси (0,5 % до маси сухих речовин). Розрахуємо кількість Нітрогену, що міститься у 15 г м'яси. Вміст сухих речовин у м'ясі становить 75 %, тобто у 15 г м'яси міститься  $15 \times 0,75 = 11,25$  г сухих речовин. Отже, вміст амінного Нітрогену у м'ясі становить  $(0,5 \times 11,25) / 100 = 0,05625$  г. Сумарний вміст Нітрогену у кукурудзяному екстракті та м'ясі становить  $0,038 + 0,05625 = 0,09425$  г/л.

Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,09425 г азоту можна одержати: 0,9425 г/л біомаси.

Концентрація біомаси в КР, г/л

$$X_{кр} = 0,9425 \text{ г/л}$$

$$V_{кр} = 1,1 \cdot 0,5 \cdot \frac{0,9}{0,9425} \cdot (1 - 0,15) = \frac{0,792}{0,801125} = 0,44 \text{ м}^3$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера,  $V_{\phi}$ ,  $\text{м}^3$

$$V_{\phi} = V_{кр} / (1 - E_{\phi})$$

$E_{\phi}$ - втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1- 0,2)

$$V_{\phi} = 0,44 / (1 - 0,1) = 0,48 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера,  $\text{м}^3$

$$V_{п\phi} = V_{\phi} / K_{\phi}$$

$$V_{п\phi} = 0,48 / 0,5 = 0,96 \text{ м}^3$$

Обираємо, найближчий за об'ємом ферментер,  $\text{м}^3$

$$V_{г\phi} = 1 \text{ м}^3$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{у\phi}$ , частка

$$K_{у\phi} = V_{\phi} / V_{г\phi}$$

$$K_{у\phi} = 0,5 / 1 = 0,5$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5- 0,65), отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,5.

Робочий об'єм ( $V_{роб}$ ) визначають за формулою:

$$V_{роб} = V_{г.ф} \cdot K_{зап}$$

де:  $V_{г.ф}$  – геометричний ферментера;  $K_{зап}$  – коефіцієнт заповнення, 0,5.

$$V_{роб} = 1 \cdot 0,5 = 0,5 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання  $0,5 \text{ м}^3$  (500л) культуральної рідини потрібно:

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

Таку кількість інокуляту (50 л) можна одержати під час культивування штаму у посівному апараті об'ємом  $0,01 \text{ м}^3$  (100л).

Для одержання  $0,05 \text{ м}^3$  культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб } 2} = 0,05 \cdot 0,1 = 0,005 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу  $0,005 \text{ м}^3$  (5 л) можна одержати у процесі вирощування продуцента у інокуляторі об'ємом  $0,01 \text{ м}^3$  (10 л).

Для одержання  $0,005 \text{ м}^3$  культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб } 3} = 0,005 \cdot 0,1 = 0,0005 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати культивуванням продуцента у колбах на качалці. Необхідна кількість культуральної рідини для качалочних колб становить 500 мл. Їх можна буде отримати за використання 2 качалочних колб, об'ємом  $V(\text{колби}) = 250 \text{ мл}$

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у три етапи– в качалочних колбах та в двох інокуляторах. А сам процес біосинтезу відбувається у виробничому ферментері.

## РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

#### 4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

*Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 є факультативним анаеробом, дані мікроорганізми вирощують при доступі кисню в звичайних умовах повітряного середовища, тому необхідно забезпечити аеробні умови культивування [24].

Оптимальними умовами росту *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 є температура  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , та рівень рН 6.0-7.0. За даних оптимальних умов росту існує ризик контамінації середовища сторонньою мезофільною мікрофлорою. Тому, біотехнологічний процес, проводять в асептичних умовах, а для забезпечення таких умов культивування потрібно проводити комплекс заходів, що забезпечать асептику біотехнологічного процесу, а саме: механічний, фізичний й хімічний захист біооб'єкту й середовища його перебування, а при необхідності - і кінцевий продукт [25].

Можливі декілька варіантів проведення процесу культивування: поверхнево і глибинно. Розглянемо кожен з них і виберемо найкращий.

При поверхневому культивуванні важливо збільшити площу зіткнення середовища з повітрям. Поверхнєве культивування мікроорганізмів застосовується як в лабораторних умовах, так і в промисловості. Недолік поверхневого способу – необхідність встановлення кювет, роботу з якими важко механізувати.

Глибинне культивування мікроорганізмів має ряд переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити непродуктивну ручну працю, спрощує механізацію та

					НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Вовк Т. А.						30	9
Перевір.	Слободян О.П.					33		
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування збільшується питома площа контакту клітин продуцента з поживними речовинами у середовищі культивування, що дає можливість отримувати препарати з більшою питомою активністю [26].

Виходячи з цього, доцільно буде використовувати глибинний спосіб, що має переваги перед поверхневим: висока ефективність і ступінь використання компонентів поживного середовища, стерильність, можливість контролювати співвідношення компонентів поживного середовища.

Попри великі переваги безперервного культивування перед періодичним, культивування мікроорганізму здійснюється періодичним процесом, тому що, максимальне значення біомаса досягається під час стаціонарної фази періодичного культивування[27]. При періодичному способі у ферментер завантажують відразу весь обсяг живильного середовища і вносять посівний матеріал. Вирощування мікроорганізмів проводять в оптимальних умовах протягом певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментера і виділяють цільовий продукт[28].

Вибір ферментера базується на особливостях способу культивування, вони були зазначені вище.

Основними вимогами до ферментаторів є асептичність умов та достатній для культивування продуцента рівень аерації.

Ферментери для проведення виробничого біосинтезу мають ряд специфічних ознак:

- місткість ферментерів для промислового біосинтезу більша ніж місткість посівних апаратів (більше  $10 \text{ м}^3$ );
- вони повинні на протязі тривалого часу підтримувати високий рівень асептичності;
- гідродинамічні умови в ферментері повинні забезпечувати рівномірне розподілення взаємодіючих фаз;

- інтенсивність масопередачі повинна відповідати вимогам споживання кисню біологічними агентами;
- теплообмінні пристрої розраховуються на відведення теплоти в режимах максимальної фізіологічної активності[29].

1. Під час процесу культивування *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 аеробні умови створюються в результаті подачі повітря в ферментер, тому ферментер повинен бути оснащений барботером для подачі повітря, датчиками рО<sub>2</sub> (для контролю аеробних умов), газоаналізатором (для контролю концентрації СО<sub>2</sub>).

2. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач з частотою обертів 240 об/хв [30].

3. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

4. Для запобігання можливого утворення піни будемо використовувати механічний спосіб піногасіння, принцип дії якого полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата, яка по команді датчика буде обертатися і розбивати піну.

5. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН

Промислові біореактори виробництва компанії БІОТЕХНО призначені для проведення культивування клітинних культур. Біореактор виготовляється за індивідуальним вимогам замовника. Система контролю технологічних параметрів побудована на базі промислових систем автоматизації для забезпечення необхідної стабільності, гнучкості і ремонтпридатності. Трансмітери встановлюються від провідних світових виробників Mettler Toledo, WIKA, Endress + Hauser, IFM і т. п. [31].

#### 4.1.2. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

*Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 є факультативним анаеробом, дані мікроорганізми вирощують при доступі кисню, тому необхідно забезпечити стерильні аеробні умови культивування [4].

Для стерилізації повітря в боксах в лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи.

Забір атмосферного повітря для наступної його очистки здійснюють за допомогою спеціального повітрязабірника на висоті 12 м від підлоги першого поверху будівлі. Це пов'язано з тим, що висота виробничої будівлі становить 10 м і для запобігання потраплянню забруднюючих часточок з виробничої будівлі в повітрязабірник його розміщують на відстані 2 м від даху будівлі.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри G3-G4 фільтри грубого очищення від 10 мкм), фільтрів тонкого ступеня фільтрації (фільтри F5-F9 тонкої фільтрації від 1 мкм) та індивідуальних фільтрів (фільтри високої ефективності НЕРА надтонкого очищення до 0,1 мкм).

В якості фільтруючого матеріалу у виробках грубої очистки використовується тканина з синтетичних волокон або ж металева сітка. Конструкція може мати вигляд клітинок (панелей), гофрованого полотна і т.п.

У виробках тонкого ступеня фільтрації використовується склотканина. Конструктивно ці фільтри можуть виготовлятися у вигляді складчастих або кишенькових виробів [32].

Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом або інокулятором. Головні фільтри заповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється приблизно 95% мікроорганізмів, а на індивідуальних, які заповнюються

надтонкими мембранами чи волокнами, затримується до 99,999% мікроорганізмів [26].

#### **4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

Дезінфекція – це комплекс заходів, спрямованих на знищення збудників інфекційних захворювань на об'єктах навколишнього середовища з метою розриву механізму передачі інфекцій, тобто на шляхах їх передачі від джерела інфекції до чутливого організму.

Одним із головних чинників передачі збудників інфекційних захворювань вважаються об'єкти навколишнього середовища, на яких можливе їх тривале виживання й накопичення. Для того, щоб розірвати механізм передачі інфекцій, всі потенційно заражені об'єкти навколишнього середовища повинні підлягати якісному очищенню та дезінфекції [33].

Варто зазначити, що забезпечення чистоти на виробництві – це необхідний і життєвоважливий крок для забезпечення безпечності продукції та здоров'я працівників.

З боку закону було затверджено наступне: В Україні виробництво препаратів здійснюється з вимогами Ліцензійних умов провадження господарської діяльності з виробництва лікарських засобів, оптової, роздрібною торгівлі лікарськими засобами, затверджених Настановою СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» [34], де вказані вимоги до чистоти та валідації процесів очистки та дезінфекції.

При проведенні дезінфекції використовують такі основні методи:

- Фізичні методи дезінфекції проводять за допомогою механічних, термічних та променевих засобів.
- Хімічні методи дезінфекції широко застосовують на практиці. В основі їх лежить використання різних хімічних речовин, які вбивають мікроорганізми. Хімічні речовини мають різну дію на мікроорганізми: бактерицидну – здатність вбивати бактерії; бактріостатичну – пригнічують їх життєдіяльність; віруліцидну – здатність вбивати віруси; фунгіцидну – здатність вбивати грибки.

- Комбінований, за якого фізичні і хімічні методи знезаражування застосуються одночасно.

Щоб обрати мийні та дезінфікувальні засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. На 1 м<sup>2</sup> підлоги та стін затрачається приблизно 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу. Засоби варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Виробництво триває 88 трудоднів, необхідно підібрати 2 різних миючих засобів для оброблення поверхонь.

*Для миття обладнання.*

Для миття обладнання необхідно підібрати саме миючі засоби, тому що дезінфекція буде відбуватися під час стерилізації гострим паром. Тому можна обрати один засіб.

Для миття обладнання і комунікацій і тари доцільно використовувати миючий засіб Біомой або кальциновану соду, тому що вони є екологічно безпечнішими, дешевими та простими у використанні. Як і зазначалося раніше, для миття нам необхідні засоби, що зможуть ефективно впоратися саме з очисткою (залишки біомаси, жирне середовище), Біомой та кальцинована сода цілком впораються з цим завданням.

*Для дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей.*

Для миття та дезінфекції підлоги, стін, вікон та дверей варто обрати комплексні засоби, що забезпечать і очищення і дезінфекцію. Також, варто зазначити, що варто обрати засоби з пролонгованою дією (наприклад, при генеральному прибиранні) аби забезпечити ефективність протягом більш тривалого часу.

Як дезінфікуючий засіб обираємо Хлорантоїн та ДЕЗЕКОН, які є в переліку затверджених засобів «Державного реєстру дезінфекційних засобів України 2021 р.» [35]. Варто зазначити, що обрали засоби з різними діючими речовинами, аби попередити виникнення резистентності у мікроорганізмів.

Хлорантоїн (діюча речовина 1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн – дихлорантин; масова частка діючої речовини 21,5-23,5 %) має бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної респіраторно-синцитіальних, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, SARS, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні і фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) [36]. ДЕЗЕКОН (діючі речовини: комплекс четвертинних амонієвих сполук не менше 5,5%, в т.ч. алкілдиметилбензиламоній хлорид – 2,2%; октилдецилдиметиламоній хлорид – 1,65%; дидецилдиметиламоній хлорид – 0,825%; діоктилдиметиламоній хлорид – 0,825%) ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій (включаючи *P. aeruginosa* (Antibiotic resistant), MRSA, збудників туберкульозу), вірусів (включаючи віруси гепатитів, ВІЛ, герпесу, грипу, рота-, корона, хантавірус, вірусу *Avian influenza* (збудник пташиного грипу) і ін.), патогенних грибів (збудників кандидозів і дерматомікозів) і цвілі [37]. Обидва засоби ефективні за низьких концентрацій, мають IV рівень небезпеки, тривалий термін зберігання робочих розчинів.

#### **4.1.4 Обґрунтування способу підготовки і стерилізації поживного середовища**

Для виробничого біосинтезу *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 використовується середовище такого складу (г/л): М'яса – 15; Кукурудзяний екстракт – 2;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 0,2;  $KH_2PO_4$  – 0,2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,3; NaCl – 0,3;  $CaCO_3$  – 3 [16];

Оптимальними умовами росту *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 є температура  $28 \pm 0.5^\circ C$ , та рівень рН 6.0-7.0 з частотою обертів 240 об/хв. Під час культивування за рахунок життєдіяльності бактерій рівень рН буде знижуватись, тому необхідно контролювати рівень рН в межах 6.0-7.0 за допомогою титруючого агенту 6%-го розчину NaOH.

## **Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках**

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: Меляса, Кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція Б: NaCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв 0,15 МПа).

Композиція В: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв 0,15 МПа).

Композиція Г: CaCO<sub>3</sub> (режим стерилізації: 131 °С, 50 хв, 0,15 МПа).

Меляса і кукурудзяний екстракт (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації.

Солі композиції Б стерилізують при стандартній для солей температурі, щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей при нагріванні.

Фосфати (композиція В) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію.

Композицію Г стерилізуємо окремо, тому що це малорозчинний компонент і потребує жорсткіші умови стерилізації.

Стерилізацію композицій А, Б, В і Г здійснюють в автоклаві.

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 10 та 100 л. Стерилізація 4,5 та 45 л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах.

## **Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторах та посівних апаратах**

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 10 та 100 л:

Композиція А: Меляса, Кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа)

Композиція Б:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (режим стерилізації:  $131^\circ\text{C}$ , 40 хв, 0,15 МПа). Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими.

Композиція В:  $\text{CaCO}_3$  стерилізуємо окремо від солей, оскільки вона нерозчинна у воді (режим стерилізації:  $131^\circ\text{C}$ , 50 хв, 0,15 МПа)

### **Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу**

Виробничий біосинтез у ферментаторі об'ємом  $1 \text{ м}^3$ , середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: Меляса, Кукурудзяний екстракт (режим стерилізації:  $112^\circ\text{C}$ , 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція Б:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації:  $131^\circ\text{C}$ , 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В:  $\text{CaCO}_3$  (режим стерилізації –  $131^\circ\text{C}$  впродовж 50 хв, 0,15 МПа).

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

### Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозабірник, обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр CFM. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволка, швидкість фільтрування – 2 м/с, E = 75 %. Виробник: «General filter» (Італія). <sup>3</sup>
К-3	Компресор	1	Компресор Inversys Plus з прямим приводом. Максимальний робочий тиск 1,0 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина). <sup>4</sup>
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 <sup>0</sup> С. Виробник: «Systemair» (Швеція). <sup>4</sup>
Р-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 900.10. Об'єм 900 л, робочий тиск 1,1 МПа. Виробник: «Remeza» (Білорусь). <sup>4</sup>
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 <sup>0</sup> С. Виробник: «Systemair» (Швеція). <sup>4</sup>
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр (Р)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча сталеві сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США). <sup>5</sup>
Р-8	Реактор для соляної кислоти	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-300 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
Р-9	Реактор-змішувач для гідроксиду натрію	1	Реактор-змішувач об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-300 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>

НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Вовк Т. А.							
Перевір.	Слободян О.П.						39	3
Реценз.						42		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Продовження табл. 5.1

1	2	3	4
P-10	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 2 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
P-11	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 2 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм, сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
P-12	Реактор-змішувач для приготування крейди	1	Реактор-змішувач об'ємом 2 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
Ф-13 Ф-21 Ф-29	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтри (P)–SRF N. Фільтруючий матеріал – фторопласт, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 99,9999 %. Виробник: «Donaldson» (США). <sup>5</sup>
I-14	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$ , нержавіюча сталь 316L. Виробник: «Applikon Biotechnology» (Нідерланди) <sup>6</sup>
P-15	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
H-16 H-18 H-20 H-24 H-26 H-28 H-31	Насос відцентровий		Горизонтальний відцентровий насос MB 100. Продуктивність 9,0 м <sup>3</sup> /год, матеріал поліпропілен PP або фторопласт PVDF. Виробник: «Debet» (Україна). <sup>2</sup>
P-17	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup> .
P-19	Реактор-змішувач для приготування крейди	1	Реактор-змішувач об'ємом 20 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup> .

Закінчення табл. 5.1

1	2	3	4
ПА-22	Посівний апарат	1	Ферментер об'ємом 100 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$ , нержавіюча сталь 304. Виробник: «Suryamani Glassed Steel Equipment Private Limited» (Індія) <sup>7</sup>
P-23	Реактор-змішувач для термолабільних компонентів	1	Реактор-змішувач об'ємом 200 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
P-25	Реактор-змішувач для приготування розчину солей	1	Реактор-змішувач об'ємом 200 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-1000 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
P-27	Реактор-змішувач для приготування крейди	1	Реактор-змішувач об'ємом 200 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (20-500 об/хв), сталь н/ж 316L AISI. Виробник: «Промвіт» (Україна) <sup>1</sup>
ФР-31	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 1000 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5-0,6$ , нержавіюча сталь 304. Виробник: «Suryamani Glassed Steel Equipment Private Limited» (Індія) <sup>7</sup> .

**Примітка:** пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 1. <http://promvit.com.ua/> («Промвіт», ємнісне обладнання), 2. [www.debem.com.ua](http://www.debem.com.ua) («Debem», насоси), 3. <http://www.air-filter.com.ua> («General filter», фільтри для повітря), 4. <http://www.vent-magazin.ru>, <http://www.dalgakiran.com.ua> («Далгакиран компресор Україна», обладнання для підготовки повітря), 5. <http://www.emea.donaldson.com> («Donaldson» фільтри для повітря), 6. <https://www.applikon-biotechnology.com/> («Applikon Biotechnology», інокулятор 20 л), 7. <http://suryamani.in/> («Suryamani Glassed Steel Equipment Private Limited», посівний апарат 4/100 л, ферментер 1000 л).

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

Технологічна схема біосинтезу *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 включає в себе допоміжні роботи (приготування 6% розчину HCl, приготування та стерилізація 6% розчину NaOH, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу біомаси *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 наведено у графічній частині проекту.

### *ДР 1. Санітарна підготовка виробництва*

#### *ДР 1.1. Підготовка персоналу*

##### *ДР 1.1.1 Навчання персоналу*

Навчання персоналу забезпечує саме підприємство. На підприємстві існують такі види навчань:

1. Основне навчання: проводиться один раз на рік; персонал ознайомлюється з теорією і практикою;
2. Вхідне навчання: проводиться по мірі необхідності, коли на певну посаду наймають нового співробітника;
3. Подальше навчання: здійснюється систематично з подальшим оцінюванням практичної ефективності проведених навчань.

##### *ДР 1.1.2 Санітарно-гігієнічна підготовка персоналу*

Для миття рук персоналу використовують мило туалетне та мило господарське, для дезінфекції – 76% етиловий спирт.

##### *ДР 1.2. Приготування миючого засобу*

##### *ДР 1.3. Підготовка технологічного обладнання та комунікацій*

###### *ДР 1.3.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій*

###### *ДР 1.3.2. Технічний огляд*

Після миття та ополіскування емкісного обладнання проводять його

					НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Вовк Т. А.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.				42	15
Реценз.					45		
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.					
					РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		

технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх знаходження проводять підтягування різьбових з'єднань.

### *ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність*

На ємкісному обладнанні закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважається, що апарат герметичний. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °С і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа.

Тривалість операції становить 1,5-2 год. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію.

### *ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання*

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають пару і нагрівають апарат до температури 80–90 °С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат (через нижній спуск або барботер), при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130–135 °С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40 °С і надлишкового тиску  $P = 0,003-0,005$  МПа.

## *ДР 2. Підготовка аераційного повітря*

### *ДР 2.1. Забір повітря*

Необхідний об'єм атмосферного повітря забирають на висоті 12 м (ПЗ-3).

#### *ДР 2.2. Попереднє грубе очищення повітря*

Повітря пропускають через набивний фільтр (Ф-4), де відбувається затримка пилу та інших крупних часточок бруду до ступеня очищення  $E = 75\%$ . Фільтруючий матеріал – плетений алюмінієвий дріт.

#### *ДР 2.3. Компресування повітря*

Відбувається стиснення повітря у компресорі (К-5) до температури 220-250 °С і тиску 0,4 МПа.

#### *ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи*

У теплообміннику (Т-6) температура повітря знижується до 25-30 °С.

У ресивері-вологівідділювачі (Р-7) відбувається видалення зайвої вологи до вмісту  $W = 60\%$ .

#### *ДР 2.5. Нагрівання повітря*

Для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів охоложене повітря у теплообміннику (Т-8) нагрівають до температури 35 °С.

#### *ДР 2.6. Головне тонке очищення повітря*

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-9), в якому фільтрувальним матеріалом є нержавіюча стальна сітка. Ступінь очищення становить  $E = 95\%$ .

#### *ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі*

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-14, Ф-20, Ф-28). Фільтрувальним матеріалом є фторопласт. Ступінь очищення становить  $E = 99,999\%$ .

### ***ДР 3. Приготування та стерилізація піногасника***

#### *ДР 3.1. Приготування Гланapon DS для піногасіння*

В якості піногасника використовується гланapon, який є повністю готовий до стерилізації. Піногасник буде вноситися у ферментер

автоматично (доза одного внесення – 0,1 % від робочого об'єму ферментера або інокулятора) при реагуванні датчика рівня піни.

У колби місткістю 750 мл заливають по 300 мл Гланапон DS. Колби закривають ватно-марлевими пробками, зверху пробки покривають листом пергаменту і обв'язують бавовняної стрічкою. Колби з піногасником встановлюють в касети покривають листом пергаменту і поміщають в автоклав. Стерилізують піногасник в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

#### ***ДР 4. Приготування та стерилізація титрувальних агентів***

*ДР 4.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища*

Для приготування 2 л 6% розчину HCl, необхідно 0,34 л концентрованої 36% HCl і 1,66 л водопровідної води.

У збірник (P-10) об'ємом 5 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора вносять 1,66 л стерильної води, далі за допомогою мірного циліндру відміряють і додають 0,33 л 36% розчину HCl, вмикають перемішувач пристрій.

*ДР 4.2. Приготування та стерилізація 6% розчину гідроксиду натрію для підлужнення поживного середовища*

Для приготування 2 л 6% розчину NaOH, необхідно 120 г кристалічного NaOH і 1,88 л водопровідної води.

На технічних вагах зважують 120 г кристалічного NaOH. Наважку поміщають в збірник (P-11) об'ємом 5 л, додають за допомогою об'ємно-вагового дозатора 1,88 л питної води. Для повного розчинення компонентів у сорочку збірника подають пару для досягнення температури розчину 40°C, і вмикають перемішувач пристрій.

Стерилізація титруючого агента проходить безпосередньо в збірнику під тиском 0,15 МПа при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

#### ***ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 5.1. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках*

Для вирощування інокуляту на даному етапі необхідно приготувати 450 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 450 мл поживного середовища наведено в табл. 6.1.

*Таблиця 6.1*

**Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 450 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Меляса	15,0	6,75	А	150
Кукурудзяний екстракт	2,0	0,9		
Вода		150(мл)		
NaCl	0,3	0,135	Б	90
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3	0,135		
Вода		90(мл)		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,2	0,09	В	80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	0,09		
Вода		80(мл)		
CaCO <sub>3</sub>	3	1,35	Г	130
Вода		130(мл)		
Усього				450

*ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 6,75 г меляси і 0,9 г кукурудзяного екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 150 мл

дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C упродовж 30 хв.

*ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 0,135 г хлорид натрія та 0,135 магній сірчаноокислий семиводний. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 90 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

*ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 0,09 г гідрофосфат калію трьохводний та 0,09 г дигідроортофосфат калію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 80 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

*ДР 5.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г*

На технічних вагах зважують 1,35 г крейди. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 130 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

*ДР 5.2. Приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л*

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 4,5 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 4,5 л поживного середовища наведено в табл. 6.2.

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4,5 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 4,5 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Меляса	15,0	67,5	А	1,5
Кукурудзяний екстракт	2,0	9,0		
Вода	1,35(л)			
Конденсат	0,15(л)			
NaCl	0,3	1,35	Б	1,7
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3	1,35		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,2	0,9		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	0,9	Б	1,7
Вода	1,53(л)			
Конденсат	0,17(л)			
CaCO <sub>3</sub>	3,0	13,5	В	1,3
Вода	1,17(л)			
Конденсат	0,13(л)			
Усього			4,5	

*ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 67,5 г меляси та 9,0 г кукурудзяного екстракту. Наважки поміщають у реактор (Р-10) об'ємом 2 л, додають 1,35 л питної води.

Стерилізація композиції проходить при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

Стерилізовану композицію подають у інокулятор (І-14) об'ємом 10 літрів.

#### *ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 1,35 г натрій хлориду, 1,35 г магній сірчаноокислий семиводний, 0,9 г гідрофосфат калію трьохводний, 0,9 г дигідроортофосфат калію. Наважки поміщають у реактор (Р-11) об'ємом 2 л, додають 1,53 л питної води і перемішують до повного розчинення. Приготовлену композицію подають у інокулятор (І-14) об'ємом 10 літрів.

Перед стерилізацією за допомогою 6% соляної кислоти знижуємо рН до 4,5-5,0 (за таких умов осади фосфатів кальцію і магнію не утворюються). Стерилізують у інокуляторі (І-14) при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу за допомогою 6 % гідроксид натрію доводимо рН до 6,8-7,2.

#### *ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 13,5 г крейди. Наважки поміщають у реактор (Р-12) об'ємом 2 л, додають 1,17л питної води.

Стерилізація композиції проходить при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

Стерилізовану композицію подають у інокулятор (І-14) об'ємом 10 літрів.

#### *ДР 5.3. Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л*

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 45 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 45 л поживного середовища наведено в табл. 5.3.

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 45 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 45 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Меляса	15,0	675,0	А	15
Кукурудзяний екстракт	2,0	90,0		
Вода	13,5(л)			
Конденсат	1,5(л)			
NaCl	0,3	13,5	Б	17
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3	13,5		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,2	9,0		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	9,0		
Вода	15,3(л)			
Конденсат	1,7(л)			
CaCO <sub>3</sub>	3,0	135,0	В	13
Вода	11,7(л)			
Конденсат	1,3(л)			
Усього				45

*ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 675,0 г меляси та 90,0 г кукурудзяного екстракту. Наважки поміщають у реактор (Р-15) об'ємом 20 л, додають 13,5 л питної води.

Стерилізація композиції проходить при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

Стерилізовану композицію подають у посівний апарат (ПА-22) об'ємом 100 літрів.

#### *ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 13,5 г натрій хлориду, 13,5 г магній сірчаноокислий семиводний, 9,0 г гідрофосфат калію трьохводний, 9,0 г дигідроортофосфат калію. Наважки поміщають у реактор (Р-17) об'ємом 20 л, додають 15,3 л питної води. Приготовлену композицію подають у посівний апарат (ПА-22) об'ємом 100 літрів.

Перед стерилізацією за допомогою 6% соляної кислоти знижуємо рН до 4,5-5,0 (за таких умов осаді фосфатів кальцію і магнію не утворюються). Стерилізація композиції проходить у посівному апараті (ПА-22) при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу за допомогою 6 % гідроксид натрію доводимо рН до 6,8-7,2.

#### *ДР 5.3.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 135,0 г крейди. Наважки поміщають у реактор (Р- 22) об'ємом 20 л, додають 11,7 л питної води.

Стерилізація композиції проходить при температурі 131°C упродовж 50 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

Стерилізовану композицію подають у посівний апарат (ПА-22) об'ємом 100 літрів.

#### *ДР 5.4. Приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1000 л*

Для проведення стадії виробничого біосинтезу необхідно приготувати 450 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 450 л поживного середовища наведено в табл. 6.4.

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 450 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 450 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Меляса	15,0	6750,0	А	150
Кукурудзяний екстракт	2,0	900,0		
Вода	135,0(л)			
Конденсат	15,0(л)			
NaCl	0,3	135,0	Б	170
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3	135,0		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,2	90,0		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	90,0		
Вода	153,0(л)			
Конденсат	17,0(л)			
CaCO <sub>3</sub>	3	1350,0	В	130
Вода	117,0(л)			
Конденсат	13,0(л)			
Усього				450

*ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 6750,0 г меляси та 900,0 г кукурудзяного екстракту. Наважки поміщають у реактор (Р- 23) об'ємом 200 л, додають 135 л питної води.

Стерилізація композиції проходить при температурі 112°C упродовж 30 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль поживного середовища.

Стерилізовану композицію подають у ферментер (ФР-30) об'ємом 1000 літрів.

#### *ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 135,0 г натрій хлориду, 135,0 г магній сірчаноокислий семиводний, 90,0 г гідрофосфат калію трьохводний, 90,0 г дигідроортофосфат калію. Наважки поміщають у реактор (Р-25) об'ємом 200 л, додають 153 л питної води. Приготовлену композицію подають у ферментер (ФР-30) об'ємом 1000 літрів.

Перед стерилізацією за допомогою 6% соляної кислоти знижуємо рН до 4,5-5,0 (за таких умов осаді фосфатів кальцію і магнію не утворюються). Стерилізація композиції проходить ферментері (ФР-30) об'ємом 1000 л при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу за допомогою 6 % гідроксид натрію доводимо рН до 6,8-7,2.

#### *ДР 5.4.3. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 1350,0 г крейди, поміщають у реактор (Р-27) об'ємом 200 л, додають 117 л питної води.

Стерилізація композиції проходить при температурі 131°C упродовж 40 хв. Після стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль.

Стерилізовану композицію подають у ферментер (ФР-30) об'ємом 1000 літрів.

### ***ТП 6. Підготовка посівного матеріалу***

#### *ТП 6.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 зберігають й підтримують методом періодичних пересівів (не рідше 2 разів у півроку) на агаризованому середовищі Менкіної з гліцерофосфатом кальцію при температурі 4-6° С. Всі роботи за колекційною культурою проходять суворо в стерильних умовах.

#### *ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі*

Робочу культуру штаму-продуцента отримують розсівами колекційної культури на чашки Петрі в агаризованому середовищі Менкіної з гліцерофосфатом дотримуючись асептичних умов. Культуру на чашці Петрі вирощують при температурі 28°C протягом 24 год.

#### *ТП 6.3. Вирощування робочої культури на агаризованому середовищі*

Ізольовані колонії від ТП 3.2 в асептичних умовах пересівають петлею у пробірки з агаризованим середовищем. Одна ізольована колонія засівається в одну окрему пробірку. Для пересіву використовують колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Пробірки інкубують 24 год при температурі 28°C.

#### *ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках*

У колбу об'ємом 1 л із композиції А (від ДР 4.1.1) в асептичних умовах вносять розчин композиції Б (від ДР 4.1.2), розчин композиції В (від ДР 4.1.3). Розчин перемішують і розливають по 225 мл в дві стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл та по 75 мл у шість стерильних качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою культурою *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, вирощену на середовищі Менкіної з гліцерофосфатом, асептично вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію клітин і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування бактерій здійснюється у колбах на качалці (240 об/хв) при 28°C упродовж 24 год. Під час культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Після завершення вирощування в асептичних умовах інокулянт з 8 колб переносять в засівну колбу об'ємом 1 л, перемішують, закривають пробкою.

#### *ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л*

В інокулятор з композицією Б, об'ємом 10 л через засівну колбу вносять композицію А (ДР 4.2.1), композицію В (від ДР 4.2.3).

Далі за допомогою засівної колби вносять посівний матеріал (від *ТП 3.4*). Включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в рубашку інокулятора подають пару.

Культивування здійснюють при температурі 28 °С впродовж 24 год за швидкості перемішування 240 об/хв. За необхідності, під час культивування регуляють рівень рН в межах 6,8-7,2 за допомогою титруючих агентів (NaOH чи HCl).

Піногасник вносимо тільки за необхідності, спостерігаючи за протіканням технологічного процесу. Піногасник вноситься в розрахунку 0,01 піногасника від загального об'єму поживного середовища.

Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. У пробі відібраній на 24 годину культивування, концентрація біомаси повинна перебувати в межах  $1,3 \cdot 10^{10}$  кл/мл.

#### *ТП 6.6. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 100 л*

У посівний апарат з композицією Б подають композицію А (*ДР 2.3.1*), композицію В (від *ДР 2.3.3*). Потім за допомогою стисненого повітря по трубі перетискування з інокулятора перекачують посівний матеріал (від *ТП 3.5*). Включають перемішуючий пристрій, вмикають аерацію, в рубашку посівного апарату подають пару.

Культивування здійснюють при температурі 24 °С впродовж 24 год за швидкості перемішування 240 об/хв. За необхідності, під час культивування регуляють рівень рН в межах 6,8-7,2 за допомогою титруючих агентів (NaOH чи HCl).

Піногасник вносимо тільки за необхідності, спостерігаючи за протіканням технологічного процесу. Піногасник вноситься в розрахунку 0,01 піногасника від загального об'єму поживного середовища.

Кожні 4 години відбирають пробу культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

У пробі відібраній на 24 годину культивування, концентрація біомаси повинна перебувати в межах  $1,3 \cdot 10^{10}$  кл/мл.

### ***ТП 7. Біосинтез***

У ферментер (ФР-31) об'ємом 6300 л з композицією Б (ДР 2.4.2) подають за допомогою насосу (Н-24) зі збірника (Р-25) об'ємом 200 л композицію А (ДР 4.4.1) та зі збірника (Р-29) об'ємом 30 л подають за допомогою насосу (Н-28) композицію В (ДР 42.4.3). Далі з посівного апарату (ПА-24) перекачують 226,8 л посівного матеріалу (від ТП. 5.6) у ферментер (ФР31). Вмикають перемішування та аерацію, в рубашку ферментера подають пару.

Біосинтез здійснюють при температурі 28 °С впродовж 24 год. за швидкості перемішування 240 об/хв. За необхідності, під час культивування регулюють рівень рН в межах 6,8-7,2 за допомогою титруючих агентів (NaOH чи HCl).

Піногасник вносимо тільки за необхідності, спостерігаючи за протіканням технологічного процесу. Піногасник вноситься в розрахунку 0,01 піногасника від загального об'єму поживного середовища.

У процесі культивування, кожні 4 год, відбирають проби для здійснення мікробіологічного контролю та контролю показників росту та синтезу, концентрація біомаси повинна перебувати в межах  $1,3 \cdot 10^{10}$  кл/мл.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 7.1. Мікробіологічний контроль

Такий вид контролю здійснюють після стерилізації композицій або поживних середовищ і під час етапів підготовки посівного матеріалу і власне біосинтезу.

Здійснення мікробіологічного контролю відбувається розсівом культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованими середовищами та мікроскопіюванням.

Підготовка чашок Петрі. У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі розливають по 20-30 мл розплавленого на киплячій водяній бані поживного середовища. Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу. Посіви здійснюють шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єма проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °С протягом 1-2 діб для МПА.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій. Сусло-агар (СА) або глюкозо-картопляний агар для грибів та дріжджів. Про стерильність простерилізованих поживних середовищ і композицій свідчить відсутність росту на тестових поживних середовищах [38].

Після процесу культивування у культуральній рідині необхідно спостерігати лише культуру продуцента.

					НУХТ БТЕК 04.02.03. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Вовк Т.А.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Слободян О.П.					57	5
Консультант						60		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Морфологічні і культуральні ознаки *Bacillus subtilis*: грампозитивні палички з круглими кінцями, рухливі, розміром 0,8x2,9мкм. Спори овальні, розташовані субтермінально.

Колонії на картопляному агарі округлої форми, сіруватобілого кольору, плоскі, матові, R-типу. Край колонії не рівний. Діаметр колонії 48-годинної культури складає 3-12мм. На МПБ утворює плівку, росте на МПБ з 5 і 7% NaCl Може рости при температурі 28°C, 37°C і 45°C Оптимальна температура росту 28-0,5°C, рН=6,0-7,0[4].

### **Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища**

Відбирають пробу простерилізованого поживного середовища в об'ємі 50 мл, з цієї кількості за допомогою піпетки відбирають 0,1 мл середовища і наносять на ч. Петрі з відповідним диференційним агаризованим середовищем (сусло-агар – для виявлення грибів та дріжджів, м'ясо-пептонний агар – для виявлення бактерій). Досліджувану суспензію розподіляють по поверхні поживного середовища шпателем Дригальського, і відправляють у термостат на 6-8 годин за температури 30...32 °C. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [38].

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препаратів «роздавлена крапля». Препарат готують на предметному склі, яке попередньо знежирюють. Після нанесення на скло маленької краплі культуральної рідини, його накривають накривним скельцем і мікроскопіюють з об'єктивом 40x без імерсійної системи та 90x з імерсійною системою. Наявність інших клітин, які будуть відрізнятися за формою та розмірами, може свідчити про наявність сторонньої мікробіоти. Характерні культуральні ознаки *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 - палички з круглими кінцями, рухливі, розміром 0,8x2,9мкм. Спори овальні, розташовані субтермінально [4]

## **7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту**

### **7.2.1. Концентрація цільового продукту (біомаси)**

Визначення кількості абсолютно сухої біомаси ваговим методом. У сухожаровій шафі висушують алюмінієву зважувальну чашу і визначають її масу. Відцентрифуговані клітини двічі промивають дистильованою водою і знову центрифугують при 6600 об/хв протягом 15 хв [39]. Надосадову рідину видаляють і переносять масу клітин на зважувальну чашу. Біомасу, яка залишилася на стінках колби для центрифугування, змивають 1-2 мл дистильованої води і виливають у чашу. Чашу з біомасою поміщають у сухожарову шафу і висушують до постійної маси при 80 °С протягом 1-2 год. Після висушування розраховують різницю у масі і виражають кількість сухої біомаси у г/л [40].

### **7.2.2** **Визначення концентрації джерел вуглецю і азоту**

#### ***Визначення концентрації джерела вуглецю***

Джерелом вуглецю є меляса. Концентрацію редукуючих цукрів визначають у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини (6600 об/хв, 15 хв).

В основі методу лежить визначення кількості редукуючих вуглеводів за допомогою колориметричної реакції цукрів з 3,5-динітросаліциловою кислотою. Реакція вуглеводів з цією кислотою протікає в лужному середовищі при нагріванні в киплячій водяній бані. Динітросаліцилова кислота перетворюється цукрами в 3-аміно-5-нітросаліцилову кислоту, яка має яскравий жовто-оранжевий колір, інтенсивність забарвлення якої визначають на спектрофотометрі.

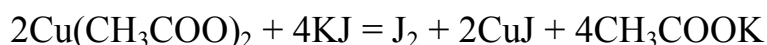
Після центрифугування культуральної рідини 0,25 мл зразка надосадової рідини змішують з 1 мл реагенту ДНС (0,25 г 3,5-динітросаліцилової кислоти, 50 мл 2 н NaOH, 75 г солі Rochelle, в 250 мл води), суміш кип'ячать при 100 °С протягом 5 хв і охолоджують водопровідною водою. Кінцевий розчин зразка отримують шляхом розбавлення 4 мл дистильованої води. Кількісне визначення редуруючих цукрів проводять шляхом вимірювання оптичної густини зразка на спектрофотометрі з довжиною хвилі 570 нм [41]. Чисельність життєздатних клітин визначають методом десятикратних розведень і висіву на картопляний агар з підрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО) [30].

### ***Визначення концентрації джерела азоту***

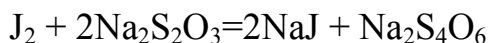
Метод йодометричного титрування (метод Попі-Стівенса) використали для визначення амінного азоту [42].

**Метод заснований на** взаємодії амінокислот в лужному розчині з іонами двухвалентної міді і подальшому йодометричному титруванні.

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



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



1 см<sup>3</sup> 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу  $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$ .

**Прилади, посуд і реактиви:** мірні колби місткістю 50 і 100 см<sup>3</sup>, піпетки місткістю 5 і 10 см<sup>3</sup>, мірний циліндр місткістю 50 см<sup>3</sup>, конічна колба

місткістю  $100 \text{ см}^3$ , мікробюретка місткістю  $2 \text{ см}^3$ , розчин хлориду міді ( $27,3 \text{ г}$  солі розчиняють в  $1 \text{ дм}^3$  води); розчин фосфату натрію ( $64,5 \text{ г}$  гідроортофосфату натрію  $\text{NaHPO}_4$  розчиняють в  $500 \text{ см}^3$  дистильованої води, звільненої від  $\text{CO}_2$ , додавають  $7,2 \text{ г}$  гідроксиду натрію і після розчинення доливають водою до  $1 \text{ дм}^3$ ); боратний буферний розчин ( $57,21 \text{ г}$  бури розчиняють в  $1,5 \text{ дм}^3$  води, додають  $100 \text{ см}^3$  розчину соляної кислоти концентрацією  $1 \text{ моль/дм}^3$  і доводять водою до  $2 \text{ дм}^3$ ); суспензія фосфату міді (один об'єм розчину хлориду міді змішують з двома об'ємами розчину фосфату натрію і додають два об'єми боратного буферного розчину; суспензія зберігається не більше 3 днів); розчин тимолфталейну ( $0,25 \text{ г}$  індикатору в  $100 \text{ см}^3$  50%-го спирту); розчин тіосульфату натрію концентрацією  $0,01 \text{ моль/дм}^3$ ; 1 %-й розчин крохмалю; 80 %-на або крижана оцтова кислота; розчин гідроксиду натрію концентрацією  $1 \text{ моль/дм}^3$ ; 10 %-й розчин йодиду калію.

**Техніка аналізу.** В мірну колбу місткістю  $50 \text{ см}^3$  піпеткою вносять  $5 \text{ см}^3$  супернатанту культуральної рідини одержаної при центрифугуванні 15 хв при 6600 обертах [40], додають 3-4 краплини індикатору тимолфталейну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією  $0,1 \text{ моль/дм}^3$  до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають  $30 \text{ см}^3$  суспензії ортофосфату 34 міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.  $10 \text{ см}^3$  абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають  $0,5 \text{ см}^3$  80%-ї оцтової кислоти (підкислюють) і  $10 \text{ см}^3$  розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією  $0,01 \text{ моль/дм}^3$ . В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію. При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в  $10 \text{ см}^3$  фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію,

витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 см<sup>3</sup> м'яси. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$= \frac{a \times 0,28 \times b \times 10 \times 100}{50}$$

де а – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, витраченого на титрування, см<sup>3</sup>;

б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, см<sup>3</sup> [43].

## ЛІТЕРАТУРА

1. Мікробні препарати в землеробстві // Теорія і практика. Під ред. В.В. Волкогона. — К.: Аграрна наука, 2006. — 311 с
2. Курдиш І.К. Азогран - гранульований бактеріальний препарат нового покоління для рослинництва. //Наука та інновації. 2009. - Т. 5, № 2. - С. 50-52
3. Курдиш І.К., Рой А.О., Булавенко Л.В. та ін. Фосфатмобілізуючі бактерії як компоненти гранульованих мікробних препаратів комплексної дії // Сільськогосподарська мікробіологія. — 2005. — Вып. 1—2. — С. 68—76
4. Деклараційний патент України № 54923А. Штамм *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
5. Вплив комплексного бактеріального препарату Азогран на врожайність пшениці озимої / О. В. Корнійчук, В. В. Плотніков, Г. Г. Гильчук, А. О. Рой, І. О. Скороход, І. К. Курдиш // Сільськогосподарська мікробіологія. - 2018. - Вип. 27. - С. 67-73. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/smik\\_2018\\_27\\_12](http://nbuv.gov.ua/UJRN/smik_2018_27_12)
6. Інтернет-магазин «Зелена садиба» [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zelenasadyba.com/zasobi-zakhistoroslin/biopreparati/biodobriva/azogran-20g>
7. Інтернет-магазин SuperAgronom.com [Електронний ресурс]. Режим доступу <https://superagronom.com/pesticidi-regulyatori-rostu/2303-azogran-id7932>
8. І.А. Мальчевський, С.А. Беспалов Перспективні науково-технічні розробки НАН України: в 11 тематичних вип. — Вип.: Агропромисловий комплекс та декоративне садівництво упоряд. [Електронний ресурс]. Режим доступу [https://files.nas.gov.ua/NASDevelopmentsBook/Parts/Part\\_01\\_UA.pdf](https://files.nas.gov.ua/NASDevelopmentsBook/Parts/Part_01_UA.pdf)
9. "ПРОФ-Насіння" інтернет - магазин для садівників. [Електронний ресурс]. Режим доступу <https://prof-semena.net/ua/p142649004-azogran.html>
10. Антагонистическая активность фосфат-мобилизирующих бактерий к фитопатогенным грибам и бактериям / А.А.Рой, О.В.Залоило,

Л.С.Чернова, И.К.Курдиш // Агроекол. жур-нал. —2005. —№ 1. —С.50–55.

11. Курдиш І.К. Ефективність застосування комплексного бактеріального препарату Азогран в овочівництві / І.К.Курдиш, А.О.Рой, Л.А.Па-січник // Екологічний моніторинг, інноваційні та ресурсозберігаючі технології в системі захисту картоплі і овочевих культур від шкідливих організмів : тези доп. всеукраїнської науково-прак-тичної конференції (Житомир, 29-30 травня 2014р.). —Житомир, 2014. —С.22–23.

12. Протеолітична активність фосфатмобілі-зувальних бактерій роду *Bacillusta* їх вплив на деяких фітофагів / [А.О.Рой, О.В.Мацелюх, П.Д.Зубко та ін.] // Сільськогосподарська мік-робіологія. —2014. — Вип.20. —С.66–73.

13. [izi.ua](https://izi.ua) — гиперпространство объявлений [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://izi.ua/p-147026-bakterialnoe-udobrenie-azogran-obrabotka-po-vegetatsii>

14. Іваненко В. Ф., Іваненко Ф. В. Органічне землеробство: лабораторний практикум /В. Ф. Іваненко, Ф. В. Іваненко. –К.: КНЕУ, 2018. – 141 с.

15. Скороход И. А. Влияние биологически активных веществ фосфатминерализующих штаммов рода *Bacillus* на семена растений, подвергнутые оксидативному стрессу / И. А. Скороход, А. А. Рой, А. И. Мелентьев, И. К. Курдиш // Мікробіологія і біотехнологія. - 2013. - № 2. - С. 41-51. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB\\_2013\\_2\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB_2013_2_7).

16. Царенко И. Ю. Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 / И. Ю. Царенко, А. А. Рой, И. К. Курдиш // Мікробіологічний журнал. - 2011. - Т. 73, № 2. - С. 13-19. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol\\_2011\\_73\\_2\\_3](http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2011_73_2_3).

17. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.warbletoncouncil.org/bacillus-subtilis-5785>

18. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1423>

19. [Електронний ресурс]. Режим доступу <http://www.ukrstat.gov.ua>
20. [Електронний ресурс]. Режим доступу <http://www.upi-agro.com.ua/ua/News/Details/58>
21. [Електронний ресурс]. Режим доступу <https://www.slideshare.net/mtstoday/6-60857277>
22. [Електронний ресурс]. Режим доступу <https://propozitsiya.com.ua/rozrahunok-normi-visivu-nasinnya-ozimoyi-pshenici>
23. Деклараційний патент України №57269А Спосіб одержання гранульованих бактеріальних препаратів / Курдиш І.К., Рой А.О., Бега З.Т. Опубл. 16.06.2003. Бюл. №6.
24. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
25. 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
26. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
27. Методичні вказівки до проведення практичних (семінарських) занять та до виконання самостійної роботи з курсу «Основи мікробіології» для студентів напряму підготовки 6.040106 “Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування” / Укл. В.В. Вембер – 2012. – 85 с.
28. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс] :Оцінка ефективності біотехнологічних процесів для здобувачів вищої освіти “Бакалавр” спеціальності 162 “Біотехнології та біоінженерія” денної форми навчання / уклад. О. І. Юлевич. — Електрон. текст. дані. – Миколаїв : МНАУ, 2017. – 28 с.

29. Основи проектування фармацевтичних виробництв: конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 та 6.0929902 "Біотехнологія біол. активних речовин" ... / В.М. Поводзинський ; Нац. ун-т харч. технологій. - К.: НУХТ, 2006. - 210 с.: табл. - Бібліогр.: с. 206-207.
30. Особливості росту бактерій *Azotobacter vinelandii* IMB В-7076 і *Bacillus subtilis* IMB В-7023 в чистих та змішаній культурах за умов їх глибинного культивування / А. О. Рой, О. Г. Кістень, І. Ю. Царенко, І. К. Курдиш // Мікробіологічний журнал. - 2016. - Т. 78, № 3. - С. 78-87. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol\\_2016\\_78\\_3\\_10](http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2016_78_3_10)
31. LAMSERVIS [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://lamservis.kz/index.php?page=prod&category=farm&id=51>
32. Електронний ресурс: Фільтри для систем вентиляції. <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtri-dlya-sistem-ventilyatsiyi.html>
33. [Електронний ресурс]. – <https://dsp.gov.ua/rekomendatsii-dlia-robotodavtsiv-shchodo-provedennia-dezinfektsiinykh-zakhodiv-z-metoiu-nedopushchennia-poshyrennia-vypadkiv-cov1d-19-na-robochykh-mistsiyakh/>
34. [Електронний ресурс]. – <https://www.dls.gov.ua/news/%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%B2%D0%B5%D1%80%D0%B4%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F-%D0%B2-%D1%83%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%96-%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D1%97-%D0%B7%D0%B3%D1%96/>
35. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік. [Електронний ресурс] – Режим доступу: [https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020\\_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4)

%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf

36. Дезинфекция и Антисептика [Электронный ресурс]. – Хлорантоин – хлорсодержащие средство. – Режим доступа: <https://www.mpi-dpr.com.ua/produkcija/10-khlorantoin-khlorsoderzhasshie-sredstvo.html>

37. Эко-хим восток [Электронный ресурс]. – Средство дезинфицирующее ДЕЗЕКОН. – Режим доступа: [http://eko-him.com.ua/products/7014\\_sredstvo\\_dezinficiruyushhee\\_dezekon\\_51](http://eko-him.com.ua/products/7014_sredstvo_dezinficiruyushhee_dezekon_51)

38. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько; Нац. ун-т харч. технол. - Київ: НУХТ - 2019. - 252 с (с. 144).

39. Вплив фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 [Текст] / І. О. Герасименко, І. К. Курдиш // Мікробіологія і біотехнологія. - 2014. - № 4. - С. 61-68

40. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Промислова та екологічна біотехнологія" для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 51 с. Укладач: Корнієнко І. М.

41. Традиционные и биосенсорные методы определения монои дисахаридов Текст научной статьи по специальности «Промышленные биотехнологии» Пешкова В. М. Саяпина О. Я. Солдаткин О. О. Дзядевич С. В. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/traditsionnye-i-biosensornye-metody-opredeleniya-mono-i-disaharidov>

42. Динамика биосинтеза бета-глюканов микроорганизмами *Aspergillus niger*, *Streptomyces lucensis* и *Streptomyces violaceus* в процессе их культивирования на различных средах/ Шарова Н.Ю., Манжиева Б.С. Режим доступа: <http://openbooks.ifmo.ru/ru/article/19677/>

43. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 “Харчові технології та інженерія“ спец. “ Технологія продуктів бродіння і виноробства”/Укл.:А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. –К.:НУХТ,2011. – 53 с.