

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

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

«__» _____ 2020 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

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

«__» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* для одержання ларвіцидного препарату проти грибного комарика

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Петренко Ольга Вячеславівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Ключка Лілія Вікторівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Ключка І.В.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Петренко Ольга Вячеславівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* для одержання ларвіцидного препарату проти грибного комарика

керівник роботи Ключка Лілія Вікторівна, асистент

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року №227-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*, цільовий продукт: ларвіцидний ендотоксинний препарат

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту, РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Біосинтез ендотоксину, РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва ларвіцидного ендотоксинного препарату, РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс та розрахунок обладнання, РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва ларвіцидного ендотоксинного препарату, РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва ларвіцидного ендотоксинного препарату, РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва ларвіцидного ендотоксинного препарату

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва ларвіцидного ендотоксинного препарату – 2 аркуші формату А2 та А4, Апаратурна схема виробництва ларвіцидного ендотоксинного препарату – 2 аркуші формату А2 та А3, Схема автоматизації ділянки стандартизації та сушіння ларвіцидного ендотоксинного препарату – 1 аркуш формату А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
10	Клименко О.М. доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	20.05.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	20.03.2020 – 25.03.2020	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агенту	25.03.2020 – 31.03.2020	
3	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020 – 07.04.2020	
4	Біосинтез ендотоксину	08.04.2020 – 14.04.2020	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва ларвіцидного ендотоксिनного препарату	14.04.2020 – 20.04.2020	
6	Матеріальний баланс та розрахунок обладнання	21.04.2020 – 27.04.2020	
7	Специфікація обладнання	28.04.2020 – 03.05.2020	
8	Опис технологічної схеми виробництва ларвіцидного ендотоксिनного препарату	04.05.2020 – 10.05.2020	
9	Контроль виробництва ларвіцидного ендотоксिनного препарату	11.05.2020 – 16.05.2020	
10	Автоматизація ділянки виробництва ларвіцидного ендотоксिनного препарату	17.05.2020 – 20.05.2020	
11	Оформлення пояснювальної записки	21.05.2020 – 31.05.2020	
12	Виконання графічної частини проекту	21.05.2020 – 31.05.2020	

Здобувач _____ Петренко О.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Ключка Л.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва ларвіцидного ендотоксинового препарату на основі споровокристалічного комплексу у вигляді сухого порошкоподібного препарату культивуванням штаму *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, який синтезує на модифікованому дріжджеполісахаридному середовищі 4,52 млрд.спор/мл. Ларвіцидний ендотоксинний препарат – летально впливає на личинки грибних комариків, які шкодять грибним фермам. Розрахована потужність його виробництва становить 606 л культуральної рідини або 6 кг біомаси які входять у 30 стандартизованого біопрепарату, для забезпечення 6 найбільших грибних ферм України.

Технологія виробництва препарату складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів, приготування та стерилізація поживного середовища) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі, виробничого біосинтезу, тангенціальній фільтрації культуральної рідини, стандартизації препарату, сушіння у сушильній шафі) та фасування у пластикові банки (по 1 кг), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладений на 178 сторінок друкованого тексту, містить 32 таблиць, 24 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (101 джерел) та графічної частини (креслень формату А2, А3 та А4).

Ключові слова: ендотоксин, спори, ларвіцидна активність, про-токсин, штам-продуцент, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, ЛК₅₀, біосинтез, виділення, біомаса, стандартизація.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА	
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТУ.....	17
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	17
2.2 Розрахунок теоретичного виходу біомаси.....	25
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	30
2.4 Таксономічний статус біологічного агента.....	32
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	35
3.1 Потреба у цільовому продукті.....	35
3.2 Розрахунок потужності виробництва.....	41
3.3 Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	43
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	43
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЕНДОТОКСИНУ.....	46
4.1 Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	46
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	48
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	
ВИРОБНИЦТВА ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО	
ПРЕПАРАТУ.....	52
5.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	52
5.1.1 Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	52
5.1.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	60
5.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	62
5.1.4 Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій.....	72
5.1.5 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	78
5.2 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	81

5.2.1 Відокремлення біомаси.....	85
5.2.2 Стандартизація препарату.....	94
5.2.3 Сушіння препарату.....	96
5.2.4 Фасуваття та пакування препарату.....	101
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ.....	104
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	124
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТУ.....	128
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТУ.....	145
9.1 Доферментаційна ділянка виробництва.....	145
9.1.1 Мікробіологічний контроль.....	145
9.1.2 Визначення концентрації біомаси.....	147
9.1.3 Виділення і очищення δ -ендотоксину.....	148
9.1.4 Визначення білка	149
9.1.5 Визначення ларвіцидної активності.....	150
9.1.6 Визначення концентрації амонійного азоту.....	152
9.1.7 Визначення джерела вуглецю.....	153
9.2 Післяферментаційна ділянка виробництва.....	155
9.2.1 Визначення масової частки вологи.....	155
9.2.2 Контроль зовнішнього вигляду і кольору.....	155
9.2.3 Визначення масової частки частинок.....	155
9.2.4 Визначення ларвіцидної активності готового препарату.....	157
9.3. Карта контролю.....	160
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТУ.....	167
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	170

ВСТУП

Розробка технологій мікробіологічного захисту рослин з пошуком альтернативних шляхів зниження ризику виникнення та поширення патогенів різної етіології, контролю фітофагів на сьогоднішній день є пріоритетним і прогресивним напрямком систем сільського господарства. Використання сучасних біотехнологічних препаратів не лише підвищує стійкість рослин до шкочинних організмів, а й сприяє оздоровленню агроценозів, зменшенню дії дестабілізуючих факторів основних сільськогосподарських культур. В результаті інтенсивних досліджень останніх років у світових наукових центрах розробляються та впроваджуються препаративні форми мікробних препаратів для захисту рослин на основі живих спор, антагоністів та їх метаболітів, швидкодіючих токсигенних компонентів тощо. Як основу бактеріальних препаратів для фітозахисту активно використовують ризосферні мікроорганізми, зокрема бактерії роду *Bacillus* з потенціалом ентомоцидної та антагоністичної активності відносно широкого кола комахшкідників та фітопатогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу метаболітів різної природи. Деякі представники роду *Bacillus* відомі як потенційні еліситори, за допомогою яких можливо контролювати та значно знижувати рівень ураження патогенами рослин на різних стадіях онтогенезу. Бактерії роду *Bacillus* займають особливе місце в агробіоценозах – мають різний рівень контагіозності та слугують для створення штучних вогнищ епізоотій, стримують масове розмноження та наростання чисельності фітофагів. Біологічне різноманіття, адаптивність та багатофункціональність білкових токсинів бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt) дозволяє ефективно контролювати широкий спектр комах-шкідників (*Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*).

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розроб.	Петренко О.В.						
Перевір.	Ключка Л.В.						
Консультан.							
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		
					Літ.	Аркуш	Аркушів
						6	3

Високий токсигенний потенціал та знання специфічних особливостей взаємодії «патоген-хазяїн» (різні реакції та морфофункціональні перетворення на клітинному й субклітинному, організмовому та популяційному рівнях), градація щодо перебігу інфекційно-патологічних процесів в цільових організмах (розподіл за патологічними варіантами) розширюють можливості використання вищезазначених мікробних агентів як продуцентів біопрепаратів фітозахисного призначення [1].

Загальновизнано, що одним із найбільш перспективних і широко використовуваних на сьогодні біопестицидів для контролю чисельності і шкідливості фітофагів є мікробні препарати на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*. Різноманітність цієї групи бактерій із кожним роком поповнюється новими серотипами, що відрізняються багатобічною дією на комах: антифідантною, метатоксичною, фізіологічною, тератогенною, дерепродукційною, що обумовлює високу біологічну, економічну, соціальну ефективність біопрепаратів на їх основі.

На сьогодні описано понад 70 різновидів *Bacillus thuringiensis*, ефективних проти широкого спектру фітофагів із рядів *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, одночасно не токсичних для корисної ентомофауни, риб, теплокровних тварин і людини. Свідома інтродукція в агробіоценози мікроорганізмів з інсектицидними, ларвіцидними, фунгіцидними та іншими властивостями диктується глобальною проблемою, що виникла в результаті техногенно-інтенсивної системи землеробства, з широким застосуванням синтетичних інсектицидів, що супроводжується негативними наслідками: порушенням природних біоценозів, завдання збитків нецільовим об'єктам флори та фауни, здоров'ю людини, підвищенням ентومорезистентності до інсектицидів (пестицидний синдром), створенням потенційної загрози віддалених шкідливих наслідків [2].

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва (апаратурна і технологічна схеми) ларвіцидного ендотоксинового препарату на основі споровокристалічного комплексу бактерій *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 для подальшого його очищення та пакування у пластикові банки.

Актуальність.

З кожним роком в Україні зростає виробництво шампінйонів, які використовують для власних потреб та йдуть на експорт. Однак продуктивність таких ферм зменшується за рахунок враження грибів грибними комариками, внаслідок чого гриби втрачають свій товарний вигляд та розвиваються бактеріальні хвороби [3].

В даний час використовуються такі хімічні інсектициди – *перифосметил*, *дифлубензурон*, *тиаметоксам*.

Недоліком їх є:

1. поява стійких популяцій при постійному використанні
2. Накопичуються у природі та викликають небажані мутації у природі.
3. Хімічно небезпечні речовини

Тому **актуальним** є заміна хімічних інсектицидів на біологічні. Оскільки біопрепарати мають наступний перелік переваг:

1. повністю безпечні;
2. не накопичується в рослинах і ґрунті;
3. швидке розкладання діючої речовини, що дозволяє використовувати препарат перед збором врожаю;
4. відсутність резистентності у комах до препарату - незмінна норма внесення [6].

Нивизна полягає у використанні спрощеної методики отримання бактеріального препарату на основі *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* яка у порівнянні з відомими технологіями є економічно вигіднішою і дозволяє отримати препарат з високою ларвіцидною активністю [5].

Таким чином розробка біопрепарату на основі даного біологічного агенту дасть змогу фермерам та компаніям, які займаються вирощуванням грибів на Україні, менше витратити коштів на закордонні біопрепарати та уникнути пагубної дії хімічних інсектицидів, оскільки вони мають значно меншу ціну. Виходячи з цього, розробка нового біопрепарату покращить екологічний стан регіонів де займаються вирощуванням грибів [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1 Опис δ -ендотоксину

δ -ендотоксин (параспоральний кристалічний ендотоксин). Утворюється у процесі споруляції у протилежній до спори, що формується, частині бактерії. На завершальній стадії спороутворення токсин набуває форми правильного восьмикутного кристалу, розміри якого варіюють від 0,5х1,3 до 1х3,5 мкм. У більшості різновидів *Bacillus thuringiensis* утворення спори і кристалу супроводжується розпадом стінки клітини, у результаті чого спори і кристали вивільняються і потрапляють у культуральне середовище. Для розчинення кристалу необхідне лужне середовище (рН=10-12), властиве кишечнику комах. Білок кристалів δ -ендотоксину є протоксином, який розщеплюється у лужному середовищі кишечника комах під дією протеолітичних ферментів, утворюючи активізований токсин, який призводить до паралічу або загибелі комах [7].

Ентомопатогенні препарати, які зараз випускаються на основі *Bacillus thuringiensis*, містять суміш сухих спор і кристалів δ -ендотоксину. Хоча відомо, що основним діючим початком є білковий інсектицидний δ -ендотоксин і наявність спор є не обов'язковою. Титр життєздатних спор в препаратах досягає 60-100 млрд./г. При застосуванні таких препаратів білкові кристали розкладаються і через деякий час зникають, тоді як спори завдяки своїй стійкості продовжують тривалий час існувати і в сприятливих умовах можуть проростати і розмножуватися. У зв'язку з цим перспективним є створення безспорових біоінсектицидів ще більш екологічно безпечних, ніж існуючі засоби захисту рослин [8].

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Петренко О.В.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Лім.	Аркуш	Акрушів
Перевір.		Ключка Л.В.					9	8
Консультан.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

1.1.1 Будова кристалів δ-ендотоксину

Різні штами *Bacillus thuringiensis* (часто навіть з одного сероваріанта) значно відрізняються за спектром інсектицидної дії і токсичності продукуемого ними кристалічного білку. Це пов'язано з великим різноманіттям δ-ендотоксинів, що синтезуються різними штамми *Bacillus thuringiensis*, так і з продукуванням у клітинах одного штаму параспорових включень, що містять декілька різних інсектицидних білків [9].

Дельта-ендотоксини кодуються генами Cry кристалічних білків. Виділені з безлічі штамів *Bacillus thuringiensis*, білки у відповідності до їх токсичності та структурної близькості можна згрупувати в чотири основні класи: CryI, CryII, CryIII і CryIV. Білки CryI токсичні для лускокрилих (*Lepidoptera*), CryII – для лускокрилих (*Lepidoptera*) і двокрилих (*Diptera*), CryIII – для жуків (*Coleoptera*), CryIV – для двокрилих (*Diptera*). Класи можна розділити далі на підкласи (A, B, C, ...) і підгрупи (a, b, c, ...) згідно нуклеотидним послідовностей генів відповідних токсинів. Наприклад, клас генів cryI включає шість підкласів (від cryIA до F), а підклас cryIA - три підгрупи [від cryIA (a) до (c)] [10,13].

Для токсинів показано чітко виражену доменну структуру. С-кінцевий район досить консервативний серед різних класів ентомоцидних білків. При протеолізі він легко деградує шляхом відщеплення невеликих фрагментів з молекулярною масою 15-35 кДа, які у свою чергу швидко піддаються подальшому гідролізу. N-кінцевий район (відповідний "істинному токсину") відносно стійкий до протеолізу і набагато більш варіабельний у різних білків, ніж С-кінцевий район. Таким чином, вихідні 130-145 кДа білки представляють собою протоксини, які потребують активації протеїназами кишкового соку комах [11].

Методом рентгеноструктурного аналізу третинна структура визначена для двох ентомоцидних білків: дельта-ендотоксину Cry3Aa (67 кДа), що продукується *ssp. tenebrionis* і "істинного токсину", відповідного протоксину Cry1Aa (65 кДа, *ssp. kurstaki*). Притому, що ідентичність цих білків за амінокислотної послідовності становить лише 33%, їх третинні структури подібні. Вирівнювання первинної структури інших ендотоксинів і розрахунок передбачуваної вторинної структури

дозволяють припустити, що всі вони мають принципово подібне укладання поліпептидного ланцюга [11,13].

Третинна структура молекули «істинних токсинів» представлена трьома доменами (рис. 1.1). Перший, N-кінцевий, побудований з семи α -спіралей, при цьому переважно гідрофобна п'ята α -спіраль оточена шістьма амфіфільними так, що гідрофобні поверхні останніх повернені до α -5. Спіралі α -3 – α -7 мають достатню довжину (5-9 повних обертів, більше 30 Å), щоб пронизати двохшарову клітинну мембрану. Найбільш довга (45 Å) спіраль α -6 містить 9 повних оборотів [11].

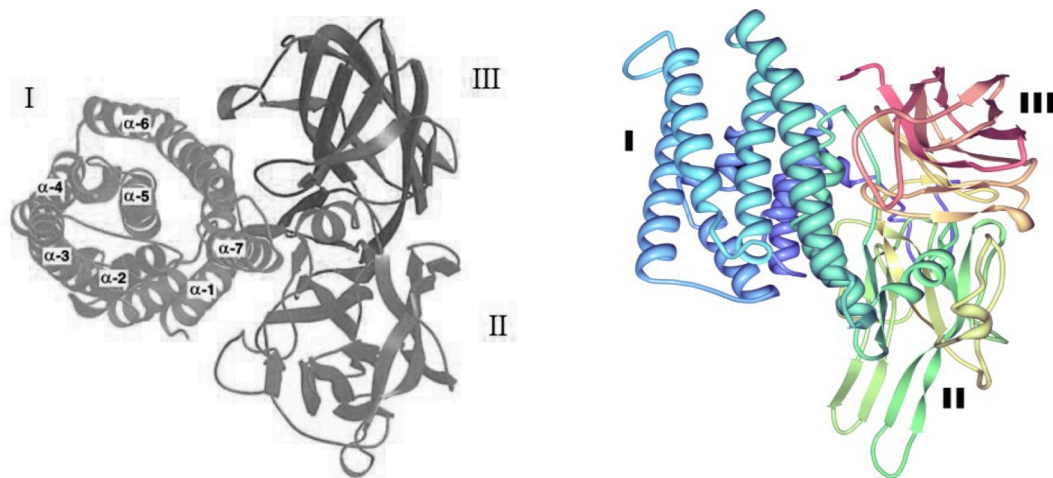


Рис 1.1 Первинна, вторинна та третинна структура білка ендотоксину [11,12].

Другий домен складається з трьох β -листів, зімкнутих так, що в перерізі виходить трикутник. Два перших β -листа складаються з чотирьох антипаралельних складок; третій - з трьох β -складок і однієї невеликої α -спіралі (α -8). У складі кожного β -листа між двома внутрішніми нитками утворюється петля. Ці петлі зібрані відносно близько один до одного на вершині молекули [12].

Третій домен являє собою "сендвіч" з двох антипаралельних β -листів.

Незважаючи на чітко виражену доменну структуру, в ході денатурації молекула ендотоксину веде себе як єдине ціле. Ця цілісність забезпечується тісними міждоменними контактами.

Найбільш сильні контакти виявлені між першим і другим доменами (площа, зайнята контактами становить 1930 Å^2), дещо менша площа контакту між доменами I і III (1180 Å^2). У взаємодіях цих доменів велику роль грають водневі зв'язки і сольові

містки. Другий і третій домени контактують досить невеликою поверхнею ($910 \text{ \AA}^2$), та їх зв'язок зумовлений, в основному, гідрофобними взаємодіями [13].

1.1.2 Механізми дії δ -ендотоксину на біохімічні процеси комах

Щоб комаха загинула, кристали повинні потрапити у його організм. При деяких індивідуальних відмінностей комах первинним місцем дії δ -ендотоксину завжди являється середній відділ кишківника [14].

У параспоральному кристалі інсектицид зазвичай знаходиться в неактивній формі; при солюбілізації кристала білок вивільняється у формі протоксину, попередника активного токсину. Протоксин класу токсинів CryI має молекулярну масу приблизно 130 кДа. Після проковтування комахою параспорального кристалу, протоксин активується в кишківнику в умовах лужного рН (7,5-8,0) і під дією протеолітичних трипсино- та хімотрипсиноподібних ферментів перетворюється в активний токсин з молекулярною масою приблизно 68 кДа [15].

Наступною стадією токсичного впливу є зв'язування активного токсину з афінним до нього білком (рецептором), експонованих на поверхні апікальних мембран епітеліальних клітин кишечника. Зв'язування токсину з рецептором є оборотним.

На наступній стадії відбувається необхідна перебудова конформації молекули токсину з наступним впровадженням деяких з формуючих її структур у мембранний бішар. Після цього зв'язування токсину з мембраною стає незворотнім. Необхідність вбудовування α -спіралей першого домену в мембрану чутливої клітини для того, щоб зв'язування стало незворотнім, доводиться тим, що неповноцінна молекула токсину, що складається тільки з II-го та III-го доменів, зв'язується з мембраною тільки оборотно [14,15].

Одночасно з вбудовуванням в мембрану відбувається асоціація декількох молекул токсину. Ансамбль трансмембранних ділянок, що належать кільком асоційованим молекулам токсину, утворює (в залежності від конкретної пари токсин / мембрана) пору, або іонний канал.

У першому випадку (утворення пори), відбувається загибель клітин за механізмом колоїдно-осмотичного лізису.

У другому, (утворення іонного каналу) - внаслідок різкої зміни іонного складу і рН внутрішньоклітинного середовища [14,15].

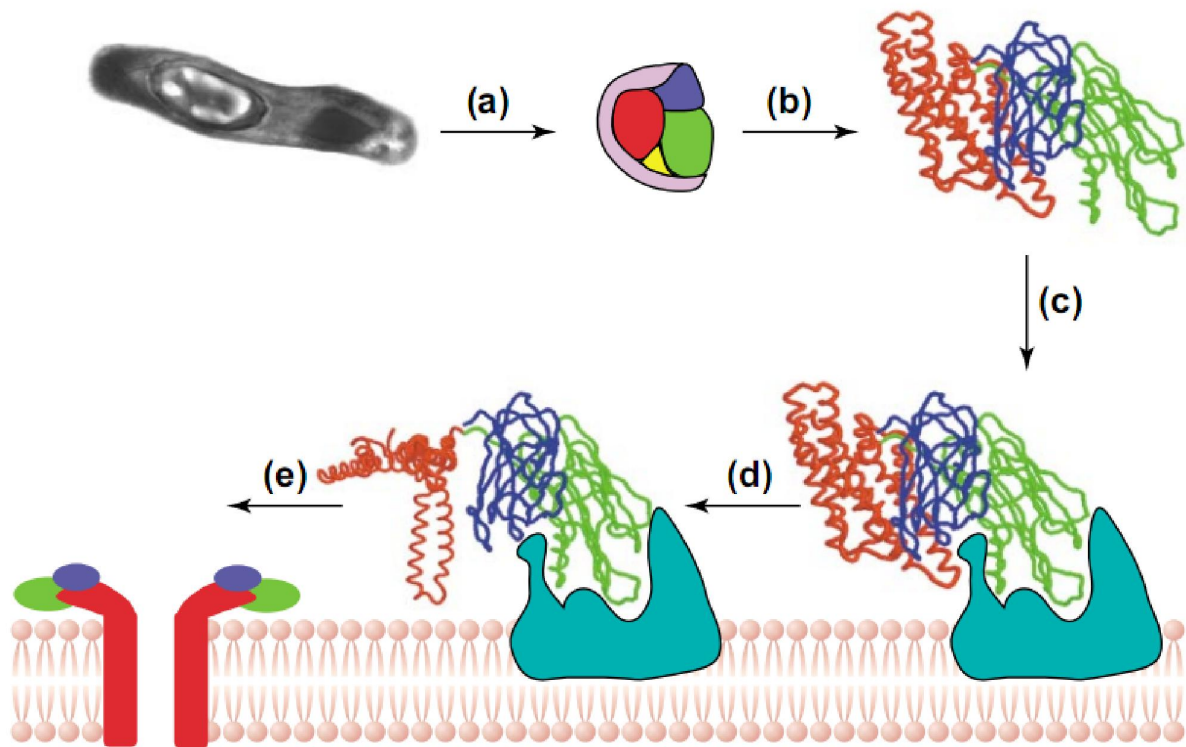


Рис 1.2 Механізм дії б-ендотоксину [16].

Приблизно через 15 хвилин після формування такого іонного каналу клітинний метаболізм блокується, комаха перестає харчуватися, відбувається зневоднення організму і в кінці кінців настає смерть [15,16].

Оскільки перетворення протоксину в активний токсин відбувається тільки в умовах лужного рН і в присутності певних протеїназ, ймовірність шкідливого впливу токсинів на людину і сільськогосподарських тварин мала [16].

1.2 Загальна характеристика готового препарату “Gnatrol”

Суха форма біопрепарату “Gnatrol” є ефективним біопрепаратом, який пропонується для боротьби з личинками грибних комариків на грибних фермах [17].

“Gnatrol” виробляється на основі спорової кристалоутворюючої бактерії *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B+H-14).

Препаративна форма - це висушина біомаса та кристали ендотоксину світло-коричневого кольору, вміщує в собі спори, кристалічні ендотоксини, залишки поживного середовища. Один мілілітр препарату вміщує не менше 3 млрд. життєздатних спор і кристалів ендотоксину [17].

“Gnatrol” є виключно ларвіцидним мікробним препаратом кишкової дії, ентомоцидність якого проявляється при живленні комах. При попаданні в стравохідний канал личинок комарів біопрепарат викликає токсикоз і потім гибель.

Термін гибелі личинок буває від кількох годин до декількох днів і залежить від дози біопрепарату і фізіологічного стану личинок.

“Gnatrol” відноситься до групи малонебезпечних речовин для людини і теплокровних тварин (IV клас безпеки), не має шкірно-подразнюючої, алергічної і сенсibiliзуючої дії [17].

“Gnatrol” нешкідливий для корисних комах (ентомофагів, бджіл, тутового шовкопряда).

Фізико-хімічні властивості препарату: не летучий; розчинний у воді але випадає з часом в осад; немає корозійних властивостей; не вибухонебезпечний та не займистий; має 4 клас безпеки.

Спосіб застосування “Gnatrol” проти комарів

При приготуванні робочих розчинів визначають потрібну кількість біопрепарату, враховуючи площу грибної ферми перед проведенням обробки.

Порядок приготування робочих розчинів такий: відважену дозу препарату поміщають спочатку в невеликий, але достатній для розведення, об'єм, ретельно перемішують до одержання однорідної, суспензії, а потім концентрований розчин переносять в основний резервуар і, додаючи воду при безупинному перемішуванні, доводять його до необхідної концентрації.

Для приготування робочих суспензій можна використовувати будь-яку воду з температурою не вище +30°C [17].

Враховуючи що грибні ферми займаються вирощування грибів цілий рік, а на повний цикл вирощування печериць піде 2 місяці, оскільки це відбувається у спеціальних теплицях при певних температурних умовах та вологості, то кількість циклів вирощування за рік сягає 5-6 [18].

Обробку препаратом передбачають дрібнодисперсним обприскуванням перед посадження печериць в даний субстрат та після обростання субстрату міцелієм, тобто

приблизно через 2 тижні після їх посіву, одразу після здійснення прорізів у субстраті. Для обробки використовують 4 мл на 0,1 м² [19].

- * За дослідними даними даний препарат використовують 4 мл на 0,1 м², тобто 40 мл на 1 м² [19].
- * Згідно інструкції закордонного препарату “Gnatrol” розводять у такому співвідношенні 507 г сухого препарату на 100 галонів (455 л) або 5 г на 1 галон (4,5 л).
- * Препарат містить 3000 токсичних одиниць на 1 мг сухого препарату [17].

Робочу суспензію готують безпосередньо перед обробкою.

Зберігання біопрепарату “Gnatrol”

Біопрепарат “Gnatrol” - висушений препарат, оброблений консервантами, що дозволяє збільшити його термін зберігання. Біопрепарат повинен зберігатись в герметично закритій тарі [17].

На термін 3-4 тижні біопрепарат з консервантом можна зберігати в приміщенні, захищеному від сонячних променів і температурі повітря не вище 30°C.

На термін до 6 місяців біопрепарат необхідно зберігати в приміщенні, де температура повітря в межах +5°C. Без консерванту біопрепарат зберігається не довше 7 днів.

Після зберігання необхідно коригувати норми витрати біопрепарату. Якщо зменшився титр, то відповідно збільшується норма витрати. Титр препарату визначається його виробником.

Біопрепарат використовується повністю із кожної тарної одиниці, для запобігання розмноження в ньому дріжджів та інших мікроорганізмів.

Робочий розчин біопрепарату може зберігатись до двох годин [17].

Заходи перестороги під час роботи з біопрепаратом

“Gnatrol”

Біопрепарат безпечний для людини, теплокровних тварин, нецільових гідробіонтів, риб та корисних комах.

“Gnatrol” відноситься до малотоксичних речовин і тому не вимагає при роботі з ним особливих заходів безпеки. Достатньо ватно-марлевої пов'язки, або респіратор

"Пелюсток" та гумових рукавичок. Після роботи з препаратом необхідно вимити лице і руки з милом.

Під час роботи з препаратом забороняється палити, пити та приймати їжу.

До роботи з препаратом не допускаються особи з хронічними захворюваннями органів дихання, зору, шкіри, схильних до алергічних реакцій [17].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Серед бактеріальних препаратів для захисту рослин найбільш поширеними є препарати на основі роду *Bacillus*. Препарати на основі цих бактерій мають інсектицидні властивості і використовуються у захисті рослин з 1928 року. Досить розповсюдженими є також фунгіциди на основі цих бактерій. Це препарати, які містять живі клітини *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureofaciens* або інших видів бактерій.

В Україні препарати для захисту рослин від комах-шкідників на основі бактерій виробляються лише із застосуванням штамів *Bacillus thuringiensis* [6].

Ентомопатогенні препарати, які зараз випускаються на основі *Bacillus thuringiensis*, містять суміш сухих спор і кристалів δ-ендотоксину. Хоча відомо, що основним діючим компонентом є білковий інсектицидний δ-ендотоксин і наявність спор є не обов'язковою. Титр життєздатних спор в препаратах досягає 60-100 млрд./г. При застосуванні таких препаратів білкові кристали розкладаються і через деякий час зникають, тоді як спори завдяки своїй стійкості продовжують тривалий час існувати і в сприятливих умовах можуть проростати і розмножуватися. У зв'язку з цим перспективним є створення безспорових біоінсектицидів ще більш екологічно безпечних, ніж існуючі засоби захисту рослин [3].

Світовий збут біопестицидів становить 0,5% усього обсягу світового ринку агрохімії. З цієї кількості близько 90% біопестицидів представлено бактерією *Bacillus thuringiensis* – це 1–2% світового ринку інсектицидів [6].

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Петренко О.В			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	Літ.	Аркуш
Перевір.		Ключка Л.В					17
Консультан.							18
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Затверд.		Пирог Т.П.					

Біопрепарати фітозахисного призначення можуть бути використані для формування самостійної системи захисту (екологічно орієнтовані системи сільського господарства) або включатися в систему інтегрованого захисту, істотно знижуючи пестицидний прес на агроценози. Важлива перевага біологічних препаратів в тому, що їх використання сприяє збереженню природного біорізноманіття, що забезпечує участь природних агентів у регулюванні чисельності шкідливих об'єктів і призводить до відновлення природної саморегуляції біоценозів. Введення у системи захисту біопрепаратів забезпечує збільшення урожаю основних культур і підвищення якості сільськогосподарської продукції; можливість відмови від використання ряду дорогих і токсичних пестицидів; підвищення родючості ґрунтів, оздоровлення ґрунтової мікробіоти; можливість переорієнтації господарств на виробництво екологічно чистої продукції. Поза сумнівом, що біопрепарати перевершують пестициди за екологічною і соціальною значимістю, а тому продукція, захищена біометодом, завжди буде чистіша, якісна і, відповідно, економічно вигідніша [2].

На першому етапі вибору різні штами продуцентів порівнюються за показниками спороутворення та час культивування. Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей спороутворення з використанням бактерій роду *Bacillus* як продуцентів ендотоксину наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів δ -ендотоксину

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація спор, млрд.спор/мл	Тривалість культивування, год	Особливість процесу	Використана література
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> –7-1/23	Кукурудзяна мука – 24 Кормові дріжджі – 20 (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 5 CaCl ₂ ×2H ₂ O – 1,5 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5	4,52	51	pH 7,8-8. t = 28-30°C P = 0,3-0,4 атм Висока аерація	Патент [20]
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> k-Ym07/КБ	Кукурудзяна мука – 20 Кормові дріжджі – 35 (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 6 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,4 CaCl ₂ ×2H ₂ O – 2	3,9	72	pH 8 t = 28-30°C P = 0,4-0,5 атм Висока аерація	Патент [21]
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>darmstadiensis</i> N 25	Соева мука – 25 Кукурудзяний крохмал – 25 Дріжджі кормові – 5 K ₂ HPO ₄ – 3 MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,2 CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,1	4,0	72	pH 8 t = 28-30°C P = 0,2-0,4 атм Висока аерація	Патент [22]

Всі три наведених мікроорганізми є факультативними анаеробами, тому доцільніше використовувати культивування глибинним способом, тому, що це є менш енергозатратніше, більш економічно вигідно, менші втрати цільового продукту при виділенні, також менший ризик контамінації.

Культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, проводиться на поживному середовищі невизначеного складу яке містить доступні компоненти, час культивування на даному середовищі є найкоротшим – всього 51 година, у порівнянні з іншими штамами - це на 21 годину менше за інших, тож це може зменшити затрату енергоресурсів на культивування. Концентрація біомаси (спор) млрд.спор/мл у цього штаму значно висока – 4,52 млрд.спор/мл, температура культивування становить 28-30⁰С та рН становить 8, що не сильно відрізняється від інших. Для даного штаму є перевага в тому що він володіє ларвіцидною активністю, тобто здатний летально впливати не тільки на комах дорослого віку, а й безпосередньо на самі личинки [20].

Штам *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* k-Ym07/КБ володіє найменшою концентрацією біомаси (спор) 3,9 млрд.спор/мл серед конкурентів, також час культивування у цього штаму більший на 21 годину ніж у першого (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23) але однаковий порівняно з третім штамом (*Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* N 25) і становить 72 години, температура культивування становить 28-30⁰С та рН становить 8, що не сильно відрізняється від інших [21].

Продуцент ендотоксину *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* N 25 є досить ефективним для виробництва препарату на основі біомаси, його продуктивність по біомасі є не найвищою, проте досить суттєвою 4,0 млрд.спор/мл, час культивування триває 72 години, температура культивування становить 28-30⁰С та рН становить 8, що не сильно відрізняється від інших. Найбільший недолік даного штаму є досить складне поживне середовище, з двома джерелами вуглецю (кукурудзяний крохмаль та соєва мука) і азоту (дріжджова маса та соєва мука) [22].

Проаналізувавши таблицю, можна зробити висновок, що кожний із представлених продуцентів ендотоксину у процесі біосинтезу має свої особливості, які сприяють збільшенню спороутворення. Найвищий показник спороутворення – 4,52 млрд.спор/мл досягається при культивуванні *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23. Найнижчий показник спороутворення спостерігається у *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* k-Ym07/КБ – 3,9 млрд.спор/мл. Також *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 відзначається ларвіцидною активністю проти личинок комах різних родів.

Зміни кислотності (pH) середовища, температурного режиму, аерації надають значний вплив на вихід остаточних продуктів метаболізму бактерій. Ці зміни можуть залежати як від технологічних умов культивування, так і від фізіологічних особливостей посівного матеріалу.

Вивчення динаміки розвитку культур *Bacillus thuringiensis* показало стабільність споро- і кристалоутворення при переході від лабораторних умов вирощування (колби) до виробничих у ферментері, а також порівняно невелику тривалість культивування (51 годин), яка забезпечує максимальне продукування біологічно активних речовин [2].

Така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою для вибору біологічного агента. Тому на другому етапі порівнювали вартість поживних середовищ, на яких ростуть продуценти в табл. 2.2.

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
продуцентів δ -ендотоксину**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> –7-1/23	Кукурудзяна мука – 24	20	0,48	2
	Кормові дріжджі – 20	11	0,22	3
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 5	13	0,065	3
	CaCl ₂ ×2H ₂ O – 1,5	12,20	0,0183	1
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5	10	0,005	1
Вартість 1 л середовища – 0,7883 грн				
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> k-Ym07/КБ	Кукурудзяна мука – 20	20	0,4	2
	Кормові дріжджі – 35	11	0,385	3
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ – 6	13	0,078	3
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,4	10	0,004	1
	CaCl ₂ ×2H ₂ O – 2	12,20	0,0244	1
Вартість 1 л середовища – 0,8914 грн				
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>darmstadiensis</i> N 25	Соева мука – 25	25	0,625	3
	Кукурудзяний крохмал – 25	16,50	0,4125	2
	Кормові дріжджі – 5	11	0,055	3
	K ₂ HPO ₄ – 3	100	0,3	2
	MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,2	10	0,002	1
	CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,1	12,20	0,00122	1
Вартість 1 л середовища – 1,39 грн				

1. <https://prom.ua> 2. <https://flagma.ua> 3. <https://agronet.ua>

***Примітка 1** Ціни на компоненти поживних середовищ взяті з українських промислових інтернет магазинів, станом на 2019 рік.

У табл. 2.2 наведено вартість компонентів поживних середовищ та 1 л середовища для культивування продуцентів *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, ціна становить за 1 літр – 0,7883 грн, воно містить не дорогі компоненти поживного середовища, таким чином дане середовище має найнижчу ціну. Середовище, для *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* k-Ym07/КБ – має вартість – 0,8914 грн, це середнє за вартістю середовище і для *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* N 25 – ціна середовища становить 1,39 грн за літр, це найдорожча ціна середовища,

оскільки в ній є відносно дорогі компоненти порівняно з іншими поживними середовищами такі як K_2HPO_4 та соєва мука.

Отже, за даними наведеними у табл. 2.2 можна зробити висновок, що середовище для культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 є найдешевшим і його економічно вигідно використовувати на виробництві, також на даному поживному середовищі спостерігається найбільший титр спор порівнянно з іншими продуцентами.

Однак така характеристика не є остаточною при виборі біологічного агента, тому наступне на що потрібно звернути увагу, це умовна вартість 1 л цільового продукту при культивуванні 3-ох продуцентів. Оскільки рахувати умовну вартість продукту по титру спор не є доцільним, розрахуємо теоретичних вихід біомаси кожного із продуцентів (п. 2.2) та виходячи із умовної вартості середовища для культивування, підрахуємо економічну доцільність використання кожного із штамма на виробництві табл. 2.3

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 л цільового продукту при культивуванні *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* k-Ym07/КБ та *Bacillus thuringiensis* var. *Darmstadiensis* N 25

Біологічний агент	Вартість 1л середовища грн	Кількість біомаси утвореної за годину, г/год	Теоретичний вихід біомаси, г/л	Умовна вартість 1 г біомаси, грн/г	Тривалість культивування, год
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> –7-1/23	0,7883	0,19	10	0,08	51
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> k-Ym07/КБ	0,8914	0,16	11,8	0,08	72
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>darmstadiensis</i> N 25	1,39	0,18	13,3	0,10	72

Штам *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* k-Ym07/КБ має один із найдовших годин культивування при досить небагатокомпонентному складі поживного середовища, до того ж час культивування триває довше від штаму *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, має відносно дорожче поживне середовище, і вихід титру спор млрд./мл у даного штаму є дуже низьким – 3,9, хоча теоретичний вихід біомаси не найвищий, але і не сильно відрізняється від інших продуцентів. Умовна вартість по біомасі на 1 л середовища становить 0,08 гривень що не є найдешевшою ціною порівняно з іншими штамми.

Штам *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* N 25 має однаково довгий час культивування з штамом *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* k-Ym07/КБ - 72 год, також досить дороге поживне середовище і вихід титру спор млрд./мл – 4,0 та теоретичний вихід біомаси не сильно відрізняється але на 3,3 г більший, що у даного штаму є задовільною. Штам має найвищу умовну вартість по біомасі на 1 л середовища яка становить 0,10 гривень. Даний біологічний агент є досить дорогим для використання у одержанні ендотоксину.

Штам *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, на відміну від інших, є досить перспективним, оскільки має дуже дешеве поживне середовище, з основним субстратом і джерелом азоту у вигляді суміші кормових дріжджів та кукурудзяної муки. А також кілька солей, як джерел макро- та мікроелементів. Тривалість культивування у даного штаму найменша з вище перерахованих мікроорганізмів, також це обумовлюється високою концентрацією біомаси на виході і відповідно ціною за одиницю маси на суму в 0,08 гривню виграє на 100% у інших штамів. А оскільки при масовому виробництві препарату важливе дешеве поживне середовище, з доступних компонентів, цей продуцент займає стійкі позиції відносно попередніх.

Температура культивування та рН не сильно відрізняються від інших штамів, а ось тривалість складає 51 годину. Це найкоротша тривалість культивування з поміж інших.

Висновок: на основі порівняльної характеристики штамів-продуцентів ендотоксину, було обрано штам *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, з причин найбільшої економічної доцільності, через низьку вартість поживного середовища,

високу концентрацію біомаси та їх співвідношень, на користь високої концентрації цільового продукту, що є вирішальним для даного препарату, оскільки у ньому головне максимально можлива концентрація біомаси при мінімальних затратах на поживне середовище і параметри культивування, а даних параметрах та концентрації біомаси виграє саме цей штам, оскільки інші не дотягують у співвідношенні ціна поживного середовища і оптимальні параметри культивування / до вихідної концентрації біомаси.

Оптимальним середовищем за продуктивністю штамів *Bacillus thuringiensis* виявилося модифіковане дріжджеполісахаридне середовище, до складу якого входить кукурудзяна мука, кормові дріжджі та мінеральні солі, що забезпечує титр спор до 4,52 млрд.спор/мл культуральної рідини. При оцінці штамів цього серотипу особлива увага приділена продукції штамом кристалічного ендотоксину і ларвіцидної його активності. Рівень ларвіцидності прямо пропорційний кількості в препараті кристалічного ендотоксину.

Також як говорилося вище, даний штам володіє ларвіцидною активністю, тобто здатний летально впливати не тільки на комах дорослого віку, а й безпосередньо на самі личинки.

2.2. Розрахунок теоретичного виходу біомаси

Bacillus thuringiensis var. *israelensis*–7-1/23

Склад поживного середовища, г/л:

Кукурудзяна мука – 24

Кормові дріжджі – 20

(NH₄)₂HPO₄ – 5

CaCl₂×2H₂O – 1,5

MgSO₄×7H₂O – 0,5

Джерелом вуглецю є кукурудзяна мука та кормові дріжджі. Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяній муці та кормових дріжджах. Кукурудзяна мука містить клітковину та крохмалю 70-80%.

24 г – 100%

x – 80%

$x = 19,2$ г крохмалю містить 24 г кукурудзяної муки.

Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяній муці. Молекулярна маса ($C_6H_{12}O_6$) = $12 \times 6 + 1 \times 12 + 16 \times 6 = 180$ г/моль

$$19,2 - 180$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 7,68 \text{ г}$$

Кормові дріжджі містять у своєму складі 30-40% глюкози. Розрахуємо кількість глюкози яка міститься в кормових дріжджах.

$$20 - 100\%$$

$$x - 30\%$$

$x = 6$ г кількість глюкози містять 20 г кормових дріжджів.

Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кормових дріжджах.

$$6 - 180$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 2,4 \text{ г}$$

Отже теоретичний вихід біомаси за вуглицем становить $7,68 + 2,4 = 10,08$ г/л. Якщо вважати, що половина глюкози іде на отримання мікроорганізмом енергії, то виходить, що для росту біомаси може бути використано лише 5,04 г карбону.

Оскільки вміст карбону у клітині становить приблизно 50%, то виходить, що на даному середовищі може утворитися 10,08 г/л біомаси.

Джерелом азоту є $(NH_4)_2HPO_4$. Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по $(NH_4)_2HPO_4$.

Молекулярна маса $(NH_4)_2HPO_4$ дорівнює 131. Отже, у 131 г гідрофосфату амонію міститься $14 \cdot 2 = 28$ г азоту, тоді у 5 г гідрофосфату амонію міститься азоту:

$$131 - 5$$

$$2 \cdot 14 - x$$

$$x = 1,068 \text{ г}$$

Якщо вважати, що в біомасі міститься 10% нітрогену, то з 1,068 г нітрогену можна одержати 10,68 г/л біомаси.

Отже, в даному випадку лімітувальним фактором виступає вміст карбону в середовищі. Теоретично можливий рівень біомаси – 10,08 г/л.

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* k-Ym07/КБ

Склад поживного середовища, г/л:

Кукурудзяна мука – 20

Кормові дріжджі – 35

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 6

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2

Джерелом вуглецю є кукурудзяна мука та кормові дріжджі. Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяній муці та кормових дріжджах. Кукурудзяна мука містить клітковину та крохмалю 70-80%.

$$20 \text{ г} - 100\%$$

$$x - 80\%$$

$$x = 16 \text{ г крохмалю містить } 20 \text{ г кукурудзяної муки.}$$

Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяній муці. Молекулярна маса $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 12 \times 6 + 1 \times 12 + 16 \times 6 = 180 \text{ г/моль}$

$$16 - 180$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 7,6 \text{ г}$$

Кормові дріжджі містять у своєму складі 30-40% глюкози. Розрахуємо кількість глюкози яка міститься в кормових дріжджах.

$$35 - 100\%$$

$$x - 30\%$$

$$x = 10,5 \text{ г кількість глюкози містять } 35 \text{ г кормових дріжджів.}$$

Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кормових дріжджах.

$$10,5 - 180$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 4,2 \text{ г}$$

Отже теоретичний вихід біомаси за вуглицем становить $7,6 + 4,2 = 11,8$ г/л. Якщо вважати, що половина глюкози іде на отримання мікроорганізмом енергії, то виходить, що для росту біомаси може бути використано лише 5,9 г карбону.

Оскільки вміст карбону у клітині становить приблизно 50%, то виходить, що на даному середовищі може утворитися 11,8 г/л біомаси.

Джерелом азоту є $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Молекулярна маса $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ дорівнює 131. Отже, у 131 г гідрофосфату амонію міститься $14 \cdot 2 = 28$ г азоту, тоді у 5 г гідрофосфату амонію міститься азоту:

$$131 - 6$$

$$2 \cdot 14 - x$$

$$x = 1,28 \text{ г}$$

Якщо вважати, що в біомасі міститься 10% нітрогену, то з 1,28 г нітрогену можна одержати 12,8 г/л біомаси.

Отже, в даному випадку лімітувальним фактором виступає вміст карбону в середовищі. Теоретично можливий рівень біомаси – 11,8 г/л.

Bacillus thuringiensis var. *Darmstadiensis* N 25

Склад поживного середовища, г/л:

Соєва мука – 25

Кукурудзяний крохмал – 25

Дріжді кормові – 5

K_2HPO_4 – 3

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1

Джерелом вуглецю є соєва мука та кормові дріжджі. Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяній муці та кормових дріжджах. Соєва мука містить вуглеводів 25%.

$$25 \text{ г} - 100\%$$

$$x - 25\%$$

$$x = 6,3 \text{ г вуглеводів містить } 25 \text{ г соєвої муки.}$$

Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяній муці приймаючи вуглеводи як глюкозу. Молекулярна маса ($C_6H_{12}O_6$) = $12 \times 6 + 1 \times 12 + 16 \times 6 = 180$ г/моль.

$$6,3 - 180$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 2,5 \text{ г}$$

Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяному крохмалю. Він містить глюкози 98%.

$$25 \text{ г} - 100\%$$

$$x - 98\%$$

$$x = 24,5 \text{ г вуглеводів містить } 25 \text{ г кукурудзяний крохмаль.}$$

Розрахуємо теоретичний вихід біомаси по кукурудзяній муці. Молекулярна маса ($C_6H_{12}O_6$) = $12 \times 6 + 1 \times 12 + 16 \times 6 = 180$ г/моль.

$$24,5 - 180$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 9,8 \text{ г}$$

Кормові дріжджі містять у своєму складі 30-40% глюкози. Розрахуєм кількість глюкози яка міститься в кормових дріжджах.

$$9,8 - 100\%$$

$$x - 30\%$$

$$x = 3 \text{ г кількість глюкози містять } 20 \text{ г кормових дріжджів.}$$

Розрахуєм теоретичний вихід біомаси по кормових дріжджах.

$$3 - 180$$

$$x - 6 \times 12$$

$$x = 1,2 \text{ г}$$

Отже теоретичний вихід біомаси за вуглицем становить $2,5 + 9,8 + 1,2 = 13,3$ г/л. Якщо вважати, що половина глюкози іде на отримання мікроорганізмом енергії, то виходить, що для росту біомаси може бути використано лише 6,7 г карбону.

Оскільки вміст карбону у клітині становить приблизно 50%, то виходить, що на даному середовищі може утворитися 13,3 г/л біомаси.

Отже, в даному випадку лімітувальним фактором виступає вміст карбону в середовищі. Теоретично можливий рівень біомаси – 13,3 г/л.

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

Бактерії *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* – це палички з заокругленими кінцями розміром 0,8-1,0x3-4 мкм. В препаратах вони розташовуються безладно (рис.2.1).

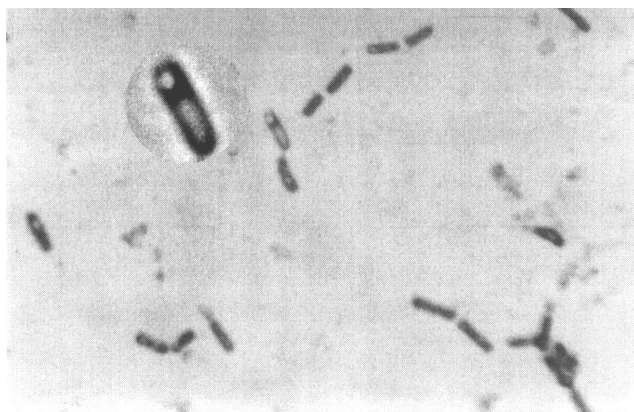


Рис.2.1 Формування спори та параспорального включення у бактерії *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* [23].

Субтермінальні спори мали характерну еліптичну форму і розмір 0,8-1,1 мкм, кристалічні включення мали ромбовидну форму і розмір від 0,4 до 2 мкм (рис.2.2).

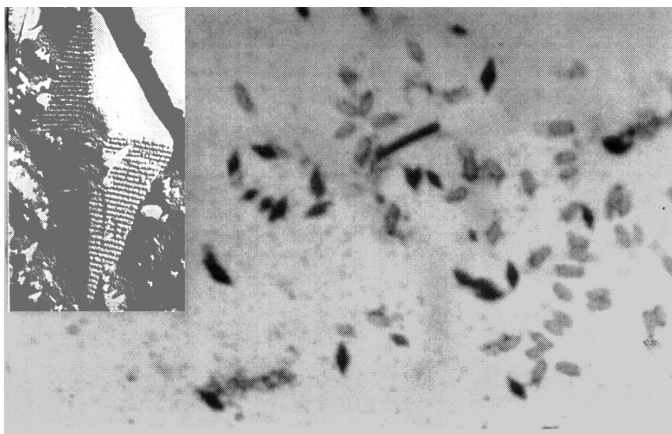


Рис.2.2 Ромбовидні параспоральні включення в клітинах *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* [23].

При фарбуванні препаратів модифікованим методом Пешкова клітини мали темно-червоне забарвлення, спори – зелене, а кристалічні включення – синє.

Досліджувана бактерія мала культуральні властивості, характерні для представників роду *Bacillus*. Так, на МПА через 48 годин утворювалися колонії

матові, молочно-білі, з рівнею поверхнею, округлі або неправильної форми, з нерівними краями, $d = 2 - 8$ мм (рис.2.3).



Рис.2.3 Ріст *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* на МПА [24].

При культивуванні бактерії у МПБ спостерігали дифузійний зріст, плівку і помутніння середовища з наступним утворенням осаду (рис.2.4) [23].

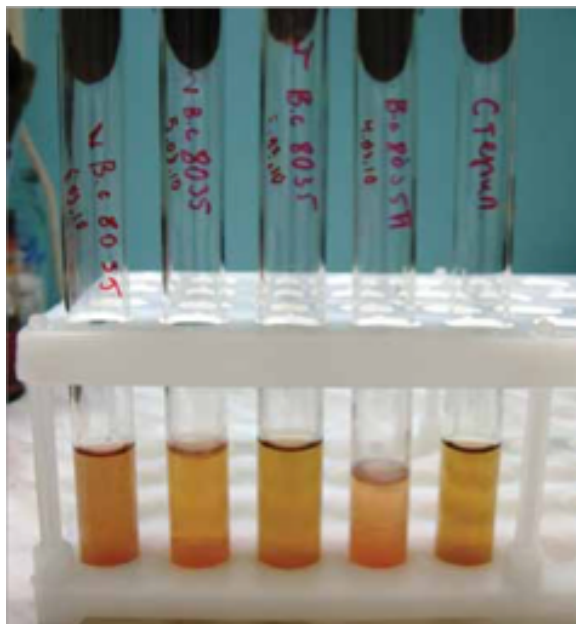


Рис.2.4 Ріст *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* у МПБ [24].

Досліджувана бактерія – аероб або факультативний анаероб, що узгоджується наявністю каталази. Температурний оптимум росту – 28°C . Оптимальне рН для росту бактерії 8,0.

Спостереження показали, що бактерія має високу ферментативну активність і виявляє здатність до гідролізу желатину, крохмалю, казеїну, а також до використання пропіонату і цитрату натрію. Однак, до різноманітних вуглеводів вона виявила інертність, винятком була лише глюкоза та сорбіт.

Bacillus thuringiensis var. Israelensis – має здатність до денітрифікації і утворення ацетоїну, а також до росту в МПБ з вмістом 7% NaCl [23].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Основи класифікацій бактерій були відомі ще дуже давно. З початку розвитку цієї науки вчені намагалися вкласти в основу класифікацій бактерій принципи закономірності, практичні дані, зумовлені рівнем знань і розвитком науки. Адже, систематика бактерій розвивалась нерівномірно, стихійно, де, в свою чергу, кожен вчений та дослідник вносив свій елемент суб'єктивізму у класифікацію певної групи мікроорганізмів.

Під час класифікації бактерій використовували різні методи досліджень, але головним серед них є **морфофізіологічний підхід**, тобто сукупність **фізіологічно-біохімічних** і **морфолого-культуральних ознак**.

Визначник Бергі – визнана у всьому світі наукова праця, яка об'єднує знання з різноманітності прокариот. Кожне нове видання Визначника Бергі відображає суттєві досягнення в галузі систематики бактерій. Над Визначником працює великий міжнародний колектив кращих спеціалістів з цієї чи іншої групи мікроорганізмів [25].

У першій комплексній класифікації базувалися лише на морфолого-фізіологічних бактерій. Вона була викладена у першому виданні Визначника бактерій Бергі у 1923 р, наступні видання налічували у собі належність видів до певних місць існування, їх адаптацію до цих чи інших умов заносили стосовно нових відкритих мікроорганізмів за вищезазначеним підходом до 1986 р до 9 видання визначника Бергі [26].

З 10 видання Визначника Бергі було наведено філогенетичну класифікацію бактерій, яку засновано на дослідженнях генів, що кодують рибосомальні білки. Видання склало такий вплив, що після його видання більшість доменів бактерій у систематиці змінили свої місця докорінно і перейшли на нові. У 1984 році було

розроблену першу класифікацію дріжджів, що базувалася саме на фізіолого-біохімічних і морфолого-культуральних ознаках [26].

Розглянемо класифікацію наведену у Визначнику Берги за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками (Табл.2.4) та філогенетична класифікація бактерій (Табл.2.5).

Таблиця 2.4

Положення *Bacillus thuringiensis var israelensis* за дев'ятим виданням керівництва Бергі:

Таксономічна група	Класифікація за м-к та ф-б ознаками [25].
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Firmibacteria</i>
Номер частини	<i>18: Грампозитивні палички та коки, які утворюють ендоспори</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>thuringiensis</i>
Var	<i>israelensis</i>

Положення *Bacillus thuringiensis var israelensis* за десятим виданням керівництва Бергі:

Таксономічна група	Класифікація за м-к та ф-б ознаками [26].
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Bacili</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>thuringiensis</i>
Var	<i>Israelensis</i>

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

В сучасному агропромисловому комплексі України зростає виробництво їстівних грибів у першу чергу глив та печериць. В Україні налічено близько 200 грибних ферм і ця цифра продовжує рости. У зв'язку з цим зростає актуальність боротьби з комахами-шкідниками грибів та виробництва екологічно чистих продуктів харчування. Основну шкоду врожаю їстівних грибівносять представники двокрилих комах – грибні комарик *Bradysia pilistriata* Frey. (*Sciaridae*)(рис.3.1), які також завдають шкоди рослинам закритого ґрунту (овочам, декоративним рослинам тощо)[4].



Рис 3.1 Личинка грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey. (*Sciaridae*) [5].

Розвиток личинок міцетофагів, які пошкоджують міцелій та плодові тіла, призводить до суттєвої втрати врожаю, імаго є розповсюджувачами кліщів, цвілевих грибів, вірусів та бактерій, що викликають захворювання грибів (рис.3.2)[4].

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Петренко О.В.			РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування		Літ.	Аркуш
Перевір.		Ключка Л.В.						35
Консультант.								11
Н. Контр.							Кафедра БТМ	
Затверд.		Пирог Т.П.						



Рис 3.2 Приклад ураженої печериці грибними комариками *Bradysia pilistriata* Frey. (Sciaridae) [5].

Зазвичай для боротьби з комахами-шкідниками на грибних фермах України широкого застосовують хімічні інсектициди, але за ними спостерігається ряд недоліків [4]:

- По-перше, тривале використання хімічних засобів призводить до появи стійких популяцій шкідливих видів комах.
- По-друге, накопичуючись у природі, пестициди, які застосовуються, викликають небажані мутації у живих організмах навіть через багато років, що несе загрозу й майбутнім поколінням.
- По-третє висока вартість хімічних засобів.

У зв'язку з цим залучення мікробіологічних методів боротьби з шкідниками рослин має великі перспективи.

Приклади хімічних інсектицидів які використовують в Україні для боротьби з грибними комариками *Bradysia pilistriata* Frey. (Sciaridae) наведено нище в таблиці 3.1.

Хімічні інсектициди для боротьби з грибними комариками

Препарат	Діюча речовина/ форма препарату	Тара	Норма використання препарату	Ціна
Актеллик [27]	Перифосметил, 500 г/л концентрат емульсія	Бутель 5 л	100–200 л/га	825 грн за 1 л
Дімілін [28]	дифлубензурон, 250 г/кг водорозчинний порошок	Бутель 1 кг	200-400 л/га	2079,98 грн за 1 кг
Актара [29]	Тиаметоксам, 250 г/кг, концентрат емульсія	Пластмасова банка 40 г	200-400 л/га	480 грн за 40 г

На відміну від отрутохімікатів, інсектициди мікробного походження специфічно вибірково діють на комахи і відносно безпечні для людини, навколишнього середовища та не мають ефекту звикання на відмінну від хімічних інсектицидів. Приклади використання біоінсектицидів бактеріального походження на основі біологічного агенту *Bacillus thuringiensis* наведено в наструбній таблиці 3.2 [6].

Використання інсектицидних препаратів на основі *Bacillus thuringiensis* [6]

Назва препарату	Бактерії, що входять до складу препарату	Комахи-шкідники, для боротьби з якими використовують препарат
Бактокуліцид	<i>B. thuringiensis subsp. israelensis</i>	Комарі на водоймах, що не мають рибогосподарського значення
Бактоспеїн	<i>B. thuringiensis subsp. thuringiensis</i>	Білянки, капустяна міль і вогнівки на овочевих культурах.
Бітоксібацилін	<i>B. thuringiensis subsp. thuringiensis</i>	Капустяна совка, колорадський жук на овочевих культурах; листовертки, американський білий метелик у плодovих насадженнях.
Дендробацилін	<i>B. thuringiensis subsp. dendrolimus</i>	Луговий мотильок, білянки, капустяна міль, вогнівки в овочевих культурах і посівах; яблунева і плодова міль, златогузки, яблунева плодо-жерка, смородинова листо-вертка; совки на бавовнику.
Дипел	<i>B. thuringiensis subsp. kurstaki</i>	Лускокрилі комахи в сільськогосподарських та лісових насадженнях.
Лепідоцид	<i>B. thuringiensis subsp. kurstaki</i>	Білянки, міль, вогнівки, листовертки, шовкопряди, златогузки, совки, луговий метелик на овочевих, плодovих і ефіролійних культурах.
Ентобактерин	<i>B. thuringiensis subsp. galleriae</i>	Білянки, капустяна міль, вогнівки, листовертки, совки в овочевих і плодovих культурах
Новодор	<i>B. thuringiensis subsp. tenebrionis</i>	Колорадський жук на картоплі
Гомелін	<i>B. thuringiensis subsp. thuringiensis</i>	Хвоє- та листогризучі комахи в лісових насадженнях.

Згідно з літературних даних, для боротьби не тільки проти кровосисних комарів а й грибних комариків можуть бути використані біопрепарати на основі ентомопатогенної спороутворюючої бактерії *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* – природного мешканця біоценозів, який проявляє також ларвіцидну активність [5].

Даний мікроорганізм продукує *б* - ендотоксин, який є виключно ларвіцидним мікробним токсином кишкової дії, ентомоцидність якого проявляється при живленні комах. При попаданні в стравохідний канал личинок комарів біопрепарат викликає токсикоз і потім гибель.

Термін гибелі личинок буває від кількох годин до декількох днів і залежить від дози біопрепарату і фізіологічного стану личинок, характеристики водоймища тощо.

Препаративна форма - це висушена біомаса бактерії світло-коричневого кольору, вміщує в собі спори, кристалічні ендотоксини, залишки поживного середовища. Один мілілітр препарату вміщує не менше 3 млрд. життєздатних спор і кристалів ендотоксину [17].

Враховуючи що грибні ферми займаються вирощування грибів цілий рік, а на повний цикл вирощування печериць піде 2 місяці, оскільки це відбувається у спеціальних теплицях при певних температурних умовах та вологості, то кількість циклів вирощування за рік сягає 5-6 [18].

Обробку препаратом передбачають дрібнодисперсним обприскуванням перед посадження печериць в даний субстрат та після обростання субстрату міцелієм, тобто приблизно через 2 тижні після їх посіву, одразу після здійснення прорізів у субстраті. Для обробки використовують 4 мл на 0,1 м²[19].

Узагальнені дані про потребу в біологічному перпараті в складі якого є *б* – ендотоксину для 6 грибних ферм України наведено в таблиці 3.3

Таблиця 3.3

Вихідні дані для розрахунку потреби у біопрепараті на основі ендотоксину

Bacillus thuringiensis var israelensis

Ферма	Площа вирощування, м ²	Кількість препарату для 1 циклу обробки 1 м ² субстрату, л/м ²	Кількість циклів обробок на 6 циклів вирощування, шт.	Сумарна кількість препарату на 6 циклів (12 обробок) 1 м ² субстрату, л/м ²	Необхідний об'єм препарату обробки ферми за 6 циклів, л
«Органик Машрумс» і «Еко-Машрумс» Київ [30]	15 800	0,08	12	0,96	15 168
«Гелека-М» Одеса [31]	8 100	0,08	12	0,96	7 776
«Боровик» Львів [32]	500	0,08	12	0,96	480
«Закарпатша мпінйон» Закарпаття [33]	1 460	0,08	12	0,96	1 402
«Ставеччина» Волинь [34]	1 050	0,08	12	0,96	1 008
«Українські печериці» Київ [35]	1 220	0,08	12	0,96	1 171
Всього:					27 005

* За дослідними даними даний препарат використовують 4 мл на 0,1 м², тобто 40 мл на 1 м² [19]

- * Згідно інструкції закордонного препарату “Gnatrol” розводять у такому співвідношенні 0,5 кг сухого препарату на 100 галонів (455 л) або 5 г на 1 галон (4,5 л).
- * Препарат містить 3000 токсичних одиниць на 1 мг сухого препарату [17].

У нас є робочий об’єм препарату 27 005 л. Виходячи з інструкції препарат розводять 5 г на 4,5 л. Вирахуємо кількість препарату, який знаходиться у 27 005 л розчину для обробки ферм :

$$5 \text{ г} - 4,5 \text{ л}$$

$$X - 27\,005$$

$$X = 30\,005 \text{ г тобто } 30 \text{ кг}$$

Отже, для забезпечення 6 грибних ферм необхідно 27 005 л готового розведеного препарату, який містить в собі 30 кг висушеного бактеріального препарату який включає в себе 6 кг спровокристалічного комплексу, все інше це наповнювач та прилипач препарату.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

На сьогоднішній день в Україні загальновизнано, що одним із найбільш перспективних і широко використовуваних біопестицидів для контролю чисельності і шкідливості фітофагів є мікробні препарати на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*. Різноманітність цієї групи бактерій із кожним роком поповнюється новими серотипами, що відрізняються багатобічною дією на комах: антифідантною, метатоксичною, фізіологічною, тератогенною, дерепродукційною, що обумовлює високу біологічну, економічну, соціальну ефективність біопрепаратів на їх основі [5].

На основі досліджень, *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* також можна використовувати у боротьбі з грибними комариками. Так закордонний препарат на основі цієї бактерії випускає США, який має торгову назву “Gnatrol”. Імпорт в Україну займає близько 3%, оскільки препарат має дуже високу ціну 416,75\$ за 9 кг [17]. Тому пропоную розробити препарат на основі даного біологічного агента, щоб уникнути дороговизни закордонних препаратів та зменшити застосування хімічних інсектицидів через їх пагубну дію.

Тим не менш, в Україні препарат на основі *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* випускається під назвою “Бактокулід”, проте має зовсім інший спектр дії та способи використання. Дану продукцію використовують переважно на водоймах та затоплених підвалах проти кровосисних комарів, відповідно концентрація, вміст активних речовин та розведення препарату буде іншою.

Щоб розрахувати потужність виробництва препарату на основі *б* – ендотоксину проти личинок грибних комариків в Україні необхідно від загальної потреби грибних ферм відняти поставки препарату з інших країн (3%). І тому, через відсутність власного виробництва бактеріального ендотоксинового препарату, потужність виробництва залежить від загальної потреби грибних ферм в біоінсектициді. Однак це відносно новий препарат на ринку України, тому із всіх грибних ферм України яких налічує близько 200 [36,37] ми забезпечуємо тільки 6. Це приблизно 3% ринку України. Тобто, для забезпечення 6 грибних ферм України біоінсектицидом потрібно виготовляти 30 кг сухого бактеріального препарату з нього 6 кг споровокристалічного комплексу, все інше наповнювач та прилипач.

Тобто за один цикл необхідно отримати 500 г споровокристалічного комплексу та + 2000 г наповнювача з прилипачом і в сумі готового продукту 2500 г.

Продуцент *б* – ендотоксину – *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23 в процесі культивування утворює 4,52 млрд. спор/мл, тобто 1 спора – 1 *б* –ендотоксин. Теоретичний вихід біомаси 10 г/л.

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання бактеріального ендотоксинового препарату – 6 кг становить:

$$10 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$6000 - x$$

$$x = 600 \text{ л культуральної рідини}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (10%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 600 / (1 - 0,1) = 606 \text{ л}$$

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

Для повного забезпечення 6 грибних ферм біопрепаратом необхідно одержати (з урахування втрат для виділення) $0,606 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Тому, приймаємо кількість трудоднів – 30 (в інші дні виробництво біопрепарату буде йти на інші потреби), тоді кількість продукту за добу становить:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 606/30 = 20,2 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{кр}} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{\text{цф}})/24 = (1,1 \cdot 20,2 \cdot 61)/24 = 57 \text{ л/цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (51 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментатора включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Одержані значення культуральної рідини, ми використовуємо для розрахунку геометричного об'єму ферментера:

$$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 0,057/0,6 = 0,095 \text{ м}^3.$$

Обираємо за таблицею ферментер з геометричним об'ємом 100 л.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 0,057 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 - 15%.

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

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\text{ф}}) = 0,057/(1-0,1) = 0,058 \text{ м}^3,$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 0,058 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить $V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 0,058/0,6 = 0,096 \text{ м}^3$.

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 0,1 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 0,058/0,1 = 0,58.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\text{ф}}) = 0,058/(1+0,1) = 0,053 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 0,058 - 0,053 = 0,005 \text{ м}^3$ або 5 л.

Для одержання 5 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}}/(1-E_{\text{па}}) = 5/(1-0,1) = 5,1 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}}/(1+X_{\text{па}}) = 5,1/(1+0,1) = 4,6 \text{ л}$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 5,1 - 4,6 = 0,5 \text{ л}$ або 500 мл.

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 5,1$ л можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом $V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 5,1/0,6 = 8,5$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 5,1/10 = 0,51.$$

Для одержання посівного матеріалу $V_{пм4} = 500$ мл для засіву малого інокулятора можна культивуванням бактерій в колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$.

Тоді кількість колб становить:

$$N_{колб} = V_{пм2} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 0,5/750 \cdot 0,2 = 3 \text{ колб.}$$

Одже, за результатами розрахунків для біосинтезу спровокристалічного комплексу, як основу біопрепарату – бактеріями *Bacillus thuringiensis var israelensis* 7-1/23 необхідно ферментер для біосинтезу об'ємом $0,1 \text{ м}^3$, інокулятор об'ємом 10 л та 3 качалочних колб.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЕНДОТОКСИНУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату

Ростовим субстратом у поживному середовищі для біосинтезу ендотоксину є кукурудзяна мука згідно патенту (Пат. № 2 539 732 С2 РФ. Штамм *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* 7-1/23А, используемый в качестве средства для получения препарата с ларвицидной активностью против кровососущих комаров. Тихонович І.А., Ермолова В.П., Гришечкина С.Д., Романова Т.А. – Опубликовано 27.01.2015. Бюл. №30). Оскільки даного біологічного агента *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* 7-1/23А у KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes немає, тоді приймаємо близько споріднений *Bacillus thuringiensis* serovar *thuringiensis* IS5056. Згідно з KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, катаболізм кукурудзяної муки розпочинає перетворенням полісахариду у моносахарид – глюкозу, потім глюкоза перетворюється за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфофруктокінази (КФ 2.7.1.11). Наводимо схему перетворення даного вуглеводу (рис. 4.1).

Глюкоза за участю ферменту – глюкокінази (КФ 2.7.1.2) перетворюється на глюкозу-6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозу-6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктози 6-фосфат у β -D-фруктозу 1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозу-1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат.

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез ендотоксину	Літ.	Аркуш	Акрушів
Розроб.		Петренко О.В.					46	6
Перевір.		Ключка Л.В.						
Консультан.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ			

До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід-3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат індукує його перетворення на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

Усі реакції гліколізу, за винятком трьох (гексокіназної, фосфорукто-кіназної та піруваткіназної), повністю оборотні.

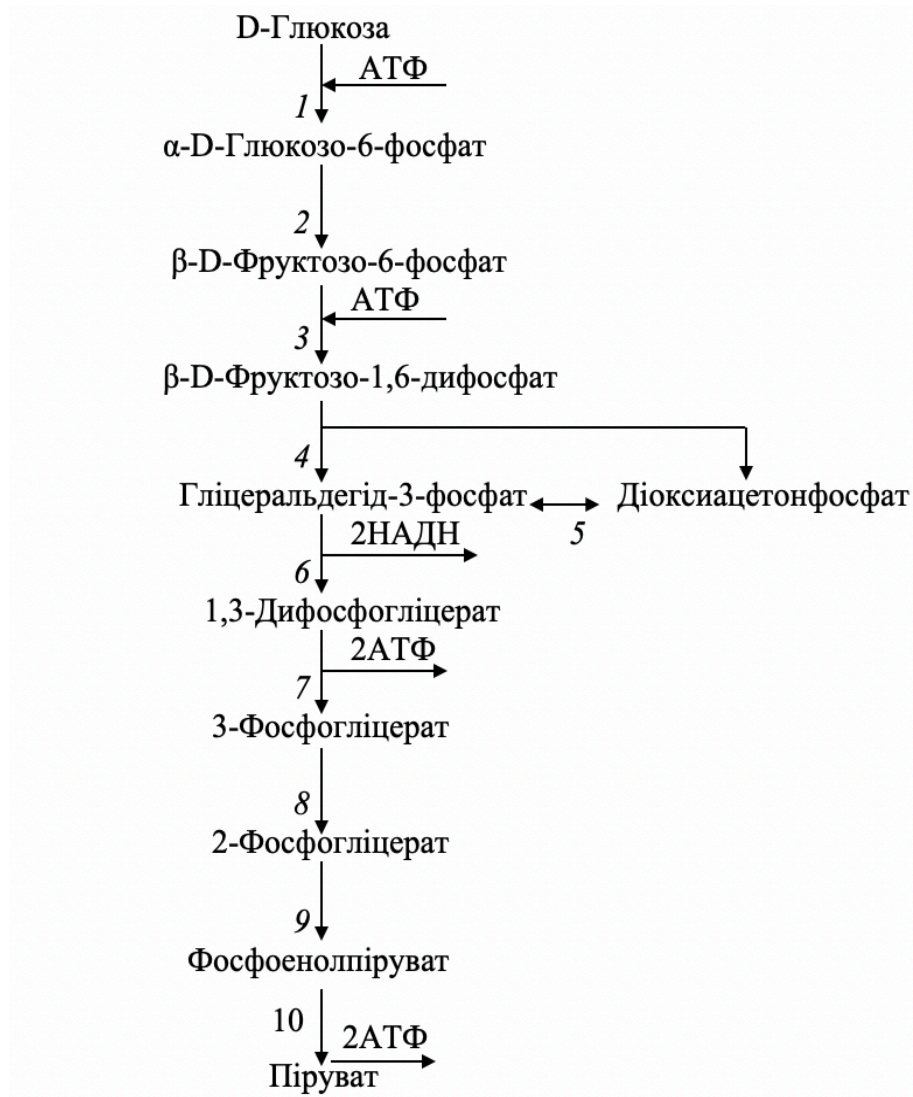


Рис.4.1. Схема катаболізму глюкози у *Bacillus thuringiensis* serovar *thuringiensis*

IS5056

Ферменти:

1 – глюкокіназа (КФ.2.7.1.2), 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ.5.3.1.9); 3 – 6-фосфоглюкокіназа (КФ.2.7.1.11); 4 – фруктозо-біфосфатальдолаза (КФ.4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.1); 6 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 8 – гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза (КФ. 5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Вихідними сполуками для синтезу ендотоксину є глюкозо-6-фосфат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, піруват, ацетил-КоА, 2-оксоглутарат та оксалоацетат, які утворюються у процесі трансформації ростового субстрату у гліколізі та циклу трикарбонових кислот.

Синтез аспартатної родини розпочинається з оксалоацетату під дією ферменту (КФ 2.6.1.1) – аспартат аміотрансферази з утворенням аспартату. З аспартату утворюються такі амінокислоти як аспарагін, метіонін, лізин, треонін та ізолейцин. Під дією ферменту (КФ 6.3.1.1(6.3.5.4)) – аспарагін синтази утворюється аспарагін. Подальша трансформація аспартату у метіонін та лізин відбувається спільними двома реакціями, за допомогою ферментів (КФ 2.7.2.4) – аспартаткіназа – з утворенням аспартил-4-фосфату та ферменту (КФ 1.2.1.11) – дегідрогеназа альдегіду аспарагонівої кислоти, який перетворює аспартил-4-фосфат у 4-напівальдегідаспартат. З 4-напівальдегідаспартату за допомогою ферменту (КФ 1.1.1.3) – гомосериндегідрогеназа утворюється гомосерин який є спільним попередником для метіоніну, треоніну та ізолейцину. Гомосерин під дією ферменту (КФ 2.3.1.31) – гомосерин ацетилтрансфераза перетворюється на ацетил гомосерин, який в подальшому трансформується у гомоцистеїн за допомогою ферменту (КФ 2.5.1.48, 2.5.1.49) – цистеїн гаммасинтази. Та останньою реакцією синтезу амінокислоти метіоніну є перетворення гомоцистеїну під дією комплексу трьох ферментів (КФ 2.1.1.10, 2.1.1.13, 2.1.1.14) – метилентетрагідрофолат редуктаза, метилентетрагідрофолат, гомоцистеїн метилтрансфераза. Гомосеринфосфорна кислота яка є попередником треоніну утворюється з гомосерину за допомогою

ферменту (КФ 4.2.3.1) – гомосеринкіназа. Синтез лейцину походить з треоніну. Під дією ферменту (КФ 4.3.1.19) – треоніндегідратаза, треонін перетворюється на 2-оксобутанон, який в подальшому трансформується у 2-ацетон-2-гідроксибутаноат із залученням ферменту (КФ 2.2.1.6) – ацетолактатсинтаза. З 2-ацетон-2-гідроксибутаноату утворюється 3-гідрокси-3-метил-2-оксипентаноат під дією ферменту (КФ 1.1.1.86) – кето-ацидредуктоізомераза. Утворення 2,3-дигідрокси-3-метилпентаноату відбувається під дією ферменту (КФ 1.1.1.86) – кето-ацидредуктоізомерази. В подальшому перетворення 2,3-дигідрокси-3-метилпентаноат у 3-метил-2-оксипентаноат відбувається під дією ферменту (КФ 4.2.1.9) – дигідрокси-ациддегідрогенази. Та кінцевий синтез амінокислоти ізолейцина відбувається із залученням комплексу двох ферментів (КФ 2.6.1.42, 1.4.1.9) – аміноацидамінотрансфераза, лейциндегідрогеназа.

Синтез лізину спільний на перших реакціях з метіоніном, таким чином з 4-напівальдегідаспартату за допомогою ферменту (КФ 4.3.3.7) – дигідродипіколінат синтаза утворюється 4-гідрокси-2,3,4,5-тетрагідродипікроінат який під дією ферменту (КФ 1.17.1.8) – дигідродипіколінат редуктази трансформується у 2,3,4,5-тетрагідродипіколінат. 2,3,4,5-тетрагідродипіколінат під дією ферменту (КФ 2.3.1.89) – тетрадипіколінат ацетилтрансфераза перетворюється на N-ацетил-L-2-аміно-6-оксипемилат, який в подальшому трансформується у N-ацетил-L,L-2,6-діамінопомелат за допомогою ферменту (КФ 2.6.1.-) – N-ацетил -L,L-діамінопімелат амінотрансфераза. Утворення L,L-2,6-діамінопімелату відбувається під дією ферменту (КФ 3.5.1.47) – N-ацетилдіамінопімелат деацетилаза. В подальшому перетворення L,L-2,6-діамінопімелату у мпзо-2,6-діамінопомелат відбувається під дією ферменту (КФ 5.1.1.7) – діамінопомелат епімераза. Та кінцевий синтез амінокислоти лізину відбувається із залученням ферменту (КФ 4.1.1.20) – діамінопомелат декарбоксилаза. Так насинтезувалась аспартатна родина амінокислот які входять у склад білкового ендотоксину.

Синтез глутаматної родини розпочинається з 2-оксоглутарату під дією ферменту (КФ 1.4.1.4) – глутаматдегідрогеназа НАДФ⁺ з утворенням глутамату. З глутамату утворюються такі амінокислоти як пролін, аргінін та глутамін. Під дією

ферменту КФ 3.5.1.2 (6.3.1.2) – глутаміназа утворюється амінокислота глутамін. Подальша трансформація аспартату відбувається у пролін рядом реакцій. За допомогою ферментів (КФ 2.7.2.11) – глутамат-5-кінази – з утворенням L-глутамі-5-фосфату та ферменту (КФ 1.2.1.41) – глутамат-5-семіальдегід дегідрогенази, яка перетворює L-глутамі-5-фосфат у L-глутамі-5-напівальдегід. З L-глутамі-5-напівальдегіду відбувається дегідратація ($- \text{H}_2\text{O}$) і утворюється 1-пролін-5-карбоксилат. Остання реакція синтезу проліну відбувається під дією ферменту (КФ 1.5.1.2) – пролін-5-карбоксилредуктаза. Синтезу аргініну розпочинається з глутаматом рядом реакцій. За допомогою ферментів (КФ 2.3.1.1_) – N-ацетилтрансфераза – з утворенням N-ацетилглутамату та ферменту (КФ 1.2.1.38) – N-ацетилглутамілфосфатредуктаза, яка перетворює N-ацетилглутамату у N-ацетилглутаміл-5-фосфат. З N-ацетилглутаміл-5-фосфату утворюється N-ацетилглутаматнапівальдегід під дією ферменту (КФ 1.2.1.38) – N-ацетилглутамілфосфатредуктаза. За допомогою ферментів КФ 2.6.1.11 – ацетилорнітинтрансаміназа – з утворенням N-ацетилорнітину та ферменту КФ 3.5.1.16 – ацетилорнітиндеацетилаза, яка перетворює N-ацетилорнітин в орнітин. Останні реакції синтезу аргініну відбувається через синтез сечовини.

Для поповнення у клітині запасів оксалоацетату як проміжного продукту біосинтезу і попередника у синтезі амінокислот у даного продуцента функціонують анаплеротичні реакції – карбоксилювання пірувату за участі ферменту (КФ 6.4.1.1) – піруваткарбоксилаза.

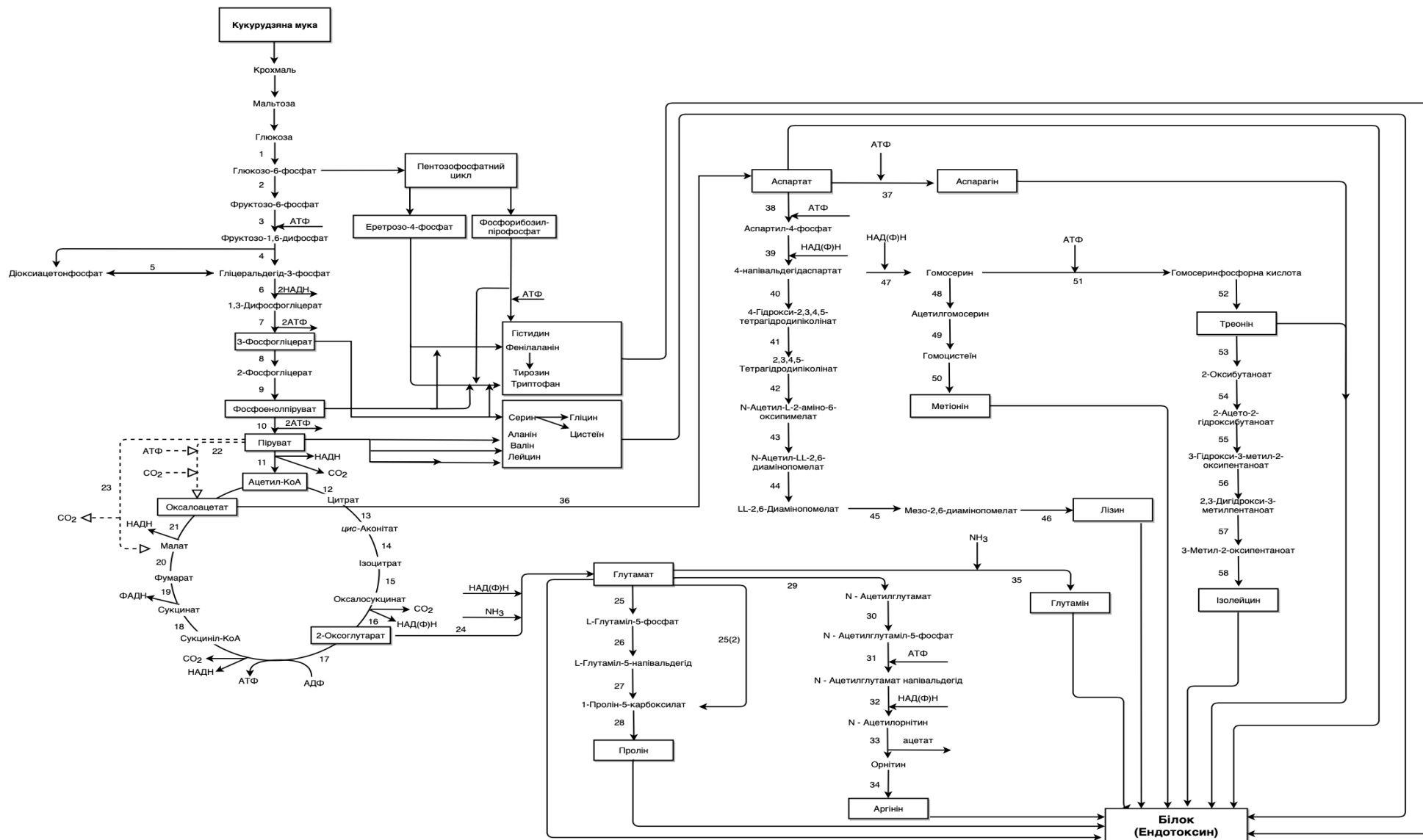


Рис.4.2 Схema біосинтезу б-ендотоксину

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТУ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Виходячи із фізіолого-біохімічних ознак продуцента ендотоксинвмісного препарату *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 підбираємо спосіб культивування. Тому важливим є визначення таких умов:

1. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 – факультативний анаероб [38]. Необхідно створити кисневі умови під час культивування штаму-продуцента. Для забезпечення кисневих умов використовують барбортер, який забезпечує подачу кисню під час культивування та необхідний перемішувальний пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів.

2. В теперішній час використовують два способи культивування мікроорганізмів – *поверхневий та глибинний*.

Глибинний метод. Цей метод культивування використовують на рідких середовищах, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі. Поєднання поживного середовища і мікроорганізмів які ростуть в ньому називають культуральною рідиною. Так як мікроорганізми можуть утилізувати тільки розчинний в воді кисень, розчиніть кисню у воді невелика, то для забезпечення росту аеробів їх необхідно постійно збагачувати киснем. Процес підведення кисню в глибину рідкого середовища називається аеруванням. Аерування здійснюється шляхом продування стерильного повітря через культуральну рідину.

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Петренко О.В.			РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва ларвіцидного ендотоксинового препарату	Літ.	Аркуш
Перевір.		Ключка Л.В.					52
Консультан.							54
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Затверд.		Пирог Т.П.					

Глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневим [39]:

- ✓ дозволяє значно зменшити виробничі площі;
- ✓ виключити тяжку ручну працю (високий рівень автоматизації);
- ✓ покращити гігієну праці;
- ✓ спрощує механізацію та автоматизацію виробництва;
- ✓ робить можливий перехід на безперервний спосіб культивування;
- ✓ раціональне використання поживних середовищ, що дає можливість зменшити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів;
- ✓ отримання більш активних вторинних метаболітів;
- ✓ можливість вирощування як аеробних так і анаеробних мікроорганізмів.

Поверхневий метод. Поверхнєве культивування заключається у вирощуванні аеробних мікроорганізмів на поверхні рідких і твердих поживних середовищ. При цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо із повітря. У зв'язку з цим при поверхневому культивуванні стараються збільшити площину зіткнення середовища з повітрям. При поверхневому культивуванні на рідких середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді плівок.

Не обираємо поверхневий спосіб культивування так як він має ряд недоліків [38]:

- ✓ недосконалість конструкції застосовуваного обладнання;
- ✓ мала механізація технологічних процесів;
- ✓ проведення процесу в нестерильних умовах;
- ✓ неможливість вирощувати анаеробні мікроорганізми.

3. При глибинному культивуванні розрізняють два режими – **періодичний та безперервний.**

Безперервне культивування дозволяє зафіксувати культуру в певній фазі (зазвичай експоненційній) за рахунок постійної подачі нового поживного середовища та відведення культуральної рідини [38].

Періодичне культивування на практиці застосовується значно частіше, оскільки це обумовлено меншою вірогідністю контамінації і простотою проведення даного процесу.

Під час режиму безперервного культивування культура постійно перебуває в експоненційній фазі росту, що не дає змогу отримати максимальний вихід біомаси, як основної складової ендотоксинвмісного препарату [38].

Отже, тривале перебування штаму-продуцента *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 в експоненційній фазі росту, яке спостерігається за безперервного культивування, є недоцільним

4. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, росте при 28 – 30°C, оптимальна температура росту 29°C. Згідно патенту [20] оптимум росту спостерігається при рН середовища 7,8-8.

При даних умовах, можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому необхідно забезпечити асептичні умови під час отримання біомаси. Щоб запобігти контамінації під час культивування, проводиться стерилізація обладнання та компонентів поживних середовищ для культивування [40].

Посівний матеріал буде додаватися у вегетативній формі клітинної суспензії, яку відбирають з середини експоненційної фази росту із проміжних стадій нарощення інокуляту, оскільки така культура є найбільш активною до поділу, метаболічних процесів і відповідно накопичення біомаси, а також це зменшить час адаптації продуцента [20].

Також необхідною стадією є контроль рН, який підтримується при зростанні чи падіння розчинами соляної кислоти та їдкого натру (6%). Початковий рН орієнтовно становить 7,6-8, оскільки в складі середовища відсутні компоненти з сильними кислотними чи основними властивостями, проте у процесі біосинтезу цей показник може змінюватися. В даному випадку у нас наявні 3 композиції поживного середовища, для зниження ризиків контамінації та 2-ох разового внесення солей у поживне середовище, ми повинні знизити рН до 4,0 за допомогою соляної кислоти, що дозволить нам разом внести 2 композиції солей без випадання в осад при їх взаємодії та відправляємо на стерилізацію. Зниження рН на рівні 4,0 достатньо буде 2 мл соляної кислоти на 1 л поживного середовища. Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу рН потрібно довести до 7,8-8 яке є оптимальним для

росту нашого біологічного агенту. Підтримки рН на рівні 7,8-8 достатньо буде 2 мл їдкого натру на 1 л поживного середовища.

Отже, культивування продуцента ендотоксину *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 здійснюється в аеробних умовах, глибинним способом у періодичному режимі протягом 51 години, за температури 28-30°C та при дотриманні усіх правил асептики.

Основним апаратурним елементом біотехнологічного процесу є біореактор – ферментер. Біореактори призначені для накопичення біомаси, культивування мікроорганізмів, синтезу цільового продукту. Основні вимоги до ферментера – можливість стерильного процесу проведення культивування штаму-продуцента при інтенсивній аерації поживного середовища. У біореакторах мають бути забезпечені оптимальні гідродинамічні та масообмінні умови [39].

Виходячи із техніко-економічного обґрунтування та розрахунку потужності виробництва, необхідний об'єм ферментера для забезпечення виробництва 26 кг ендотоксинвмісного препарату – 100 л. Обираємо ферментер-біореактор фірми «BIORUS» [36]. Ферментер обладнано автоматизованою системою керування, системою насосів для подачі поживних розчинів. Інших комунікацій. Також він обладнаний турбінною мішалкою, датчиками температури, кисню, оптичної густини та іншими [44].

Конструкція і експлуатація

Ферментер, біореактор встановлений на платформі. Легкість в обслуговуванні і експлуатації забезпечується відкритою рамною конструкцією. Центральне розташування входів і виходів для пара, води, повітря і відпрацьованої води зводить до мінімуму час і зусилля, необхідні для підготовки до роботи. Мішалки обертаються за допомогою ремінного приводу, що дозволяє зменшити висоту ферментера, відокремити ємність від мотора і оптимізувати підшипник вала. Вал виймається зверху, а підшипник з ущільнювачами легко відділяється від дна [40,44].



Рис 5.1 Промисловий ферментер фірми «BIORUS» об'ємом 100 л [41].

Стандартні порти гарантують легкість в установці і заміні датчиків і додаткового устаткування для затоки середовища, аерації, відбору проб, слива, перфузії, пеногашення, СІР (очищення на місці) при складанні та експлуатації.

Устаткування повністю відповідає як національним, так і cGMP / FDA стандартам (включаючи IQ і OQ документацію на вимогу).

Ферментер, біореактора аерується через фільтр Autosterile компанії Bioengineering. Без складних периферичних конструкцій цей фільтр стерилізується in-situ разом з ємністю [41].

Джерело живлення, вимірювальні і контрольні блоки, розташовані в 19-дюймовому шафі, відокремлені від ферментера, біореактора. В IFM-контролерах компанії Bioengineering успішно поєднуються сучасні цифрові технології і модульна структура. Кожен вимірювальний і контрольний контур має свій власний модуль, що дозволяє легко обслуговувати окремі блоки або адаптувати їх до необхідних вимог. Програми BioLogics або BioVisual забезпечують запис і візуалізацію даних. Інші програми доступні за спеціальною заявкою [41].

Тип ферментерів (біореакторів) для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань [42].

Важливе значення для аеробного процесу має система аерації. При цьому оцінюють, з одного боку, швидкість надходження кисню з рідиною і його масопередачу від газової фази, з іншого - швидкість споживання кисню мікроорганізмами і його видалення з відпрацьованою рідиною. Швидкість переходу кисню з газової фази в рідку виражають через об'ємну швидкість адсорбції [43].

Під час глибинного культивування в аеробних умовах необхідно постійно забезпечувати надходження у кисню в середовище. В залежності від цього відрізняються і конструкції ферментерів [45].

Газорідинні ферментери ділять на наступні:

- з механічним диспергуванням газу;
- ерліфтні;
- струминні.

В ферментерах з *механічним диспергуванням газу*, повітря, що вводиться в рідину диспергується за допомогою перемішуючих пристроїв.

В *ерліфтних* ферментерах поверхня розподілу фаз формується за рахунок введення газу шляхом газорозподільним пристроєм.

Струминні ферментери мало розповсюджені і в них газ вводиться через спеціальні інжекційні пристрої і розподіляється за допомогою спеціальних насадок [45].

Конструктивним елементом, для приведення рідини в рух, є мішалка. Як показує практика, більшість завдань перемішування може бути успішно вирішено шляхом використання обмеженого числа конструкцій мішалок.

Апарати з механічним перемішуванням – найпоширеніша конструкція в сучасній мікробіологічній промисловості. Вони мають механічну мішалку, що складається із центрального вала й лопат різної форми [46].

Мішалка – рухомий робочий орган механічного перемішуючого пристрою, який здійснює безпосередню дію на рідке середовище [45].

В систему перемішування входять також відбивні перегородки – вузькі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок реактора. Ці перегородки запобігають виникненню виру навколо обертової мішалки, переводячи круговий рух рідини у вихровий, рівномірно розподілений по всьому об'єму. Перспективи подальшого застосування апаратів з механічним перемішуванням пов'язані з високою швидкістю масопередачі кисню й значною економією потужності.

У даному курсовому проекті описується ферментер, що має перемішуючий пристрій. Перемішування рідини в біореакторах може бути в більшості випадків здійснено *якірними, лопатевими, рамними або турбінними мішалками* [45].

1. **Лопатеві.** Мішалки даного виду рекомендується застосовувати при перемішуванні з метою суспендування, розчинення й при проведенні хімічних реакцій. Вони прості за конструкцією, але працюють недостатньо інтенсивно. Як правило, лопатеві мішалки низькооборотні, з двома лопатками. Ці мішалки використовуються, коли немає необхідності в інтенсивній радіально – осьовій циркуляції рідини в апараті.

Переваги лопатевих мішалок:

- простота
- низька вартість, в тих випадках, коли матеріал не являється визначаючим в загальній вартості їх виробництва [43].

2. **Якірні.** Ці мішалки доцільно застосовувати для інтенсифікації теплообміну та запобігання випадіння в осад на стінках і днищі даного апарата.

3. **Рамні мішалки** використовують у тих випадках, коли необхідне забезпечення більшої інтенсивності перемішування по висоті, а також при перемішуванні в'язких рідин у великих об'ємах [46].

4. **Турбінні мішалки** використовують у всіх можливих випадках, коли необхідно інтенсивне перемішування, особливо рідин, що сильно різняться по в'язкості, а також при диспергуванні газів в рідині. Також їх часто використовують при розчиненні твердих кристалічних часток, емульгуванні рідин з великою різницею густин [45].

Турбінні мішалки мають лопатки:

- ✓ Якщо лопатки знаходяться в корпусі таким чином, що вони утворюють закриті канали подібні ротору центробіжного насосу, то таку мішалку називають *закритою турбінною мішалкою*.
- ✓ У відкритих мішалках лопатки не знаходяться в корпусі. Тоді мішалка має назву *відкрита турбінна*.

Отже, найбільш простою й високоефективною серед *відкритих турбінних мішалок* – є мішалка з прямими лопатками, які розміщені радіально [43].

Виходячи з вище зазначеного, для проектування процесу отримання біомаси з поживного середовища, яке має достатньо високу в'язкість оскільки в складі є кукурудзяна мука, а процес біосинтезу потребує інтенсивного перемішування та аерування, тому доцільно використовувати турбінну мішалку, оскільки бактерії дуже стійкі до кутових зусиль, які створює даний тип мішалки при високих обертах. До того ж, такий тип мішалки найефективніше розбиває пухирці повітря, що надходять з барботера під час інтенсивної аерації, що інтенсифікує розчинення кисню у культуральній рідині [44].

В апараті встановлена суцільна рубашка охолодження, так як в процесі культивування відбувається дихання мікроорганізмів, в результаті чого проходить інтенсивне виділення тепла.

Ферментер містить барботер – для введення кисню, шляхом барботування через середовище. Барботер – апарат, у нижній частині якого розташований пристрій (як правило, у вигляді трубок з отворами) для подачі тонкими струменями газу або пари.

Функція барботеру полягає у продавлюванні газу або пари крізь шар рідини. Барботер використовують з метою перемішування рідини в різних хімічних процесах, створення сприятливих умов для хімічної взаємодії газів з рідиною.

Принцип роботи барботера полягає у підведенні під шар рідини дрібних бульбашок газу, які потім спричиняють підйом угору часток рідини і тим самим створюють інтенсивне її перемішування [43].

Забезпечення підтримання температури, оптимальної для ефективного росту продуцента ендотоксину і прояву їм підвищеної фізіолого-біохімічної активності,

забезпечується сорочкою ферментера або системою змішувиків. Змішувачі використовуються для подачі пари в процесі стерилізації або води для охолодження. На відміну від барботажних та барботажно-ерліфтних ферментерів, запропонований ферментер має високі масообмінні характеристики по забезпеченню кисню, в ньому є можливість легко варіювати режим перемішування та масообміну, що є суттєво меншими при витратах стерильного повітря, порівняно велика величина робочого об'єму, забезпечується рівномірний розподіл компонентів поживного середовища та мікроорганізмів (забезпечується оптимальний рівень гомоненізації) [44].

За основними процесами життєдіяльності мікроорганізму здійснює спостереження – контрольно-вимірювальна апаратура, що дозволяє підтримувати на заданому рівні температуру всередині ферментера, оптимальне рН середовища, тиск всередині ферментера, витрати повітря, та інші параметри. Ферментер забезпечений пристроєм для взяття проб, для перенесення інокуляту, внесення додаткових поживних речовин необхідних для покращення розвитку продуцента та піногасників [45,46].

Культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 передбачається здійснювати глибинним способом в ферментерах. В представленій роботі передбачено використання ферментеру з механічним перемішуванням, барботажного типу та оснащеним турбінною мішалкою.

Проведення культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 передбачає забезпечення інтенсивного перемішування та аерації середовища, для кращого доступу кисню.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Факультативний анаероб *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23 потребує культивування в аераційних умовах. Отже, в технологічній схемі є необхідністю передбачити стадії підготовки аераційного повітря.

Під час повітrepідготовки втрати можуть мати великий коефіцієнт, тому доцільно даний етап здійснити в окремих будівлях – компресорних відділеннях.

Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

- забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітря забірником у найвищій точці $H \sim 10$ м (висота потолків будівлі = 4 м, висота поверху ~ 5 м, разом з косим дахом будівлі ~ 7 м, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 м вище найвищої точки) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;
- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури $120 - 200^{\circ}\text{C}$);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується (використовують водяні теплообмінники різного типу: кожухотрунні, «труба в трубі»);
- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (ємність великого об'єму);
- крім того ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням до температури $45 - 50^{\circ}\text{C}$ парою у відповідних теплообмінниках;
- очищення у головних ємнісних набивних фільтрах до ступеня очищення $E = 95\%$. Головні фільтри, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень;
- очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,99\%$.

Очищення відпрацьованого повітря. Відпрацьоване повітря через колектори подається на аналогічні головні фільтри для очищення та знешкодження. У разі невеликих витрат повітря, такі фільтри встановлюють безпосередньо на ферментері.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Прибирання виробничих приміщень проводять вологим способом з подальшою обробкою дезінфікуючими розчинами. Для санітарної обробки необхідно застосовувати мийні, дезінфекційні та мийно-дезінфекційні розчини, зареєстровані в Україні та дозволені до застосування [47].

Санітарна обробка поверхонь устаткування, комунікацій, внутрішньої цехової тари та інвентаря складається з послідовного проведення таких операцій [47]:

- ✓ механічне очищення і миття теплою водопровідною водою ($30\pm 5^{\circ}\text{C}$) з мийними засобами, видаляючи з робочих поверхонь залишки компонентів різного походження;
- ✓ промивання водопровідною водою з метою видалення з робочих поверхонь залишків мийних засобів;
- ✓ дезінфекційну обробку робочим розчином з метою знезараження від патогенних і сапрофітних мікроорганізмів;
- ✓ промивання гарячою водопровідною водою ($60\pm 5^{\circ}\text{C}$) з метою видалення із робочих поверхонь, залишків дезінфекційних засобів. По необхідності проводять повторне промивання водою очищеною. У разі використання для дезінфекційної обробки етанолом 76%, промивання водою не проводять;
- ✓ при застосуванні мийно-дезінфекційних засобів об'єднують стадії миття і дезінфекції об'єктів в одну операцію;
- ✓ розчини мийних, дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів для санітарної обробки використовують одноразово. Дезінфекційний антисептичний засоби необхідно чергувати кожні 1-3 місяці з метою недопущення поширення, формування і розмноження стійких форм мікроорганізмів [47].

Планувати допоміжні стадії виробництва необхідно враховуючи особливості культивування продуцента ендотоксинового препарату *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23. Зважаючи на те, що оптимальними умовами росту для штаму 7-1/23 є температура 28-30°C та нейтральне (8) значення рН [20], процес культивування має проходити в асептичних умовах, щоб мінімізувати ризик контамінації сторонньою мікрофлорою.

Виробництво ендотоксину препарату *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23 здійснюється упродовж 30 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 0,1 м³, інокулятор об'ємом 10, збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, а також бокс та лабораторне устаткування.

Слід врахувати, що ферментер на 0,1 м³ та збірник відповідного об'єму – це ємнісне обладнання, але зважаючи на невеликі габарити не потребує для встановлення обслуговуючого майданчика. З розрахунку на це, виділяти окрему кімнату – цех виробничого біосинтезу не потрібно, оскільки в одній кімнаті є можливість розташувати ферментер та інокулятор.

Отже, виробництво включатиме наступні цехи: цех виробничого біосинтезу, качалочна кімната, мікробіологічна лабораторія, де знаходяться холодильники, термостати, бокс, автоклав, сухо жарові шафи, та біохімічна (технологічна) лабораторія, оснащена апаратурою для проведення різних видів контролю (рН-метр, хроматограф, ФЕК тощо) та ваги для приготування поживних середовищ. Відстань між стінами та апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр.

На *рис. 5.2* наведено приблизний план приміщення.

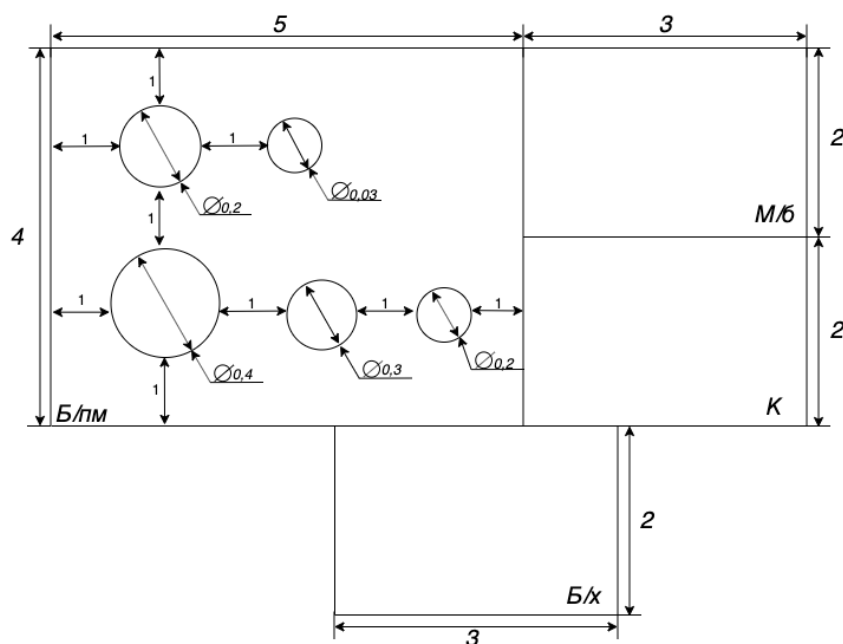


Рис. 5.2 План виробничого приміщення для виробництва ендотоксину препарату *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23

А – цех виробничого біосинтезу та нарощення інокуляту

(1 – ферментер об'ємом 0,1 м³, 1 – інокулятор 0,01 м³ 2 – реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу об'ємом 0,1 м³, 1 – реактор-змішувача для приготування середовища для інокулятора об'ємом 0,01 м³);

М/б – мікробіологічна лабораторія;

Б/х – біохімічна (технологічна) лабораторія;

К – приміщення з качалками.

Таблиця 5.1

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва
ендотоксिनного препарату *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23**

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	100	0,4	0,8
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу композиції А	60	0,3	0,7
Реактор-змішувач для приготування середовища для виробничого біосинтезу композиції Б	10	0,2	0,4
Інокулятор	10	0,2	0,4
Реактор-змішувач для приготування середовища для культивування в інокуляторі композиції А	6	0,03	0,07
Всього	186	1,13	2,37

Примітка*. Дані з сайту <https://bio-rus.ru>

За даними табл. 5.1., загальний об'єм реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 0,186 м³.

Для підтримання чистоти в виробничих приміщеннях підлогу необхідно мити кожного дня, тобто 30 разів. Обробка стін, вікон та підлоги, тобто генеральне прибирання здійснюється щомісячно, відповідно 5 рази. Необхідно розрахувати кількість миючих засобів. Для цього розраховуємо приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 4 м.

Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить (враховуючи місце на майданчику обслуговування для вивантаження кришки ферментера та збірника) 20 м^2 ($4 \times 5 \text{ м}$), площа стін – $((4 \times 4) + (5 \times 4)) \times 2 = 72 \text{ м}^2$, загальна площа – $20 + 72 = 92 \text{ м}^2$.

Загальна площа поверхні обробки миючими засобами наведена в *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м^2	Площа стін, м^2	Загальна площа, м^2
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	20	72	92
Мікробіологічна лабораторія	6	40	46
Біохімічна (технологічна) лабораторія	6	40	46
Приміщення з качалками	6	40	46
Загальна площа	38	192	230

Кількість виробничих циклів для синтезу ендотоксину становить 12. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 13 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$0,186 \times 13 = 2,418 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 5.3*

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва ендотоксिनного препарату *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період
Обладнання	0,186	13	2,418
Підлога	38	30	1 140
Стіни, двері, вікна	192	1	192

Щоб обрати мийний та дезінфікувальний засіб, необхідно врахувати його вартість та витримати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² витрачається 100 мл робочого розчину мийних чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Ємнісне обладнання миють автоматичною мийкою СИП, при цьому витрати мийного засобу складають 20% від загального об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$0,186 \times 0,2 = \mathbf{0,0372} \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}$$

Ферментер та два збірник для виробничого біосинтезу на 0,1 м³ мають висоту 0,8 м та 0,7 – 0,4 м, оскільки середній ріст людини 1,50 м то у потребі для побудови обслуговуючого майданчика немає.

Для забезпечення асептичності процесу культивування перед початком процесу технологічне обладнання, що використовується миють та дезінфікують. До мийних та дезінфікуючих засобів існують наступні вимоги:

1. повинні мати високу протимікробну активність відносно всіх збудників інфекційних, вірусних і паразитарних захворювань;
2. мати невисоку токсичність для людей і не пошкоджувати шкіру і слизові оболонки;
3. бути дешевими;
4. не мати запаху і властивостей барвників;
5. швидко дію та тривалість дії;
6. не повинні псувати предмети, що підлягають дезінфекції.

До уваги було взято засоби для миття, що представлені на ринку та мають найбільший попит, адже вони можуть задовільнити всі потреби споживачів, що використовують 1 засіб для прибирання строком на один місяць. Відомо, що даний товар використовується та реалізується лише у 100 відсотковій кумуляції, тому для більш раціонального використання миючого засобу необхідно підвищувати концентрацію в період кожних 3 місяців, такі дії необхідні для нездійснення створення резистентних штамів мікроорганізмів.

Для більш детального ознайомлення особливостей окремо кожного миючого засобу, прикладами нижче наведена коротка характеристика. Витрати дезінфікувальних засобів та концентратів та їх вартість виведено у табл. 5.4.

Супераль – можна описати як миючий засіб, який має низько пінну властивість з антимікробною дією для використання: на пeverхнях грилів і коптилень, стін, підлог, духовок, певні ємності, обжарочні термокамери, трубопроводи, цехи та приміщення торгівлі, дитячі садки, школи, на підприємствах харчової промисловості, виробничих приміщеннях тощо.

Склад: інгібітор корозії, комплексоутворювач, комплекс ПАР і лугів, піногасник [48].

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва ендотоксिनного препарату

Назва мийного/ дезінфікувального засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Супераль	Обладнання	5	2,418	483,6	38	1,9	918,84
Каустична сода	Обладнання	2	2,418	483,6	18,75	0,375	181,35
Ексан-про-дез	Обладнання	6	2,418	483,6	42	2,52	1 218,672
Гембар	Стіни, підлога, вікна, двері	25	1332	133,2	432	108	14 385,6
Хлор Ліквід	Стіни, підлога, вікна, двері	7	1332	133,2	67	4,69	624,708
Бланідас 300	Стіни, підлога, вікна, двері	6	1332	133,2	190	11,4	1 518,48
Лойран–про 13	Стіни, підлога, вікна, двері	2	1332	133,2	31	0,62	82,584

Примітка. Ціни наведено станом на вересень 2019 р.: <https://prom.ua>

***Приклад розрахунку вартості 1 л робочого розчину мийного засобу «Супераль»:** Вартість 1 л засобу складає 38 грн, концентрація його робочого розчину – 5 %, що говорить про те, що в 1000 мл робочого розчину – 50 мл (0,05 л) концентрату. Отже, $38 \times 0,05 = 1,9$ грн/л робочого розчину. Аналогічно розраховують вартість 1 л робочого розчину для решти миючих засобів.

Каустична сода (гідроксид натрію) користується найбільшим попитом, тому не дивно, що даний засіб можна зустріти у використанні в цілком різних, нетотожних сферах, галузях та побуті лугів. На вигляд можна характеризувати як сильно гігроскопічний фундаментальний лускатий або гранульований матеріал з біловатим відтінком з формулою NaOH. Має добру здатність розчинення у воді, навіть з виділенням великої кількості тепла і створенням мильної густоти. Споживач може придбати каустик у твердому та рідкому стані [49].

Каустична сода – добре підходить як дезінфектант з великим запасом бактерицидного ефекту, який стоїть в основі сильних лужних характеристик.

Засіб використовується для хімічної дезінфекції кімнат, складів, приміщень, особливо там, де проживають тварини. Для знезараження великої площини необхідно всього 2-3 відсотковий, нагрітий до 70°C розчин. Якщо поєднати із 5-10 відсотковим хлоридом натрію, можна отримати дезінфікуючий вплив в покращеними характеристиками.

Їдкий натр необхідний відповідати основним вимогам до хімічних засобів дезінфекції :

- відсутність токсичних речовин для живих істот;
- менший час для отримання результату;
- краща водорозчинність;
- менша кількість концентрату необхідна для отримання результату;
- краща стійкість при зберіганні та повільне спадання обеззаражуючих властивостей;
- більша доступність та менша вартість.

Можна дійти до висновку, що каустична сода це найкращий засіб для дезінфекції [50].

Ексан про дез – характеризується, як засіб, що має слабо лужний пінний очисник з протибактеріальною властивістю, що необхідно використовувати у спеціальних приміщеннях харчової промисловості у режимі ручного використання.

Склад: ПАР, гліцерин, етиловий спирт, масло ялицеве, антикорозійні, антибактеріальні добавки [51].

Гембар – характеризується як більш доступний засіб для дезінфекції поверхонь, посуду та інвентарю. В його складі відсутні альдегіди, окислювальні та хлорпохідні сполуки, луги, феноли. Гуанідинова полімерна сполука подібна як синтетичний аналог природних гуанідинових сполук. Розчин із 25 відсотковим концентратом. Речовина має фунгіцидну, бактерицидну, віруліцидну та пролонговану дію. Знешкоджує мікроби, до яких також можна віднести вірусу, грибки, гепатит Б, ВІЛ, герпес та інші [52].

Хлор Ліквід – описують як більш універсальну рідку речовину на основі гіпохлориту натрію й цілою низкою інших допоміжних універсальних компонентів із широким використанням у подальшому (очищена, стерилізація). Має антибактеріальну дію, використовують для ручного миття.

Зазвичай використовують для дезінфекції та очищення приміщень [53].

Бланідас 300 – фаховий засіб призначений для дезінфекцій, вироблений на основі хлору "Бланідас 300", що є вітчизняним виробником Бланідас та має гарну репутацію на ринку, адже позиціонує себе як найефективніший препарат для проведення дезінфекцій води, посуду, басейнів, медичних інструментів тощо.

До складу «Бланідас 300» входять:

- * діючі речовини - натрієва сіль дихлоризоціанурової кислоти 80,5%;
- * допоміжні речовини - адипінова кислота 8,7%, бікарбонат натрію 8,7%, карбонат натрію 2,2%.

"Бланідас 300" має форму пігулок та гранул, що допомагає йому за малий час бути розчинним у воді, не маючи при цьому запаху та кольору [54].

Лойран – про 13 - є лужним засібом, призначений для миття з антибактеріальною дією, що включає знезараження органічних та неорганічних забруднень. Характерним є піноутворення під час зовнішньої мийки обладнання харчової промисловості [55].

Склад: ПАР, пом'якшувач води, натрію гідроокис, гліцерин, антибактеріальні добавки, інгібітор корозії.

Властивості [56] :

- емульгує жири;

- видаляє різні види забруднень органічної (жир, білок) і неорганічної (солі, молочний камінь) природи;
- багатофункціональне призначення.

Попри все, необхідно завжди знати, що первинна обробка миючим засобом в установах, виробництвах неможлива за використанням найнищої концентрації, що передбачено за для уніможливлення ризику створення резистентних штамів.

Під час миття стін, підлоги, дверей чи вікон необхідно вибрати мийно-дезінфікувальний засіб з пролонгованою дією, тому що тільки в такому випадку можна гарантувати продовження дії реактиву, що дасть споживачу додаткову економію у вигляді зменшення витрат дезінфікувальних засобів. Засоби такого типу мають наступні переваги: пролонгована дія, низька токсичність і безпечність, широкий спектр антимікробної активності, стабільність робочих розчинів. Ефективна концентрація даного миючого засобу становить 0,2 г/л. Для миття обладнання необхідно використовувати миючий засіб каустичну соду з концентрацією 0,2 г/л.

Виходячи з аналізу *таблиці 5.3* під час миття обладнання потрібно буде використати миючий засіб каустичну соду, тому що даний миючий засіб має властивості не залишати розводи на внутрішній частині ферментера. Для миття підлоги, стін, вікон чи дверей використати «Лойран – про 13», оскільки взявши до уваги концентрацію даних розчинів, їх вартість за літр або кілограм, витрати на їх купівлі під час всього періоду виробництва становлять менше ніж інші. Також необхідно взяти до уваги те, що дані миючі засоби не мають шкідливих властивостей та відчутного запаху. Так як вибрані миючі та дезенфікувальні засоби продаються у 100% концентрації, то для зміни миючих засобів, зручніше і економніше буде підвищувати концентрацію кожні 3 місяці, що необхідне не для унеможливлення утворення резистентних штамів мікроорганізмів.

Для забезпечення необхідної чистоти повітря у приміщеннях потрібна наявність стельових бактерицидних ламп, що вмикають періодом на 1,5–2 год після проведення генерального прибирання, яке проводиться раз на тиждень, в приміщеннях без посторонніх осіб.

5.1.4. Обґрунтування стадії підготовки обладнання та комунікацій

Підготовка комунікацій та обладнання складається з наступних етапів:

- миття;
- технічний огляд;
- перевірка на герметичність;
- стерилізація.

Миття. Щоб помити ємнісне обладнання обираємо циркуляційну CIP-мийку (Cleaning in place (Україна)). Вибір саме такого обладнання зумовлений рядом факторів [52]:

- можливість збору води, що використовується для ополіскування;
- автоматичне підтримання температури і концентрації миючого засобу;
- можливість мити одночасно кілька об'єктів;
- нагрів води в малому контурі економить час, воду та енергію.

CIP-мийка або CIP-станція (Cleanning in Place - безрозбірне миття) - є обладнанням модульного типу, яке вироблене з нержавіючої корозійностійкої сталі, що вирішує завдання нагріву і циркуляції миючих розчинів всередині технологічного обладнання і трубопроводів, підготовки, без необхідності їх розбору (що прискорює роботу), з метою автоматизованого видалення забруднень.

CIP-мийка - це обов'язкова складова харчового, біотехнологічного та фармацевтичного підприємств, які хочуть себе називати «сучасними». Є важливою ланкою в забезпеченні якості готового продукту і чистоти [57].

Основні параметри, що характеризують чистоту технологічного обладнання:

- *Фізична чистота* - ступінь фізичного видалення з поверхні видимих оком людини забруднень;
- *Хімічна чистота* - характеризується наявністю органічних і неорганічних забруднень, які призводять до появи стороннього запаху і смаку продукту;
- *Бактеріологічна чистота* - знищення патогенної і іншої мікрофлори за допомогою дезінфектантів;
- *Стерильність* - руйнування будь-яких видів мікроорганізмів стерилізацією.

Крім підтримки якості готового продукту, мийка збільшує термін служби обладнання, а грамотно підібрана СІП-станція вирішує наступні завдання [57]:

- Збільшує оборотність технологічного обладнання;
- Знижує витрати на енергоресурси - воду, пар, миючі реагенти;
- Сприяє підтримці якості та безпеки продукту;
- Знижує втрати продукту;
- Зменшує забруднення навколишнього середовища.

На виробництвах частіше використовуються СІП-станції двох видів, за принципом використання води та розчинів [57]:

- коли миючі розчини і промивна вода використовуються багаторазово;
- коли для кожної процедури мийки використовується новий розчин.

Критерії підбору СІП-станцій:

- За кількістю контурів (одноконтурні, двоконтурні, трьохконтурні).

Кількість незалежних ліній подачі миючих розчинів з окремим насосом і теплообмінником, що регламентуються кількістю об'єктів, що підлягають миттю, які можуть бути помиті одночасно і незалежно.

- За системою управління (ручні, напівавтоматичні, автоматичні).

Рівень автоматизації, який використовується для процесів: підтримки концентрації, температури, потоку. Сучасні станції комплектуються шафою керування на базі контролерів Siemens, Omron або інших, що забезпечують автоматичний режим роботи. Програма керування забезпечує підготовку миючих розчинів, подачу їх на об'єкт мийки та повернення, підтримку концентрації, температури і часу мийки відповідно до заданих параметрів в автоматичному режимі. Система управління дозволяє гнучко і швидко робити наладку і переналагодження маршрутів і технологічних режимів мийки. Модульність системи дозволяє нарощувати або виключати обладнання, в залежності від потреб виробництва.

- Станції нейтралізації.

Використання додаткової ємності для нейтралізації лужних і кислотних розчинів перед їх зливом в каналізаційну систему. Застосовується, коли стоїть питання охорони навколишнього середовища.

Всі СП-станції виконуються за одним принципом і мають загальний алгоритм роботи: миття здійснюється за рахунок прокачування через обладнання та продуктові лінії розчинів миючих і дезінфікуючих реагентів. Для кожного виду реагенту передбачена своя ємність і система підготовки

Основні принципи і параметри миття технологічного обладнання:

- **Температура.** Забезпечує інтенсивність протікання хімічних реакцій, забезпечується вбудованим в систему станції теплообмінником.
- **Час.** Час мийки задається програмою (30-60 хвилин), попереджає перевитрата води і миючих засобів, забезпечуючи час протікання реакції.
- **Концентрація і хімічний склад.** Органічні забруднення (білки, жири, вуглеводи) видаляються розчинами лугів, неорганічні (солі кальцію і магнію, солі органічних кислот) видаляються розчинами кислот.
- **Потік (тиск і швидкість)** - механічний вплив на забруднення. При митті ємностей миючий ефект забезпечують ударна сила струменів і турбулентний потік при стіканні по стінках. Даний ефект досягається використанням розбризкуючих пристроїв (миючих головок), напором і витратою рідини. При митті трубопроводів миючий ефект забезпечує турбулентний рух миючих середовищ (швидкість потоку не менше 1,5 м/с).

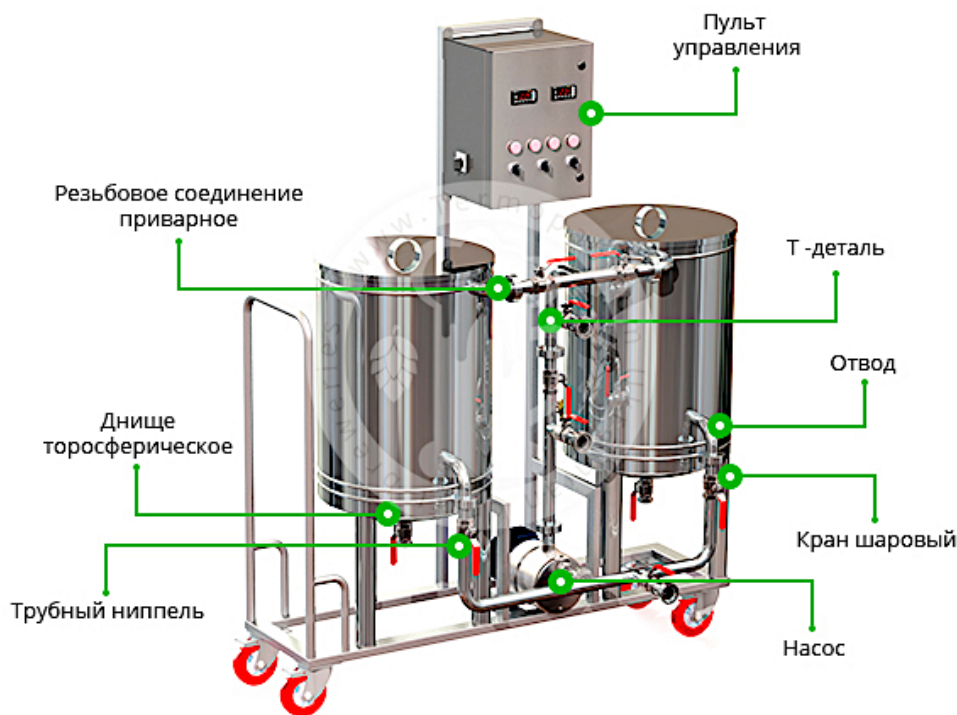


Рис 5.3. Зображення СІР-мийки об'ємом 100 л для миття та дезинфекції обладнання [57].

Переваги використання автоматизованої СІП-станції:

- Багаторазове використання миючих розчинів.
- Можливість одночасного миття декількох об'єктів.
- Автоматична підтримка температури і концентрації миючих середовищ.
- Індивідуальні програми мийки для різних об'єктів.
- Можливість збору води ополіскування.
- Зменшення загального часу мийки.
- Реєстрація та архівація операцій і режимів мийки.
- Можливість оперативно змінювати алгоритм мийки об'єкта.
- Діагностика аварійних ситуацій.
- Функція зворотного зв'язку з об'єктом мийки.
- Повна автоматизація і комп'ютерне управління параметрами.
- Мінімальний вплив людського фактора.
- Можливість нейтралізації мийних розчинів.
- Можливість ручного і автоматизованого управління.
- Простота використання і надійність.
- Можливість модернізації - додавання контурів і опцій.

- Економічність (низьке споживання води, пари, електроенергії, миючих) при високій якості мийки.

Технічний огляд. Технічний огляд проводять після миття та ополіскування обладнання візуальним методом з метою виявлення неущільнень в запірній апаратурі на обладнанні та комунікаціях. Для усунення цих проблем потрібно провести підтягування різьбових з'єднань.

Перевірка на герметичність. Якщо запустити ферментер та не провести технічний огляд можуть виникнути такі проблеми, як деформація ферментера. Це пов'язано з тим, що можливі нещільності у місцях з'єднання, тобто проблеми з герметичністю ферментера.

В цілому впливає, що важливим елементом профілактичний огляд на перевірку герметичності. Як правило, такі дії провадяться за наступною інструкцією:

- для цього на апараті закривають усю запірну арматуру і подають аераційне повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа.
- перекривають вентиль подачі повітря і фіксують покази 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 на апараті та у місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями.

Під час цих дій можливо виявити ущільнення, які потрібно виправити. Тому, для швидкого пошуку ущільнень слід виконати наступні дії:

«Найпростіший» - *омилювання місць з'єднань*. Потрібно приготувати зазделегіть мильний розчин, після чого грушою оприскують всі наявні місця з'єднань. Якщо проявляються дрібні мильні бульбашки, потрібно зафіксувати це місце, а потім підтягнути різьбове з'єднання. Можливо, що ця операція могла не дати потрібного результату, тоді: необхідно замінити прокладку і операцію «омилювання» повторити. Процес здійснюють до ліквідації усіх виявлених неущільнень.

Але навіть такий метод є трудозатратним та йому притаманні декілька недоліків:

- необхідність створення достатньо високого тиску в апараті;
- неможливість контролю при підвищених температурах поверхонь апарата та вузлів;
- неможливість перевірки важкодоступних вузлів.

Галогеновий метод. Цей метод базується на використанні галогенових течієшукачів. На початку апарат заповнюють хлорвмістним газом (чистим або в суміші з повітрям). Наприклад, фреон (хлорон) або CCl_4 , CF_4 , закривають усю запірну апаратуру, апарат нагрівають до 80°C і збільшують тиск до 0,2 МПа. Вихід парів цих речовин проникають через неущільнення та фіксуються течієшукачем.

Перевірка одного апарату вказаним методом зазвичай може тривати – 1,5 – 2 години. Якщо виявлення неущільнень фіксують це місце і здійснюють операції з їх ліквідації, як описано вище.

Стерилізація. Основою створення є розробка методик підготовки обладнання і в даному випадку стерилізація є важливою частиною для загальної підготовки обладнання. Саме ця дія має важливе значення для асептичних виробництв.

Такий фактор, як забезпечення стерильності виробництва, найістотніше впливає на біосинтез біологічно активних речовин, зокрема стерильності комунікацій та обладнання, що безпосередньо контактує з культуральною рідиною.

Для цього застосовують, як правило, термічну стерилізацію водяною насиченою парою з тиском $P = 0,28 - 0,3$ МПа. Процес умовно поділяють на три етапи:

- нагрів апарата
- витримування при температурі стерилізації (суто стерилізація)
- охолодження

Нагрів апарата. Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають насичену пару і прогрівать апарат до температури $80 - 90^\circ\text{C}$.

Стерилізація. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації $t_{\text{ст}} = 130 - 135^\circ\text{C}$ закривають усю

запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації. При стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

Охолодження. Закривають усю запірну арматуру та арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення

5.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу ендотоксинового препарату *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23 використовується середовище наступного складу (г/л) [20]:

Кукурудзяне борошно – 24

Кормові дріжджі – 20

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 5

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,5

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5

Для забезпечення ефективного процесу підготовки поживних середовищ для виробничого ферментера 100 л основні та фосфорні солі стерилізують разом, тож для уникнення утворення нерозчинних фосфатів магнію та кальцію рН розчину з солями доводять до значення 4 – 4,5 6%-вим розчином соляної кислоти.

Проте, оскільки для вирощування культури рН повинно бути на нейтральному рівні (рН = 8), то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище стабілізують стерильним 6%-вим розчином NaOH.

Задля організації коректного та економічно-вигідного процесу ми розраховали вміст та визначили особливості приготування деяких компонентів поживного середовища (HCl, NaOH) на 1 етап виробництва – виробничий біосинтез. Дані наведені в *табл. 5.5*.

Розрахунок вмісту та особливості приготування титруючих розчинів

Об'єм поживного середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
54,5	15	Розчин V = 15 мл у колбі на 25 мл*	109	Розчин V = 109 мл у колбі на 150 мл*

Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів) [20]:

Композиція А: кукурудзяне борошно та кормові дріжджі (режим стерилізації: гостра пара 112°C, 30 хв, 0,5 МПа).

Композиція Б: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Кукурудзяне борошно та кормові дріжджі суспендують у холодній воді, потім заварюють при температурі 60°C та стерилізують в автоклаві при $t = 112^\circ\text{C}$ (30 хв), і перемішують, для уникнення утворення великих грудок.

Основні солі (композиція Б) стерилізуємо окремо від фосфорних (композиція В), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей при нагріванні.

Враховуючи невеликий об'єм середовища потрібного для вирощування інокуляту в колбах, його стерилізація проводиться в автоклаві.

Для стерилізації композицій поживного середовища передбачаємо стерилізаційний горизонтальний автоклав САГ – 13 [58].

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Оскільки об'єми поживного середовища композиції А занадто великий для стерилізації в автоклаві, його треба стерилізувати безпосередньо в реакторі

змішувачі. Над посівним апаратом буде розміщено реактор-змішувач відповідного об'єму для приготування композиції А.

Композиція А: кукурудзяне борошно та кормові дріжджі (режим стерилізації: гостра пара 112°C, 30 хв, 0,5 МПа).

Композиція Б: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Кукурудзяне борошно та кормові дріжджі суспендують у холодній воді, потім заварюють при температурі 60°C та стерилізують в реакторі змішувачі при $t = 112^\circ\text{C}$ (30 хв), і перемішують, для уникнення утворення великих грудок.

Основні солі (композиція Б) стерилізуємо окремо від фосфорних (композиція В), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей при нагріванні. Оскільки об'єм солей малий, тому ми стерелізуємо в колбах та через засівну колбу вносимо в інокулятор на 10 л.

Виробниче культивування в ферментаторі на 100 л

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: кукурудзяне борошно та кормові дріжджі (режим стерилізації: гостра пара 112°C, 30 хв, 0,5 МПа).

Композиція Б: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, рН 4,0 – 4,5, 0,15 МПа).

Кукурудзяне борошно та кормові дріжджі суспендують у холодній воді, потім заварюють при температурі 60°C та стерилізують в реакторі змішувачі при $t = 112^\circ\text{C}$ (30 хв), і перемішують, для уникнення утворення великих грудок.

Солі (композиція Б) змішуємо у реакторі змішувачі, який буде встановлено над ферментером. Безпосередньо сама стерелізація композиції буде відбуватись у ферментері після підкислення 6% HCl для уникнення випадання солей в осад під час стерелізації.

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі додаткові стадії:

- 1) приготування 6% розчину HCl, для підкислення середовища при стерилізації його в виробничому ферментері;
- 2) приготування та стерилізація 6% розчину NaOH, для стабілізації pH середовища перед початком культивування у виробничому ферментері;

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Стадії виділення і очищення ентомопатогенного бактеріального препарату на основі *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23 будуть залежати від морфолого-культуральних і фізико-хімічних характеристик продуцента. Даний продуцент відновиться до роду *Bacillus*, їм притаманне спороутворення в середині вегетативної клітини, у виду *thuringiensis* є особливістю паралельно з цим синтезувати ще і кристалічний ендотоксин. Основою препарату є спори та кристали ендотоксину, вони утворюються під час дозрівання бактеріальної вегетативної клітини, після чого клітина лізується і в культуральну рідину вивільняється спора та кристал. Тривалість культивування *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23 триває 51 годину [20], така тривалість необхідна для того щоб продуцент спожив всі компоненти поживного середовища і завершилися стадії формування як спори так і токсину.

Виходячи з літературних даних послідовність розвитку спори та утворення параспоруального кристалу у *Bacillus thuringiensis* складається з таких етапів [3]:

I етап – формування осьової нитки, в якому немає очевидної причетності мезозом і нуклеоїда;

II етап – утворення проспорової перегородки (септи) за участю мезозом;

III етап – поглинання за участі мезосом, перша поява яйцеподібних включень і параспоруального кристалу, зміна стабільності мембрани і цитоплазми, і формування проспори;

IV - VI етапи – формування екзоспориума, зародкової клітинної стінки, кортексу і оболонки спори супроводжується перетворенням нуклеоїду спори;

VII етап – дозрівання спори.

Розвиток параспоруального кристалу відбувається на етапах III-VI. Вперше параспоруальний кристал *Bacillus thuringiensis* можна спостерігати під час поглинання

(етап III), він має решітчасту структуру країв на цій ранній стадії розвитку. До того моменту, як з'являється екзоспориум, кристал має майже натуральну величину (етап IV). Для проходження споруляції необхідно підтримувати температуру 28-30°C, яка є оптимальною для життєдіяльності бактерії *Bacillus thuringiensis*.

У літературі [3] наявні відомості про спосіб виділення і очищення ентомопатогенного токсину згідно якого необхідно провести наступні стадії:

- сепарування (видалення культуральної рідини)
- розчинення продукту у NaOH
- сепарування (видалення осаду клітин та залишку поживного середовища)
- внесення наповнювачу і прилипачу
- сушіння продукту на розпилювальній сушарці.

Із вищезазначеної технології незрозуміло як саме під час сепарування, отримують осаджені спори і кристали зважаючи те, що спори важчі від кристалу ендотоксину і підуть в осад разом з уламками клітин. Наступна стадія передбачає розчинення продукту (кристалу), однак опираючись на склад закордонного препарату Gnatrol [17], готовий порошок окрім кристалів повинен містити спори, залишки поживного середовища. На наступній стадії відбувається знову сепарація, нажаль, її необхідність автори [3] не зазначають і тим більше не обґрунтовують. Більш логічне пояснення таких стадій може стосуватися отримання токсину для вимірювання активності білку.

Наступна незрозуміла стадія це розчинення токсину у лужному середовищі NaOH. Опіраючись на хімічні властивості ендотоксину, продукт мікробного синтезу являється протоксином, який активується і трансформується у кишечнику комах під дією лужного середовища кишечника. Незрозумілий являється етап розчинення в лужному середовищі токсина до попадання в кишечник комах.

Тому дана технологія виділення і очищення передбачає виробництво препарату тільки з вмістом кристалу як основним компонентом препарату, без спор та незрозумілою формою активності токсина. Це є дуже затратно, за рахунок наявності багатьох стадій, великої кількості наповнювачу та прилипачу для створення готового продукту.

Розглянемо другий варіант технології виділення і очищення цільового продукту, який включає в себе менше технологічних етапів. Є можливість не доводити культивування продуцента до лізису вегетативної клітини, а довести до фази повного синтезу спори та кристалу і в подальшому зробити наступні етапи [3]:

- фільтрування (видалення культуральної рідини)
- дезінтеграція клітин (руйнування вегетативної клітини)
- фільтрування (звільнення від уламків клітин)
- внесення наповнювачу і прилипачу
- сушіння продукту

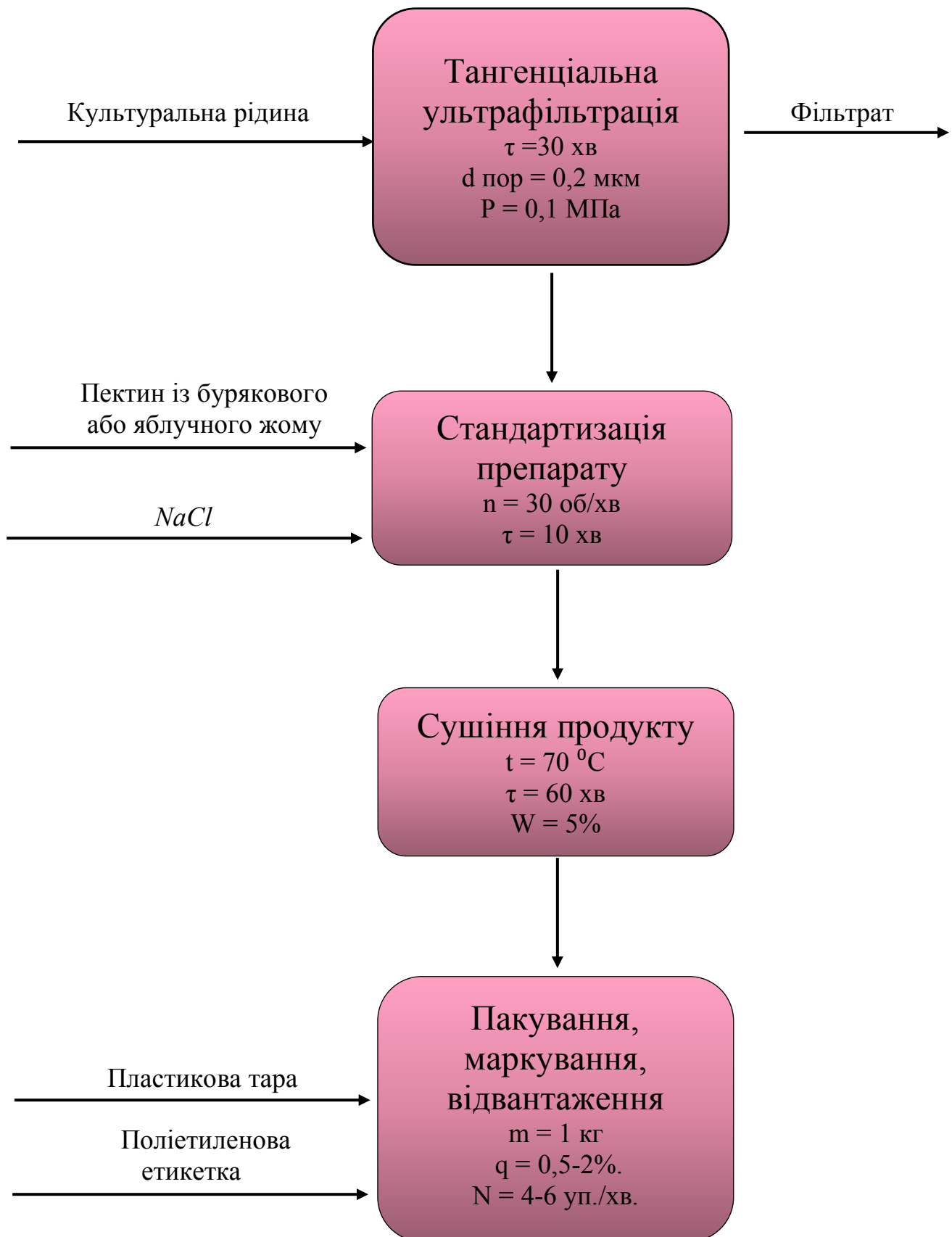
Так, дана технологія включає менше затрат на технологічний процес, оскільки можна використовувати одну фільтраційну установку, що є значно швидшим при реалізації та менш затратно. Однак, виходячи з літературних даних [59], руйнування бактеріальної вегетативної клітини, як під дією хімічних, фізичних або механічних факторів, супроводжується одночасним руйнуванням як вегетативної клітини так і спори, яка дозріває в ній. Тому дана технологія нам не підходить, оскільки в готовому препараті будуть відсутні спори продуцента.

Найбільш простий, зрозумілий та економічним є технологічний процес який включає в себе менше етапів [60]. Отже, запропонована нами технологія включає:

- фільтрування (видалення культуральної рідини)
- внесення наповнювачу і прилипачу
- сушіння продукту

Із запропонованої технологічної схеми отримання препарату буде повністю відтворено закордонний препарат, оскільки сепаруванням, розчинення та повторне сепарування як наведено у першій технології отримання, ми не будемо виключати з препарату спори, або як наведено у другій технології з руйнування клітини, де відбувається руйнування спор. Так, як кінцевий продукт це біопрепарат він повинний включати в себе бактеріальній клітини, навіть у такому стані спокою як спора. Наступне, що є великою перевагою це менше технологічних процесів, та затрат на їх реалізацію.

УМОВНА ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА ОТРИМАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ



5.2.1. Відокремлення біомаси

Тому перший етап виділення продукту мікробного синтезу, в нашому випадку це спори та ендотоксин *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* 7-1/23 це відділення культуральної рідини від клітин продуцента.

Найрозповсюдженішими методами відділення біомаси продуцента від рідкої фази є:

- *Фільтрування* – процес розділення неоднорідних систем через перегородку.
- *Центрифугування* – процес відділення завислих часток з розчинів під дією відцентрових сил.
- *Сепарування* – процес розділення неоднорідних рідких сумішей на фракції, що розрізняються за щільністю, в полі дії відцентрових сил.

Щоб обрати найкращий і економічно вигідний метод потрібно порівняти переваги і недоліки кожного з них (табл. 5.6)

Таблиця 5.6

Порівняльна характеристика основних методів попередньої обробки культуральної рідини

Процес	Переваги	Недоліки
Фільтрування	повне відділення завислих часточок; простота проведення процесу; продуктивність [61].	значні витрати фільтрувальної тканини [61].
Центрифугування	продуктивність та ефективність розділення (можна відділяти частинки розміром до 0,01 мкм) [62].	складність конструкції, висока вартість та енергоємність, складність експлуатації, нагрівання мікроорганізмів, складність герметизації та асептики [62].
Сепарування	висока продуктивність; високий рівень концентрування [62].	складність конструкції; енергоємність [62].

Оскільки спори та кристали ендотоксину є основою для отримання біопрепарату, можна зробити висновок про те, що сепарування і центрифугування доцільно використовувати для попередньої обробки культуральної рідини, але так як кількість культуральної рідини за цикл становить 54 л, то обирати один із цих методів не доцільно, тому що центрифуги і сепаратори дуже затратно робити на замовлення, тимпаче вони призначенні для багатотонажного виробництва. Альтернативою є для таких апаратів метод фільтрування, можливість поставити одну установку і змінювати лише фільтрувальне волокно.

Отже, для попередньої обробки культуральної рідини доцільно використовувати фільтрування.

У мікробіологічній промисловості фільтрування використовують у процесах відділення біомаси від культуральної рідини, для освітлення розчинів, що містять біологічно активні речовини, для стерилізуючого фільтрування та ін.

Принципова схема роботи фільтра проста: суспензія подається на пористу перегородку, при цьому рідка фаза проходить крізь неї, а тверда затримується у вигляді шару осаду.

Фільтри бувають періодичної та безперервної дії. До перших належать фільтри гравітаційні та вакуумні. До других – вакуумні та ті, що працюють під тиском.

Найбільш перспективними для мікробіологічної промисловості є барабанні фільтри, фільтрпреси та стрічкові фільтри (табл. 5.7) [61].

Зважаючи на те, що наше виробництво малотонажне, то найкраще для фільтрування це статичний друк-фільтр, оскільки він малогабаритний та високопродуктивний. Але дана конструкція має значний недолік.

Оскільки розмір спор – 0,8-1,1 мкм, а кристалічні включення мають ромбовидну форму та розміри – від 0,4 до 2 мкм, то ми підбираємо фільтруючу тканину із меншими діаметрами пор (0,4-1,1 мкм), щоб позбавитись від фільтрату [20].

Порівняльна характеристика фільтруючих установок

Вид фільтруючої установки	Переваги	Недоліки
Стрічковий фільтр	крихкість осаду на стрічці; зручність промивання осаду [61].	значні габарити; одержання каламутного фільтрату [61].
Барабанний вакуум-фільтр	універсальність, тобто придатність для розділення різноманітних суспензій; можливість виготовлення з корозійностійких матеріалів, легкість обслуговування [62].	невелика площа фільтрування та порівняно значна вартість; труднощі ретельного промивання та осушування осаду; віддаленість розподільовальної головки від поверхні фільтрування, що приводить до затримки фільтрату та промивних вод всередині барабана і ускладнює їх окреме відведення [62].
Фільтр-прес	велика рушійна сила; велика площа фільтрації; висока продуктивність; мінімальний об'єм займаного простору відносно продуктивності; низькі енергетичні затрати; відсутність необхідності у допоміжній обладнанні [62].	швидкість фільтрації з часом знижується; громіздкі [62].
Нутч-фільтр та друк-фільтр	можливість добре промити осад; легкість захисту від корозії; простота й надійність конструкції [61].	невелика швидкість фільтрування внаслідок того, що різниця тисків практично не перевищує 0,75 ат; ручне вивантаження осаду [61].
Тангенціальна фільтрація	Переваги крос-флоу фільтрації перед іншими видами полягає в одностадійній і безперервній фільтрації, (замість 3-4 фільтрацій), процес повністю автоматизований, мінімізовано кількість обслуговуючого персоналу (один оператор) та займана обладнанням площа, скорочується час фільтрації (за рахунок відсутності контрольної фільтрації). Можливість заміни фільтрів на різні матеріали [63].	Незначні площі фільтрування [64].

Якщо розглядати друк-фільтр з діаметром пор 0,2 мкм то недолік процесу полягає у занадто тривалому часі фільтрування приблизно 20 годин на об'єм 54 л культуральної рідини, та значні витрати при заміні фільтрувальної тканини, оскільки діаметр пор дуже маленький а об'єми культуральної рідини значні для такої фільтрації.

Розрізняють тупикову і тангенціальну фільтрації. Тупикова схема організації потоку характерна для механічної фільтрації. При тангенціальній фільтрації потік продукту здійснюється уздовж мембрани. Схематично обидві схеми наведені на малюнку нижче [63].

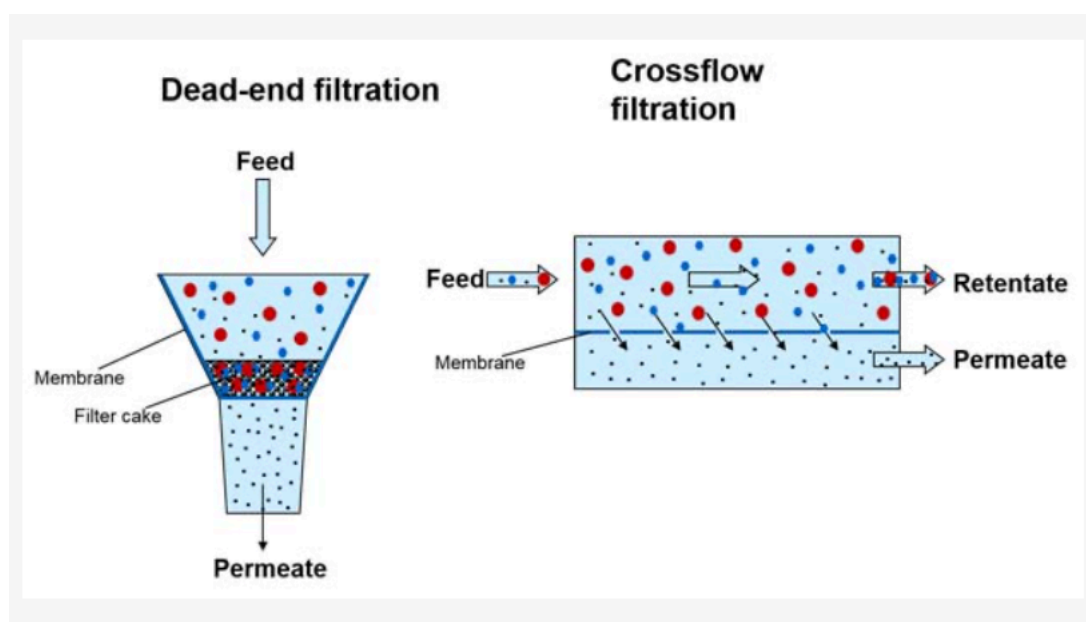


Рис.5.4 Тупикова та тангенціальна фільтрація [63].

Тангенціальна та тупикова фільтрація має ряд відмінностей. Як видно з малюнка, в тупиковій фільтрації потік рідини, створений перпендикулярно поверхні фільтру, а при тангенціальній фільтрації він рухається колінеарно їй. Розділяються також властивості фільтраційного матеріалу, ступінь розділення, конструктивне оформлення [63].

У установці тангенціальної фільтрації циркуляційний насос створює потік, який рухається уздовж поверхні мембрани, попереджуючи утворення осаду, на її поверхні в процесі фільтрації. На відмінно від тупикової фільтрації, в тангенціальному потоці, є можливість вести процес фільтрації в безперервному режимі, без блокування пор мембрани, зберігаючи стабільність виробничого процесу.

У класифікація мембранної фільтрації покладено в основу на величинах видалених частинок (тобто частинки які по розміру не проходять через фільтр, а залишаються в розчині). Чіткої межі між даними класами не існує, так як у якийсь момент навіть форма молекули починає грати конкретну роль [63].

Таблиця 5.8

Способи фільтрації залежно від розмірів частинок

Мікрофільтрація (МФ)	Ультрафільтрація (УФ)	Нанофільтрація (НФ)	Зворотній осмос (ОО)
Розмір частинок від 0,05 до 10 мкм	Частинки і розчинні речовини розміром від 0,001 до 0,05 мкм (5-500 кДа)	Молекули розміром від 0,0005 до 0,001 мкм (400-1000 Да)	Молекули і іони розміром менш 0,0005 мкм (молекулярною масою менше, ніж 400 Да)

Матеріал мембран для фільтрації може бути різним. Класифікація наведена в таблиці нижче [63]:

Таблиця 5.9

Види мембран для процесу фільтрації

Природні мембрани:	Синтетичні мембрани:
1) Мембрани живих мікроорганізмів 2) Ліпосоми	1) Органічні мембрани • Рідкі • Полімерні 2) Неорганічні мембрани • Керамічні • Металічні • Графітові • Скляні

Серед фільтруючих систем які забезпечать швидку фільтрацію є тангенціальна ультрафільтрація. Тобто під час тангенціального потоку та перепаду тисків рідини відбувається фільтрація через діаметр мембрани 0,2 мкм, де ми зневоджуємо розчин при коефіцієнті концентрування 4, а в результаті отримуємо концентрований споровокристалічний комплекс. Під час процесу осад осідає на поверхні мембрани,

але силою потоку фільтрування його очищає і збиває у нижній спуск апарату де ми його вивантажуємо.

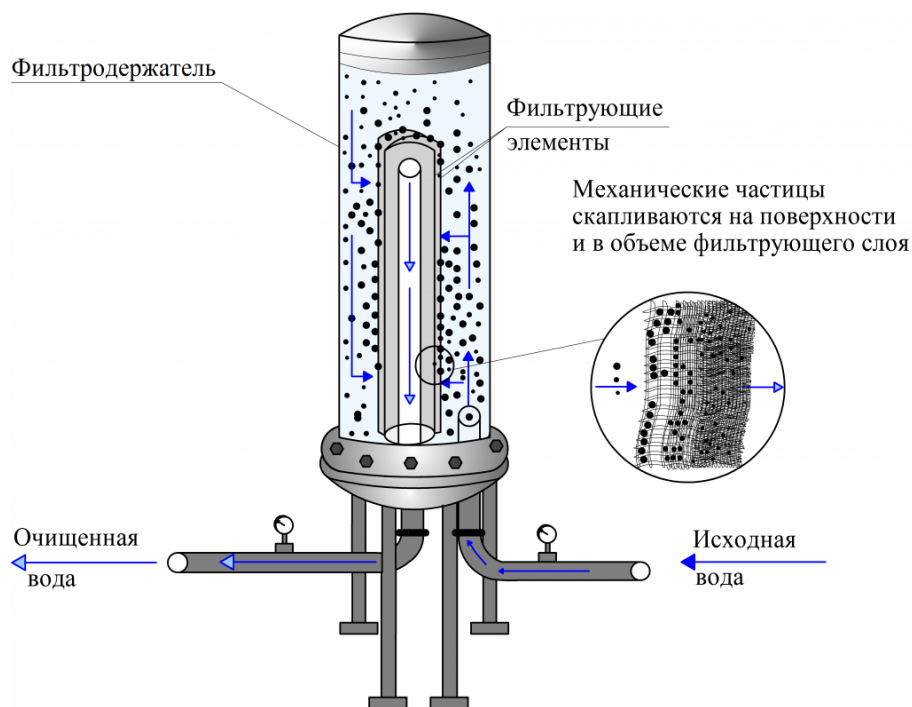


Рис.5.5 Таенгенціальна фільтрація [63]

Система Sartoflow®Beta plus є модульною установкою для напівавтоматичного мікро- і ультрафільтрації. Систему можна використовувати для розробки процесу, клінічних випробувань і промислового виробництва в умовах, що відповідають вимогам cGMP. Набір стандартизованих рішень дозволяє спроектувати систему, що відповідає будь-яким специфічним вимогам. Модуль управління DCU4 сумісний з програмним забезпеченням Sartorius Stedim Biotechs зі збору даних і контролю SCADA MFCS/win [64].

Завдяки високому ступеню захисту насоса і модуля управління система може використовуватися в холодних кімнатах і в жорстких умовах. Модуль управління і сенсорний екран захищені від попадання бризок. Для повноцінної роботи системи необхідно тільки електроживлення, вода для охолодження і, в разі наявності функції стерилізації в лінії, пар [64].



Рис.5.6 Система Sartoflow® Beta plus для тангенціальної фільтрації [64].

Комплектація системи :

Санітарний Коловоротний насос

Гідравлічний фільтродержач SARTOFLOW® 10, що вміщає до десяти касетних фільтрів Sartoson® (0,7м²).

Датчик захисту системи від роботи вхолосту

3 датчика тиску (-1 ... 5 бар)

Температурний датчик (на лінії ретентат)

Перистальтичний насос для подачі розчину (продуктивність ок. 600 л/год)

Система управління DCU4

Можливість дезінфекції поверхні

Всі ємності можуть бути додатково укомплектовані охолоджуючою сорочкою і ізоляцією. Також в якості додаткового обладнання може бути встановлена магнітна мішалка.

У разі використання систем без функції стерилізації в лінії рециркуляційна ємність встановлена на рухому платформу, яка легко з'єднується з фільтраційним модулем. Це полегшує переміщення продукту в разі потреби [64].

Технічні характеристики [64]:

Матеріал, що контактує з продуктом нержавіюча сталь AISI 316L (1,4404/1,4435)

Шорсткість поверхні $R_a < 0,8 \mu m$

ущільнювальні поверхні EPDM (FDA)

Площа фільтрації $0,4 - 7 m^2$

продуктивність насоса 7000 л/год при 4 бар

Макс. Тиск 4 бар

Мін. робочий об'єм 5000 мл (залежить від аксесуарів)

Тип з'єднань 1-1 1/2 "санітарні фланці

габаритні розміри 2500x800x2500 мм (залежить від аксесуарів)

вага установки ок. 600 кг

Характеристика держателя [64]:

Матеріал нержавіюча сталь AISI 316 L

Тип з'єднань 1-1 1/2 "(DN25 / DN35) санітарні фланці

Продуктивність 30-1000 л / год

Площа фільтрації до $7 m^2$ (10 касет по $0,7 m^2$)

Система фіксації касет гідравлічна

Sartocon® ECO - це нові касети для ультрафільтрації з мембранами Hydrosart® або PESU, які відповідають всім сучасним вимогам біотехнологічного та фармацевтичного виробництва. Завдяки високоефективним мембран з дуже низьким рівнем адсорбції, касети Sartocon® ECO ідеально підходять для біологічних застосувань, таких як ультрафільтрація олігонуклеотидів, білків, альбуміну, вакцин, моноклональних антитіл та ін [65].



Рис.5.7 Касетні фільтри які використовуються як для ультрафільтрації [65].

Особливості [65]:

низькі вимоги до рівня подачі потоку сприяють скороченню споживаної потужності насоса

конструкція з тонкими каналами для високого масообміну при низькій швидкості вхідного потоку

можливість збільшення потужності насоса для забезпечення максимальної продуктивності у всіх системах тангенціальної фільтрації

відсутність зв'язування білка забезпечує легкість очищення

НЕ адсорбуються мембрана гарантує високий вихід продукту

широкі хімічний і температурний діапазони дозволяють застосування різних очищувальних і дезінфікуючих речовин

при виробництві касет не використовуються клеї, що забезпечує низький рівень екстрагування

Якість [65]:

Всі матеріали пройшли біологічну перевірку Фармакопеї США і випробування на біологічну реакційність *in vivo* відповідно до класу VI пластмаси за стандартом Фармакопеї США. Фільтрат відповідає або перевершує вимоги діючих принципів Фармакопеї США та Європейської Фармакопеї по стерильності води для ін'єкцій по відношенню до бактеріальних ендотоксинів, твердих частинок, які відновлюють речовин, рН-залежною провідності, екстрагованих речовин, наприклад, аміаку,

хлоридів, сульфатів, кальцію і нітратів. Вони також відповідають вимогам cGMP і зареєстровані Адміністрацією з контролю за продуктами харчування і ліками (м. Вашингтон) в Досьє нормативно-довідкової інформації про препарати під номером DMF 5967 [65].

5.2.2. Стандартизації препарату

В процесі дослідження виробництва ендотоксिनних препаратів на основі спороутворюючої бактерії *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*, було досліджено безліч варіантів та комбінації внесення наповнювачів та прилипачів, що має значний вплив на якість та активність готового продукту. В якості прилипачів зазвичай використовують: карбоксиметилцелюлаза, хлорид натрію, казеїновий клей, сульфанол, гідрокарбонат калію. Але всі ці перелічені сполуки знижують активність препарату згідно запатентованих досліджень [66].

В результаті нових досліджень універсальним наповнювачем у біопрепараті є NaCl, оскільки він доступний, дешевий та хімічно інертний до кристалічного б-ендотоксину. Тим не менше прилипачі, які використовуються для стандартизації препарату впливають на його, тому доцільно порівняти кожен із них в наступній таблиці 5.10 [67]:

Таблиця 5.10

Вплив наповнювача та прилипачу на активність біопрепарату

Біомаса	Прилипач	Наповнювач
10%	Суха сироватка 20%	NaCl
10%	Суша патока 20%	NaCl
15%	Рибний клей молотий 10%	NaCl
15%	Гідролізований хітин 3%	NaCl
20%	Пектин із бурякового жому або яблучного жому 3%	NaCl

Із вищезазначеної таблиці найефективніші прилипачі це рибний клей молотий, гідролізований хітин та пектин із бурякового або яблучного жому, тому складемо таблицю для обрання найдешевшого та ефективного прилипача:

Економічне обґрунтування вибору прилипачу

Прилипач	Ціна за 1 кг, грн	Кількість прилипачу на 1 кг продукції, г	Ціна прилипачу на 1 кг готового продукту, грн
Рибний клей молотий	1620	1000	162
Гідролізований хітин	950	300	28,5
Пектин із бурякового жому або яблучного жому	750	300	22,5

1. <https://prom.ua> 2. <https://flagma.ua> 3. <https://agronet.ua>

***Примітка 1** Ціни на компоненти взяті з українських промислових інтернет магазинів, станом на 2020 рік.

Виходячи із табличних даних такий прилипач як рибний клей використовувати однозначно не вигідно, оскільки занадто високовартісний та витрати на 1 кг продукту сягає 1000 г.

Найкращими є такі прилипачі, як гідролізований хітин та пектин із бурякового або яблучного жому, оскільки кількість на 1 кг продукції всього 300 г. Але не зважаючи на однакову кількість, яка йде на 1 кг продукту, ціна прилипачу на 1 кг продукції різниться, Тому економічно вигідно вибрати в якості наповнювача пектин із бурякового або яблучного жому.

Оскільки, за цикл ми отримуємо 54 л культуральної рідини, а з цього об'єму – 490 г біомаси після процесу фільтрування, то кількість компонентів для стандартизації ендотоксинвмісного препарату буде така – на 490 г біомаси потрібно – 73,5 г прилипачу та 1 885,5 г наповнювачу. В сумі отримуємо 2 450 г готового препарату який піде на процес сушіння. Для такої кількості потрібний реактор-змішувач об'ємом 5 л.

Вологість біомаси після фільтрування становить 60-80%. Тому після зважування та додавання до біомаси в реактор-змішувач всіх компонентів, потрібно ввімкнути перемішувальний пристрій – 30 об/хв на 10 хв, для рівномірного розподілення та утворення пастоподібної фракції.

5.2.3. Сушіння препарату

Виділення води з напівпродуктів мікробного синтезу є однією з кінцевих операцій у виробництві біологічно активних препаратів. Так, наприклад, до виділення води культуральна рідина, що містить дріжджі, вітаміни, амінокислоти, ферменти, має вологість 30–60 %. У сушильних установках вона зневоджується до 5–12 % [61].

Найчастіше застосовуються при зневоджуванні мікробіологічних продуктів конвективні сушарки, в тому числі стрічкові, барабанні, в «киплячому шарі», розпилювальні, рідше контактні сушарки. Переваги і недоліки використання цих сушарок наведено у табл.5.12.

Згідно з патенту [67], сушіння ендотоксинових перпаратів здійснюється в розпилювальній сушарці де при температурі на вході в апарат – 120°C, на виході – 50°C. Вологість порошку після сушіння має становити 10%. Оскільки дана технологія передбачає багатотонажне виробництво, то встановлювати дану сушарку економічно не вигідно. Оскільки після внесення наповнювачу та прилипачу, активна фракція буде пастоподібна і використання розпилювальної сушки буде недоцільним, оскільки вона погано буде проходити через розпилювальну головку.

Порівняльна характеристика сушильних установок

Вид сушарки	Переваги	Недоліки
Стрічкова сушарка	низькотемпературний сушильний агрегат стрічкового типу, що використовує в якості теплоносія гарячу воду; дозволяє економити електричну енергію; дає можливість використання низькотемпературної енергії; забезпечує бережну сушку, що зберігає всі властивості матеріалу; автоматизує процес виробництва [61].	висока вартість; дуже жорсткі вимоги до однорідності матеріалу по фракційному складу і початковій вологості; складна в обслуговуванні (через перекося і розтягування стрічок); має велику кількість рухомих частин; питома продуктивність невисока, а питома витрата тепла досить висока [61].
Барабанна сушарка	помірна вартість; перевірена; надійна; традиційна технологія; бережлива сушка, що забезпечує збереження всіх властивостей матеріалу; висока енергоефективність [62].	громіздкість конструкції; високі капітальні витрати; кришення(подрібнення) матеріалу при сушінні; тривалий контакт матеріалу з тепловим агентом (до 40 хв.); забруднення продуктів золою з топки (0,2 – 0,7 %); налипання вологого матеріалу на внутрішню поверхню і насадки барабана[61].
Сушіння в «киплячому шарі»	досягається значна інтенсивність сушки і створюється можливість регулювання часу перебування матеріалу на ґратах; тривалість сушки більша, ніж в трубах-сушарках, що дає можливість здійснити глибшу і рівномірну сушку матеріалу [61].	значна витрата електроенергії, необхідної для створення високого тиску сушильного агента (2000–6000 Па) [61].
Розпилювальна сушарка	швидкість процесу сушіння; низька температура матеріалу при сушінні; отримання продукту у вигляді дрібного порошку, який не потребує подальшого подрібнення також він є добре розчинним; температура матеріалу на протязі періоду сушки не перевищує температури випарюваної води (60 – 70°C) і залишається нижче температури сушильного агента [62].	порівняно великі розміри сушильної камери; внаслідок невеликої швидкості руху сушильного агента і невеликої напруги камери по випарованій воді (до 2 – 25 кг/(м³год)); складність механізмів розпилення і системи пиловловлювача і розвантаження [61].
Вакуум-сушильна шафа	швидка та рівномірна сушка зразка; низькотемпературна обробка термічно нестабільних зразків; простота конструкції; не енергозатратний; малогабаритний [62].	неможливість проведення безперервних процесів; наявність ручних операцій;мала продуктивність; сушильні шафи застосовують в малотоннажних і штучних виробництвах, для сушки різномірних матеріалів [62].

Інші апарати наведені у вищезазначеній таблиці тільки для великотонажних виробництв, а робити на замовлення для такого малотоннажного виробництва не доцільно.

Зважаючи на малу кількість готового продукту, найкращим варіантом сушінням продукту є вакуум-сушильні шафи, порівняно зі всіма сушильними установками вона компактна та значно дешевша, також вони призначені не для асептичних операцій. Оскільки в якості прилипачу у нас пектин із яблучного або бурякового жому, то температура сушіння можлива до 95°C [69], виходячи з його хімічних властивостей. Однак температура сушіння б-ендотоксину інша, оскільки денатурація білку відбувається при температурі 70°C, отже, виходячи з літературних даних, оптимальна температура для білкового ендотоксину – 60°C [70].

Для сушіння ендотоксину обираємо **шафу сушильну СП-50С** призначені для процесів стерилізації предметів і сушіння продуктів в діапазоні до 300°C [71].

Сушильна шафа дозволяє проводити повністю контрольований процес термічної обробки різних по своєму типу матеріалів. Завдяки примусовій конвекції повітря вентилятором всередині камери відбувається рівномірний розподіл температури по всьому об'єму камери лабораторного сушильного шафи.

Для видалення вологи з камери сушильного шафи передбачений витяжний повітровід.

Процеси сушіння всередині сушильної шафи проходять з великою швидкістю і ефективно, що забезпечує при роботі лабораторного сушильного шафи умови безперебійного та якісного виробництва [71].



Рис.5.8 Сушильна шафа СП-50С [71].

Застосування сушильних шаф [71]:

1. Випробування зразків при тривалому нагріванні сушильного шафи;
2. Теплова обробка вологого порошкового продукту;
3. Теплова обробка твердих зразків для визначення вологості;
4. Пробопідготовка в харчовій, хімічній, фармацевтичній промисловості;
5. Сушка лабораторного та іншого посуду;
6. Сушка фруктів.

Опції до сушильних шаф [71]

- ✓ інтерфейс для підключення до комп'ютера і управління роботою шафи;
- ✓ комплектація спеціальними піддонами і полками;
- ✓ оглядове вікно з термостійкого скла;
- ✓ можливість виробництва нестандартних шаф або шаф спеціального призначення;
- ✓ підставка для шафи стаціонарна або на коліщатах;
- ✓ виготовлення шаф с вмонтованим шейкером або барабаном для перемішування зразків;

Гарантійний термін експлуатації сушильного шафи СП-50С — 18 міс.

Технічні дані

Об'єм 56 л	56 л
Ширина сушильного шафи 650	650 мм
Глибина сушильного шафи	620 мм
Висота сушильного шафи	715 мм
Ширина камери	450 мм
Глибина камери	330 мм
Висота камери	380 мм
Мінімальна температура нагріву кімнатна	+5°C
Максимальна температура нагріву	300°C
Максимальне відхилення температури по об'єму камери	2,0-3,0°C
Час нагрівання до 85°C	20 хв
Час нагріву до 120°C	20 хв
Час нагріву до 160°C	25 хв
Потужність	1600 Вт
Номінальна напруга	220 В
Вага	41 кг

Переваги [71]:

- Автоматичне відключення вентилятора при відкриванні дверей;
- Ідентичні умови нагріву проб по всьому об'єму камери, незалежно від розміру проб;
- Швидкий і рівномірний нагрів повітря в камері за рахунок примусової конвекції;
- Задній витяжний повітровід 50 мм з регулюванням на передній панелі;

- Мікропроцесорний PID контролер с РК-дисплеєм і дозволяє зберігати в пам'яті до 6 програм;
- Вбудований програмний таймер до 99 годин 59 хвилин;
- Всі електричні компоненти ізолювані від внутрішньої камери;
- Цифрова настройка температури с точністю в один градус;
- Внутрішня камера виготовлена з нержавіючої сталі;
- Регульована захист від перегріву;
- Прогумовані ніжки, можлива установка шаф один на одного;
- Полиці з нержавіючої сталі марки AISI 304;
- Надійний фіксатор і термостійке силіконове ущільнення дверей;

Весь процес можна провести таким чином, розподілити рівномірно пастоподібну фракцію отриману після внесення до продукту наповнювача та прилипачу товщиною 3 см по всій полиці, та поставити на процес сушіння з певними температурами.

Після сушіння висушена маса є сипкою, тому не потребує додаткового подрібнення, а відразу передається на стадію пакування.

5.2.4 Фасування та пакування препарату

Після сушіння порошкоподібна маса подається на фасувальну машину. Оскільки виробництво малотонажне то для зручності фасування буде відбуватись по 1 кг, відповідно під потрібний об'єм підібрано фасувальну машину (рис 5.9).



Рис.5.9 Фасувальна машина для сипкого матеріалу до 10 кг [72].

До складу обладнання для фасування входить: каркас, шнековий завантажувач, накопичувальний бункер і пульт управління.

Спочатку оператор ставить на ваги тару в яку шнековим методом подаються компоненти. Процес завершується, коли заповнення тари досягає заданої дози. Процес наповнення відбувається з пульта управління по команді оператора, також він задає масу дози, режим дозування та інші змінні параметри. Фасувальні машини для сипких продуктів проста у використанні, об'єктивно формує масу дози в пластикову тару до 10 кг, а інтуїтивно зрозумілий інтерфейс управління, забезпечує легкість монтажу і налаштування. Інформація про кінцевий результат і сумарна кількість продукту видається на комп'ютер або на програмований логічний контролер по інтерфейсу RS-485. Гарантійний термін експлуатації - 12 місяців. Післягарантійне обслуговування. При необхідності забезпечується метрологічна легалізація [72].

Характеристика [72]:

- Маса дози - від 1 до 10 кг.
- Точність дозування - 0,5-2%.
- Дозування - вагова.
- Продуктивність - до 4-6 уп./хв.

Функції [72]:

- Зважування.
- Дозування.
- Наповнення.
- Підтримка заданої продуктивності.
- Програма обліку Dozator для комп'ютера.
- Автоматичний і ручний режими роботи.
- Індикація ваги дози.
- Лічильники обліку продукції.

Додаткові опції [72]:

- Нержавіюче виконання.
- Завантажувальний обладнання.
- Лінія захисту мішків.

- Метрологічна легалізація обладнання.
- Монтаж і пусконаладження обладнання.
- Шефмонтаж устаткування.

Оскільки за цикл ми отримуємо 2 450 г сухого готового продукту, то сесну вмикати фасувальну машину немає. Тому після процесу сушіння порошкоподібний препарат зберігають і накопичують у спеціальному збірнику об'ємом 20 л. Після накопичення певного об'єму препарату, вмикається фасувальна машина. Це є економічно вигідніше ніж вмикати після кожного циклу. Фасувати вручну не радиться оскільки препарат містить спори бацил, це погано впливає на здоров'я людини та дихальні шляхи.

Сьогодні упаковка з пластику досить популярна, тому й асортимент її надзвичайно різноманітний, адже використання такої упаковки подовжує термін зберігання товару, на ній чітко видно маркування, яке зберігається досить довго, окрім цього така упаковка стійка о дії таких зовнішніх факторів як вологість [73]. Тому для забезпечення зберігання порошку без впливу вологи доцільно здійснювати його пакування у пластикову тару з кришкою для герметичного закривання (рис 5.10).



Рис.5.10 Пластиковая упаковка об'ємом 1 кг [74].

РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС ТА РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

З техніко-економічного розрахунку потреба в бактеріальному ендотоксиновому препараті складає $G_{\text{нд}} = 6$ кг. За умовами замовника цю кількість сухої біомаси та ендотоксину потрібно виробити за $T_{\text{рд}} = 30$ днів. За літературними даними максимальний синтез ендотоксину досягається 4,52 млрд. спор/мл за умов росту штаму *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 на середовищі такого складу (г/л):

Кукурудзяне борошно – $C_1 = 24$

Кормові дріжджі – $C_2 = 20$

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – $C_3 = 5$

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – $C_4 = 1,5$

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $C_5 = 0,5$

Всього – $C_{\Sigma} = 51$ г/л.

Для одержання посівного матеріалу використовують середовище такого самого складу.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

- 1) час циклу роботи ферментера $T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 51 + 10 = 61$ год, де $T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничого біосинтезу (51 год) та $T_{\text{по}}$ – час підготовки ферментера до роботи (10 год).
- 2) коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1 – 1,5) $K_i = 1,1$;
- 3) коефіцієнт заповнення ферментера, частка (0,5 – 0,7); приймаємо $K_z = 0,6$;
- 4) коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{\text{па}} = 0,6$;
- 5) коефіцієнт заповнення інокулятора, частка $K_{\text{зі}} = 0,6$;
- 6) коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{\text{кол}} = 0,2$;
- 7) коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7 – 0,8) $K_{\text{зб}} = 0,6$;

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Петренко О.В			РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс та розрахунок обладнання		
Перевір.		Ключка Л.В					
Консультан.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
					Літ.	Аркуш	Аркушів
						104	20
					Кафедра БТМ		

- 8) сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{CB} = 0,1$;
- 9) кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка $(0,05 - 0,1)$
 $X_{\phi} = 0,1$;
- 10) кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка $(0,02 - 0,1)$
 $X_{па} = 0,1$;
- 11) кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка $(0,02 - 0,1)$ $X_{ін} = 0,1$;
- 12) кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка $(0,02 - 0,1)$ $X_{кол} = 0,1$;
- 13) втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка $(0,1 - 0,2)$ $E_{\phi} = 0,1$;
- 14) втрати посівного матеріалу при його культивуванні в посівних апаратах, частка $(0,1 - 0,2)$ $E_{па} = 0,1$;
- 15) втрати посівного матеріалу при його культивуванні в інокуляторах, частка $(0,05 - 0,1)$ $E_{ін} = 0,1$;
- 16) втрати посівного матеріалу при його культивуванні в колбах, частка $(0,01 - 0,05)$ $E_{кол} = 0,01$.

6.1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

Кількість готового препарату на добу, г/добу

$$G_{нтд} = G_{нт} \cdot 1000/T_{рд} = 6 \cdot 1000/30 = 193 \text{ г/добу}$$

Кількість готового препарату за цикл, г/цикл

$$G_{цк} = G_{нтд} \cdot T_{ц}/24 = 193 \cdot 61/24 = 491 \text{ г/цикл}$$

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

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot CP_{гп}/X_{кр} \cdot (1 - E_{CB}) = 1,1 \cdot 0,491 \cdot 0,9/10 \cdot (1 - 0,1) = 0,054 \text{ м}^3$$

Кількість циклів

$$N_{цк} = G_{нд}/G_{цк} = 6/(491/1000) = 12$$

Вихід препарату у г за 1 л культуральної рідини

$$P_{кр} = G_{цк}/V_{кр} = 491/54 = 9,1$$

6.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

6.2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{\phi} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\phi}) = 0,054/(1 - 0,1) = 0,06 \text{ м}^3.$$

Кількість поживного середовища в ферментері складе:

$$V_{\text{пс}} = V_{\phi}/(1+X_{\phi}) = 0,06/(1 + 0,1) = 0,0545 \text{ м}^3.$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\phi} - V_{\text{пс}} = 0,06 - 0,0545 = 0,0055 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_{\text{зф}} = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф}} = V_{\phi}/K_{\text{зф}} = 0,06/0,6 = 0,1 \text{ м}^3$.

За *Таблицею 11.1* обираємо ферментер об'ємом $0,1 \text{ м}^3$.

6.2.2 Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість посівний матеріал становить $X_{\phi} = X_i = X_{\text{колб}} = 0,1\%$ від кількості поживного середовища визначаємо кількість посівного матеріалу для інших стадій. Приблизна кількість посівного матеріалу для інших стадій становитиме:

Посівний матеріал з інокулятора геометричним об'ємом $V_{\text{ін}} = 10 \text{ л}$

$$V_{\text{пмф}} = 5,5 \text{ л}$$

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{пмф}}/K_{\text{з}} = 0,0055/0,6 = 0,01 \text{ м}^3$$

За *Таблицею 11.1* обираємо інокулятор геометричним об'ємом $0,01 \text{ м}^3$

Посівний матеріал з качальних колб

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{пмф}} X_{\text{ін}} = 5,5 \cdot 0,1 = 550 \text{ мл}$$

$$\text{Всього колб} - n_{\text{колб}} = V_{\text{пмк}}/V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зколб}} = 550/0,75 \cdot 0,2 = 4 \text{ колб.}$$

Отже маємо 2 ступеневу стадію отримання посівного матеріалу.

6.2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в пілотному ферментері 0,1 м³

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пс}} \cdot C_{\Sigma} = 0,0545 \cdot 51 = 2,8 \text{ кг, в тому числі покомпонентно, кг:}$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1/C_{\Sigma}) = 2,8 (24/51) = 1,3$$

$$\text{Кормові дріжджі} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2/C_{\Sigma}) = 2,8 (20/51) = 1,1$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3/C_{\Sigma}) = 2,8 (5/51) = 0,27$$

$$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{заг}} (C_4/C_{\Sigma}) = 2,8 (1,5/51) = 0,08$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - G_5 = G_{\text{заг}} (C_5/C_{\Sigma}) = 2,8 (0,5/51) = 0,027$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Кількість води визначають за наступною формулою

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс}} - G_{\text{заг}} - (V_{\text{пс}} K_{\text{кон}}),$$

де $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування середовища, а $V_{\text{пс}} K_{\text{кон}}$ – загальна кількість утвореного конденсату.

В залежності від способу стерилізації та використовуваного обладнання величина $K_{\text{кон}}$ може складати:

$K_{\text{кон}} = 0$ при стерилізації закритих колбах або бутілях в автоклаві;

$K_{\text{кон}} = 0,1 \div 0,15$ при стерилізації компонентів у реакторах-змішувачах, інокуляторах або ферментері при подачі гострої пари безпосередньо в середовище;

$K_{\text{кон}} = 0,2$ при стерилізації компонентів в УБС.

Оскільки об'єм поживного середовища для пілотного ферментера (без конденсату) складає $V_{\text{пс}} = 0,05 \text{ м}^3$ то стерилізація в композиціях буде здійснюватись в окремих реакторах гострою парою, приймаємо $K_{\text{кон}} = 0,1$, тоді загальна кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{к}} = V_{\text{пс}} K_{\text{кон}} = 0,0545 \cdot 0,1 = 0,00545 \text{ м}^3 = 5,45 \text{ л}$$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компоненті поживного середовища буде:

$$V_B = V_{\text{пс}} - V_K - G_{\text{заг}} = 54,5 - 5,45 - 2,8 = 46,25 \text{ л.}$$

Для спрощення розрахунків прийmemo, що густина компонентів приблизно дорівнює густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л

Кукурудзяне борошно – $G_{1B} = V_B (C_1/C_{\Sigma}) = 46,25 (24/51) = 21,8$

Кормові дріжджі – $G_{2B} = V_B (C_2/C_{\Sigma}) = 46,25 (20/51) = 18,1$

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – $G_{3B} = V_B (C_3/C_{\Sigma}) = 46,25 (5/51) = 4,5$

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – $G_{4B} = V_B (C_4/C_{\Sigma}) = 46,25 (1,5/51) = 1,4$

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $G_{5B} = V_B (C_5/C_{\Sigma}) = 46,25 (0,5/51) = 0,45$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно, л

Кукурудзяне борошно – $G_{1K} = V_K (C_1/C_{\Sigma}) = 5,45 (24/51) = 2,6$

Кормові дріжджі – $G_{2K} = V_K (C_2/C_{\Sigma}) = 5,45 (20/51) = 2,1$

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – $G_{3K} = V_K (C_3/C_{\Sigma}) = 5,45 (5/51) = 0,5$

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – $G_{4K} = V_K (C_4/C_{\Sigma}) = 5,45 (1,5/51) = 0,2$

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $G_{5K} = V_K (C_5/C_{\Sigma}) = 5,45 (0,5/51) = 0,05$

Формування композицій

Таблиця 6.1

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 0,1 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 54,5 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяне борошно	24	1,3	А	47
Кормові дріжджі	20	1,1		
Вода		39,9		
Конденсат		4,7		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	5	0,27	Б	
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,5	0,08		

MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,027	Б	7,5
Вода		6,35		
Конденсат		0,75		
Разом:		54,5		54,5

Композицію Б після приготування підкислюють 0,6 н нестерильним розчином соляної кислоти із розрахунку 2 мл на 1 л розчину. Після стерилізації поживне середовище в інокуляторі об'ємом 0,1 м³ підлужнюють до оптимального рівня попередньо простерилізованим 0,6 н розчином гідроксиду натрію з розрахунку 2 мл на 1 л середовища.

Відповідно, кількість 0,6 н розчину соляної кислоти для підкислення композиції Б становить $7,5 \times 2 = 15$ мл. Кількість 0,6 н розчину гідроксиду натрію становить $54,5 \times 2 = 109$ мл.

6.2.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 0,01 м³

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{пмф}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 0,0055 / (1 - 0,1) = 0,006 \text{ м}^3 = 6 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{\text{псп}} = V_{\text{па}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 0,006 / (1 + 0,1) = 0,00545 \text{ м}^3 = 5,45 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання посівного апарата:

$$V_{\text{ппп}} = V_{\text{па}} - V_{\text{псп}} = 6 - 5,45 = 0,55 \text{ л.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псп}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{псп}} C_{\Sigma} = 0,00545 \cdot 51 = 0,28 \text{ кг, в тому числі:}$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} - G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 0,28 (24 / 51) = 0,13$$

$$\text{Кормові дріжджі} - G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 0,28 (20 / 51) = 0,109$$

$$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 0,28 (5 / 51) = 0,027$$

$$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 0,28 (1,5 / 51) = 0,008$$

$$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 0,28 (0,5 / 51) = 0,0027$$

Стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в окремих реакторах гострою парою, приймаємо $K_{\text{кон}} = 0,1$, тоді загальна кількість конденсату становитиме: $V_{\text{пак}} = V_{\text{псп}} K_{\text{кон}} = 5,45 \cdot 0,1 = 0,545$ л.

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде становити:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псп}} - V_{\text{пак}} - G_{\text{заг}} = 5,45 - 0,545 - 0,28 = 4,625 \text{ л.}$$

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л.

Кукурудзяне борошно – $G_{1\text{в}} = V_{\text{в}} (C_1/C_{\Sigma}) = 4,625 (24/51) = 2,18$
 Кормові дріжджі – $G_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2/C_{\Sigma}) = 4,625 (20/51) = 1,81$
 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – $G_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3/C_{\Sigma}) = 4,625 (5/51) = 0,45$
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – $G_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4/C_{\Sigma}) = 4,625 (1,5/51) = 0,14$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $G_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5/C_{\Sigma}) = 4,625 (0,5/51) = 0,045$

Розраховуємо кількість конденсату покомпонентно, л

Кукурудзяне борошно – $G_{1\text{к}} = V_{\text{к}} (C_1/C_{\Sigma}) = 0,545 (24/51) = 0,26$
 Кормові дріжджі – $G_{2\text{к}} = V_{\text{к}} (C_2/C_{\Sigma}) = 0,545 (20/51) = 0,21$
 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – $G_{3\text{к}} = V_{\text{к}} (C_3/C_{\Sigma}) = 0,545 (5/51) = 0,05$
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – $G_{4\text{к}} = V_{\text{к}} (C_4/C_{\Sigma}) = 0,545 (1,5/51) = 0,02$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – $G_{5\text{к}} = V_{\text{к}} (C_5/C_{\Sigma}) = 0,545 (0,5/51) = 0,005$

Формування композицій:

Таблиця 6.2

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощуванні посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 0,01 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,45 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяне борошно	24	0,13	А	4,7
Кормові дріжджі	20	0,109		
Вода		3,99		
Конденсат		0,47		

CaCl ₂ ×2H ₂ O	1,5	0,008	Б	0,24
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,0027		
Вода		0,185		
Конденсат		0,025		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	0,027	В	0,51
Вода		0,45		
Конденсат		0,05		
Разом:		5,45		5,45

6.2.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{псм}} = V_{\text{кол}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 0,00055 / (1 - 0,1) = 600 \text{ мл}$$

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{псм}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 600 / (1 + 0,1) = 545 \text{ мл}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб, л:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{псм}} - V_{\text{пск}} = 600 - 545 = 55 \text{ мл}$$

Згідно з прийнятим складом поживного загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}}$ складають:

$$G_{\text{заг}} = V_{\text{пск}} C_{\Sigma} = 0,545 \cdot 51 = 28 \text{ г, в тому числі:}$$

Кукурудзяне борошно – $G_1 = G_{\text{заг}} (C_1 / C_{\Sigma}) = 28 (24 / 51) = 13,2$

Кормові дріжджі – $G_2 = G_{\text{заг}} (C_2 / C_{\Sigma}) = 28 (20 / 51) = 11$

(NH₄)₂HPO₄ – $G_3 = G_{\text{заг}} (C_3 / C_{\Sigma}) = 28 (5 / 51) = 2,7$

CaCl₂×2H₂O – $G_4 = G_{\text{заг}} (C_4 / C_{\Sigma}) = 28 (1,5 / 51) = 0,83$

MgSO₄×7H₂O – $G_5 = G_{\text{заг}} (C_5 / C_{\Sigma}) = 28 (0,5 / 51) = 0,27$

Враховуючи малу кількість компонентів їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві при цьому конденсат не утворюється.

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде: $V_{\text{в}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{заг}} = 545 - 28 = 517 \text{ мл}$

Розрахуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

Кукурудзяне борошно – $G_{1B} = V_B (C_1/C_\Sigma) = 517 (24/51) = 243,3$

Кормові дріжджі – $G_{2B} = V_B (C_2/C_\Sigma) = 517 (20/51) = 202,7$

$(NH_4)_2HPO_4$ – $G_{3B} = V_B (C_3/C_\Sigma) = 517 (5/51) = 50,7$

$CaCl_2 \times 2H_2O$ – $G_{4B} = V_B (C_4/C_\Sigma) = 517 (1,5/51) = 15,2$

$MgSO_4 \times 7H_2O$ – $G_{5B} = V_B (C_5/C_\Sigma) = 517 (0,5/51) = 5,1$

Формування композицій:

Таблиця 6.3

**Склад композицій для стерилізації компонентів для
виращування посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 545 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Кукурудзяне борошно	24	13,2	А	470
Кормові дріжджі	20	11		
Вода		445,6		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	5	2,7	Б	24
$CaCl_2 \times 2H_2O$	1,5	0,83		
Вода		20,3		
$(NH_4)_2HPO_4$	0,5	0,27	В	51
Вода		50,7		
Разом:		545		545

Усі композиції готуються у лабораторному посуді і стерилізуються в автоклав.

6.3 Розрахунок напівпродуктів та баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу

В результаті біосинтезу компоненти поживного середовища у ферментері перетворюються на біомасу, цільовий продукт та баластні речовини. При цьому частина компонентів втрачається через краплевинос, частина ростового субстрату (джерела вуглецю) окислюється до вуглекислого газу і води для одержання енергії (генерації АТФ), необхідної для процесів конструктивного метаболізму. Ці втрати залежать як від складу поживного середовища, так і виду біологічного агента і особливостей його метаболізму. Для спрощення розрахунків ці втрати $E_{\text{бс}}$ можна прийняти в діапазоні від 20 до 60%.

Кількість абсолютно сухих речовин в поживному середовищі для виробничого біосинтезу $G_{\text{загф}} = 2,8$ кг.

Кількість абсолютно сухих речовин в посівному матеріалі з врахуванням втрат при вирощуванні в інокуляторі геометричним об'ємом $0,01 \text{ м}^3$ $E_{\text{ін}} = 0,1$ (частка).

$$G_{\text{заг}} = 0,28 \text{ кг (див. п. 2.4.)}$$

$$G_{\text{загп}} = G_{\text{заг}}(1 - E_{\text{п}}) = 0,25 \text{ кг.}$$

Загальна кількість абсолютно сухих речовин $G_{\text{срф}}$ у середовищі для виробничого біосинтезу становить:

$$G_{\text{срф}} = G_{\text{загф}} + G_{\text{загп}} = 2,8 + 0,25 = 3,05 \text{ кг}$$

Кількість втрат абсолютно сухих речовин $G_{\text{втб}}$ у культуральній рідині в процесів виробничого біосинтезу з врахуванням коефіцієнта втрат $E_{\text{бс}} = 0,5$ (частка).

$$G_{\text{втб}} = G_{\text{срф}} \cdot E_{\text{бс}} = 3,05 \cdot 0,5 = 1,525 \text{ кг}$$

Кількість абсолютно сухих речовин в культуральній рідині, що йде на подальшу переробку, становить:

$$G_{\text{сркр}} = G_{\text{срф}} - G_{\text{втб}} = 3,05 - 1,525 = 1,525 \text{ кг}$$

Кількість культуральної рідини після виробничого біосинтезу, кг:

$$G_{\text{кр}} = V_{\text{кр}} \cdot \rho_{\text{кр}} = 0,054 \cdot 1050 = 56,7 \text{ кг,}$$

де $\rho_{\text{кр}}$ – середня густина культуральної рідини ($\rho_{\text{кр}} = (1020 \dots 1050 \text{ кг/м}^3)$).

Визначаємо кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) в культуральній рідині:

$$G_{асб} = V_{кр} \cdot X_{кр} = 0,054 \cdot 10 = 0,54 \text{ кг}$$

Кількість абсолютно сухих баластних речовин в культуральній рідині становить:

$$G_{брв} = G_{сркр} - G_{асб} = 1,525 - 0,54 = 0,985 \text{ кг}$$

Кількість води, що міститься в культуральній рідині, складе:

$$G_{води} = G_{кр} - G_{асб} - G_{брв} = 56,7 - 0,54 - 0,985 = 55,175 \text{ кг}$$

6.4. Стадія ТП. Виділення, очищення та фасування готової продукції

6.4.1. Відділення КР мікрофільтрацією

Об'єм суспензії культуральної рідини, що йде на подальшу переробку складає $V_{кр} = 0,054 \text{ м}^3$.

Приймаємо ступінь концентрування $K_{мік} = 2$

Об'єм концентрату ферменту з врахуванням коефіцієнта втрат при мікрофільтрації $E_{мік} = 0,02$ (частка) складатиме:

$$V_{кон1} = V_{кр} \cdot (1 - E_{мік}) / K_{мік} = 54 \cdot (1 - 0,02) / 2 = 26,5 \text{ л}$$

Втрати об'єму концентрату при мікрофільтрації:

$$V_{втуф} = V_{кр} \cdot E_{мік} = 54 \cdot 0,02 = 1,08 \text{ л}$$

Маса абсолютно сухих речовин в концентраті з врахуванням втрат мікрофільтрації $E_{мік} = 0,02$ (частка) складає:

$$G_{аск1} = (G_{фт} - (G_{брв} \cdot E_{оч})) \cdot (1 - E_{мік}) = (1,525 - (0,985 \cdot 0,5)) \cdot (1 - 0,02) = 1,08 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в концентраті становить:

$$CP_{кон} = G_{аск1} \cdot 100 / V_{кон} = 1,08 \cdot 100 / 26,46 = 3,81 \text{ мас.}\%$$

Маса баластних речовин на фільтрі:

$$G_{бр} = 0,985 \cdot 0,5 = 0,493 \text{ кг}$$

Об'єм пермеату після концентрування:

$$V_{пер} = V_{кр} - V_{кон} - V_{втуф} = 54 - 26,5 - 1,08 = 26,46 \text{ л}$$

6.4.2. Концентрування споровокристалічного комплексу методом ультрафільтрації

Приймаємо ступінь концентрування $K_{уф} = 2$

Об'єм концентрату ферменту з врахуванням коефіцієнта втрат при ультрафільтрації $E_{уф} = 0,02$ (частка) складатиме:

$$V_{\text{кон2}} = V_{\text{кон1}} \cdot (1 - E_{\text{уф}}) / K_{\text{уф}} = 26,5 \cdot (1 - 0,02) / 2 = 13 \text{ л}$$

Втрати об'єму концентрату при ультрафільтрації:

$$V_{\text{втуф}} = V_{\text{кон1}} \cdot E_{\text{уф}} = 26,5 \cdot 0,02 = 0,53 \text{ л}$$

Маса абсолютно сухих речовин в концентраті з врахуванням втрат ультрафільтрації $E_{\text{уф}} = 0,02$ (частка) складає:

$$G_{\text{аск2}} = (G_{\text{аск1}} - (G_{\text{брв}} \cdot E_{\text{оч}})) \cdot (1 - E_{\text{уф}}) = (1,01 - 0,493) \cdot (1 - 0,02) = 0,506 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в концентраті становить:

$$CP_{\text{кон}} = G_{\text{аск2}} \cdot 100 / V_{\text{кон}} = 0,53 \cdot 100 / 13 = 4,07 \text{ мас. \%}$$

Маса баластних речовин в пермеаті:

$$G_{\text{бр}} = 0,985 \cdot 0,5 = 0,493 \text{ кг}$$

Об'єм пермеату після концентрування:

$$V_{\text{пер}} = V_{\text{кон1}} - V_{\text{кон2}} - V_{\text{втуф}} = 26,5 - 13 - 0,26 = 13,24 \text{ л}$$

6.4.3. Розрахунок кількості наповнювача (NaCl) та прилипачу (пектин) до стандартної готового ендотоксिनного препарату

Отриманий осад після ультрафільтрації об'ємом 0,506 кг, розраховуємо витрати наповнювача 77% та 3% прилипачу від усієї маси препарату.

$G_{\text{нап}} = 1948,1 + 75,9 = 2\,024 \text{ г}$ наповнювачу та прилипачу що складає 80% бактеріального препарату.

Змішування компонентів для стандартизації споровокристалічного комплексу із наповнювачем та прилипачем:

$$G_{\text{к}} = G_{\text{нап}} + G_{\text{ос}} = 2\,024 + 506 = 2530 \text{ г}$$

Кількість препарату, отриманого після стандартизації з врахуванням 1% втрат:

$$G_{\text{ст}} = G_{\text{к}} \cdot (1 - 0,01) = 2530 \cdot (1 - 0,01) = 2\,504,7 \text{ г}$$

Втрати препарату при стандартизації:

$$G_{\text{втр}} = G_{\text{к}} - G_{\text{ст}} = 2530 - 2504,7 = 25,3 \text{ г}$$

6.4.4. Сушіння концентрату в сушильній шафі

Ми отримуємо 2 504,7 г концентрату, після стандартизації споровокристалічного комплексу, який має пастоподібну форму.

Маса висушеного препарату з врахуванням коефіцієнта втрат при сушінні $E_{\text{сш}} = 0,04$ (частка) сухої речовини, що виходить з сушарки:

$$G_{\text{сш1}} = G_{\text{ст}} \cdot (1 - E_{\text{сш}}) = 2\,504,7 \cdot (1 - 0,04) = 2\,404,5 \text{ г}$$

Втрати води при сушінні

$$G_{\text{сш2}} = G_{\text{ст}} - G_{\text{сш1}} = 2\,504,7 - 2\,404,5 \text{ г} = 100,2 \text{ г}$$

6.4.5. Стадія ПМВ. Пакування, маркування, відвантаження

Препарат розфасовують пластмасові банки по 1 кг.

Втрати при фасуванні складають $E_{\text{уп}} = 0,01$

Кількість біопрепарату для фасування з урахуванням втрат складає

$$G_{\text{уп}} = G_{\text{сш}} \cdot (1 - E_{\text{уп}}) = 2\,404,5 \cdot (1 - 0,01) = 2\,380$$

або кількість пластикових банок при заповненні $N_{\text{п}} = 1 \text{ кг}$ складає

$$N_{\text{пк}} = G_{\text{уп}} / N_{\text{п}} = 2,38 / 1 = 3 \text{ банок}$$

Механічні втрати біопрепарату при фасуванні становлять

$$G_{\text{втм}} = G_{\text{сш}} - G_{\text{уп}} = 2\,404,5 - 2\,380 = 24,5 \text{ г}$$

Похибка продуктового розрахунку складає

$$\Delta = (G_{\text{уп}} - G_{\text{цк}}) \cdot 100 / G_{\text{уп}} = (2\,500 - 2\,380) \cdot 100 / 2\,380 = 5 \%,$$

що значно менше заданої точності $\pm 10 \%$.

Робимо висновок, що продуктовий розрахунок зроблено вірно.

6.5 Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 6.5

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, дм ³	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм ³
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ, (мл)			
1.1.	Кукурудзяне борошно	13,2	Нестерильне ПС	545
1.2.	Кормові дріжджі	11		
1.3.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,7		
1.4.	CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,83		
1.5.	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,27		
1.6.	Вода	517		
	Всього:	545	Всього:	545
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1.	Нестерильне ПС	545	Стерильне ПС	545
	Всього:	545	Всього:	545
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ, (мл)			
3.1.	Стерильне ПС	545	Посівний матеріал	600
3.2.	Посівний матеріал з колби	55		
	Всього:	600	Всього:	600
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА (л)			
4.1.	Кукурудзяне борошно	0,13	Нестерильне ПС	5
4.2.	Кормові дріжджі	0,109		
4.3.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,027		
4.4.	CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,008		
4.5.	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,0027		
4.6.	Вода	4,624		
	Всього:	4,90	Всього:	5
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ МАЛОГО ІНОКУЛЯТОРА (л)			
5.1.	Нестерильне ПС	4,90	Стерильне ПС	5,54
5.2.	Конденсат	0,545	(втрат немає)	-
	Всього:	5,45	Всього:	5,45

6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В МАЛОМУ ІНОКУЛЯТОРІ (л)			
6.1.	Стерильне ПС	5,45	Посівний матеріал	5,5
6.2.	Посівний матеріал з колб на качалках	0,6		
6.3.	Втрати (частка)	0,1		0,61
	Всього:	6,1	Всього:	6,1
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (л)			
7.1.	Кукурудзяне борошно	1,3	Нестерильне ПС	49
7.2.	Кормові дріжджі	1,1		
7.3.	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,27		
7.4.	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,08		
7.5.	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,027		
7.8.	Вода	46,25		
	Всього:	49	Всього:	49
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (л)			
8.1.	Нестерильне ПС	49	Стерильне ПС	54,5
8.2.	Розбавлення конденсатом 20%	5,5		
	Всього:	54,5	Всього:	54,5
9.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ (л)			
9.1.	Стерильне поживне середовище	54,5	Культуральна рідина на фільтрацію	54
9.2.	Посівний матеріал з посівного апарата	5,5		
9.3.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	6
	Всього:	60	Всього:	60

Оскільки, кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (54 л) майже співпадає із кількістю культуральної рідини, визначеної відповідно у розрахунку кількості партій продукту (54 л), похибки немає, тому вважаємо що матеріальний баланс зроблено вірно.

Продовження таблиці 6.5

10	ФІЛЬТРУВАННЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ МЕТОДОМ МІКРОФІЛЬТРАЦІЇ (л)			
10.1	КР на фільтрацію, л	54	Концентрат	26,5
10.2			Пермеат	26,46
10.3	Втрати (частка)	0,02	Втрати	1,08
	Всього:	54	Всього:	54
11	КОНЦЕНТРУВАННЯ СПОРОВОКРИСТАЛІЧНОГО КОМПЛЕКСУ МЕТОДОМ УЛЬТРАФІЛЬТРАЦІЇ (л)			
11.1	Супернатант	26,5	Концентрат	13
11.2			Пермеат	13
11.3	Втрати (частка)	0,02	Втрати	0,5
	Всього:	26,5	Всього:	26,5
12	СТАНДАРТИЗАЦІЯ БІОПРЕПАРАТУ (г)			
12.1	Вологий осад після фільтрації, г	506	Вологий стандартизований осад, г	2 504,7
12.2	Наповнювач (NaCl), г	1948,1		
12.3	Прилипач (пектин), г	75,9		
12.4	Втрати (частка)	0,01	Втрати, г	25,3
	Всього:	2 530	Всього:	2 530
13	СУШІННЯ КОНЦЕНТРАТУ У СУШИЛЬНІЙ ШАФІ (г)			
13.1	Вологий стандартизований осад, г	2 504, 7	Готовий сухий порошок, г	2 404,5
13.3	Втрати (частка)	0,04	Втрати, г	100,2
	Всього:	2 504, 7	Всього:	2 504,7
14	ФАСУВАННЯ, УПАКУВАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ (г)			
14.1	Готовий сухий порошок, г	2 404, 5	Упакований продукт, г	2380
14.2	Пластикові банки (1 кг)			
14.3	Втрати (частка)	0,01	Втрати, г	24,5
	Всього:	2 404, 5	Всього:	2 404,5

Похибка розрахунку балансу $\Delta = (G_{\text{уп}} - G_{\text{цкгп}}) * 100 / G_{\text{цкгп}} = (2\,500 - 2\,380) * 100 / 2\,380 = 5\%$. Оскільки відносна похибка розрахунку матеріального балансу не перевищує 10%, вважаємо що матеріальний баланс партії зроблено вірно.

6.6. Розрахунок технологічного обладнання

6.6.1. Розрахунок кількості робочих ферментерів

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_{зф} = 0,6$ м³

$$V_{фг} = V_{ф}/K_{зф} = 0,06/0,6 = 0,1 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за об'ємом ферментер, м³

$$V_{фт} = 0,1 \text{ м}^3$$

Кількість виробничих ферментерів при заданому $K_з$, од.

$$N_{фр} = V_{фг}/V_{фт} = 0,1/0,1 = 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка $K_{зф}$

$$K_{зф} = V_{ф}/V_{фт} \cdot N_{фт} = 0,06/0,1 \cdot 1 = 0,6$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фт} + 1$ запасний.

6.6.2. Розрахунок кількості посівних апаратів для отримання інокуляту об'ємом 0,01 м³

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_{па} = 0,6$

$$V_{пг} = V_{па}/K_{па} = 0,006/0,6 = 0,01 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом апарат: $V_{ппа} = 0,01 \text{ м}^3$.

Кількість посівних апаратів при заданому $K_з$:

$$N_{пар} = V_{ппа}/V_{ппа} = 0,01/0,01 = 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка $K_{зф}$

$$K_{зпа} = V_{па}/(V_{ппа} \cdot N_{пар}) = 0,006/0,01 \cdot 1 = 0,6$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фт} + 1$ запасний.

6.6.3. Уточнюючий розрахунок кількості качалочних колб

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

$$V_{гколб} = V_{колб} / K_{колб} = 0,600/0,2 = 3 \text{ л}$$

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

Кількість качалочних колб при заданому $K_{\text{колб}}$

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{гколб}} / V_{\text{нколб}} = 3/0,75 = 4 \text{ колб}$$

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

6.7.1. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом $0,1 \text{ м}^3$

Композиції для приготування поживного середовища готуються в реакторах-змішувачах для ферментера об'ємом 100 л.

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}} / K_{36} = 47/0,8 = 58,75 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор-змішувач: $V_{\text{нр}} = 60$ л.

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить:

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Аг}} / V_{\text{нр}} = 58,75/60 = 0,98. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3\text{р}} = V_{\text{А}} / (V_{\text{нр}} N_{\text{р}}) = 47/(60) = 0,78$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85).

Отже, приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 зап.

Після приготування композиція А передається в інокулятор, де стерилізується.

б) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б.

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36} = 0,8$:

$$V_{\text{Бг}} = V_{\text{Б}} / K_{36} = 7,5/0,8 = 9,38 \text{ л}$$

Вибираємо з Таблиці 11.1. найближчий за номінальним об'ємом реактор:

Кількість реакторів при заданому K_{36} становить: $V_{\text{нр}} = 10$ л

$$N_{\text{р}} = V_{\text{Бг}} / V_{\text{нр}} = 9,38/10 = 0,94. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{3\text{р}} = V_{\text{Б}} / (V_{\text{нр}} N_{\text{р}}) = 7,5/(10) = 0,75$$

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

Після приготування композиція Б стерилізується в реакторі і потім передається до інокулятора для змішування. Для корегування рН в процесі приготування та після стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 100 л розраховуємо кількість розчину кислоти та лугу із розрахунку 2 мл на 1 л поживного середовища.

Кислоту для підкислення композиції Б у кількості 15 мл, яка вноситься в процесі приготування композиції безпосередньо в реактор об'ємом 60 л перед стерилізацією.

Кількість попередньо простерилізованого 0,6 н розчину гідроксиду натрія у кількості 109 мл вносять асептично в інокулятор після змішування композицій за допомогою дозуючої системи. Для стерилізації лугу в автоклаві використовують колбу ємністю 250 мл.

6.7.2. Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 0,01 м³

Композиції для приготування поживного середовища готуються в реакторах-змішувачах для інокулятора об'ємом 10 л.

а) Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{Аг} = V_A / K_{зб} = 4,7 / 0,8 = 5,9 \text{ л}$$

Вибираємо з Таблиці 11.1. найближчий за номінальним об'ємом реактор: $V_{нр} = 6 \text{ л}$

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

$$N_p = V_{Аг} / V_{нр} = 5,9 / 6 = 0,98. \text{ Приймаємо} - 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_A / (V_{нр} N_p) = 4,7 / (6) = 0,78$$

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

Після приготування композиція А передається в інокулятор, де стерилізується.

РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНЕННЯ

Специфікація обладнання забраженого на апаратурній схемі, наведена в табл.

7.1

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу ларвіцидного ендотоксинувого препарату

Позиц ія	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
CIP-1	CIP-мийка	1	CIP-мийка марки SIEMENS. Станція мийки обладнання складається з двох ємностей: реактору для миючого розчину і ємності відпрацьованого миючого розчину (з корозійностійкої нержавіючої сталі, яке виконує завдання підготовки, нагріву і циркуляції миючих розчинів всередині технологічного обладнання і трубопроводів, без необхідності їх розбору, з метою автоматизованого видалення забруднень), дозатор та двома насосами Grundfos для CIP мийки витримують температуру до 180°C та виготовлені з нержавіючої сталі, що дає можливість витримати агресивні миючі засоби, що зустрічаються в процесах очищення. СІП насоси мають електро-полірування, щоб забезпечити відсутність приклеювання залишків до внутрішньої поверхні Продуктивність технічна, м³ / год до 5,0 Зібрана конструкція [57].

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання	Літ.	Аркуш	Акрушів
Розроб.	Петренко О.В							
Перевір.	Ключка Л.В						124	4
Консультан.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

ПЗ-2	Повітрозабірник	1	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-3	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр ФПО FA-3 «Уралкомпресормаш» (Росія), 138x385x424 мм, площа фільтрації 3 м ² , корпус нержавіюча сталь, матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E = 80 % [76]
К-4	Компресор	1	Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с, робочий тиск 1 МПа, 620x700x1260 мм, високоякісна нержавіюча сталь [77]
Т-5	Теплообмінник охолоджувач	1	Осушувач ОВ 42 «АСО» (Росія), пропускна здатність 700 л/хв, робочий тиск 16 бар, 440x570x440 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 0,2 кВт [78]
Р-6	Ресивер	1	Ресивер вертикальний РВ 110/10 «АСО» (Росія), об'єм 110 л, робочий тиск 10 бар, 600x600x1000 мм, високоякісна нержавіюча сталь [79]
Т-7	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник HF75 «Pahlen» (Швеція), пропускна здатність 600 л/хв, робочий тиск 10 бар, 702x139 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 75 кВт [80]
Ф-8	Фільтр головний	1	Фільтри ФТОП Н12 СКБ Технофільтр (Україна), 305x305x78 мм, площа фільтрації 2,7 м ² , пропускна здатність 270 м ³ , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокло, E = 95% [81]
Р-11	Реактор змішувач	1	Реактор об'ємом 6 л, з сорочкою із нержавіючої сталі, з перемішуючим пристроєм, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість перемішування 100 об/хв [82]

Продовження таблиці 7.1

P-14 P-21	Реактор змішувач	2	Реактор об'ємом 60 л, з сорочкою із нержавіючої сталі, з перемішуючим пристроєм, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість перемішування 100 об/хв [82]
P-15	Реактор змішувач	1	Реактор об'ємом 10 л, з сорочкою із нержавіючої сталі, з перемішуючим пристроєм, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість перемішування 100 об/хв [82]
Ф-9 Ф-10 Ф-12 Ф-13 Ф-16 Ф-17	Індивідуальний фільтр	6	Фільтри НЕРА Н14 СКБ Технофільтр (Україна), 305х305х78 мм, площа фільтрації 2,7 м ² , пропускна здатність 270 м ³ , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокло, Е = 99,999 % [83]
ІН-18	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер об'ємом 10 л із нержавіючої сталі, швидкість перемішування 220-250 об/хв «BIORUS» [84]
ФР-19	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 100 л із нержавіючої сталі, швидкість перемішування 220-250 об/хв «BIORUS» [36]
Н-20	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос фірми РСМ серії Delasco (Франція), продуктивністю до 15 л/хв для об'єму 60 л, високоякісна нержавіюча сталь [87]

Ф-22	Тангенціальна ультрація	1	Система Sartoflow®Beta plus є модульною установкою для напівавтоматичного мікро- і ультрафільтрації. Гідравлический фільтродержач SARTOFLOW® 10, що включає до десяти касетних фільтрів Sartoson® (0,7м²). 3 датчика тиску (-1..5 бар) Розміри 2500х800х2500 мм. Матеріал нержавіюча сталь. Продуктивність 30-1000 л/год [63,66]
Р-23	Реактор змішувач	1	Реактор об'ємом 5 л, без сорочки із нержавіючої сталі, з перемішувачем пристроєм, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість перемішування 100 об/хв [85].
СШ-24	Сушильна шафа	1	Шафа сушильна СП-50С фірми «Uoslab», об'ємом 63 л, максимальна температура 300°C, 3 варіації температури, розмір деки (ШхГ), 439×300 мм, максимальна корисна площа завантаження, 0,5268 м², Кількість полиць (стандарт/максимум), 2/4 шт, матеріал полиць AISI 304, матеріал дек (листів) AISI 304, розміри камери (ШхВхГ), 450х381х363Мм, габаритні розміри шафи (ШхВхГ), 650×673×617 мм, номінальна потужність, 1600 Вт [71].
ЗБ-25	Збірник	1	Збірник для зберігання висушеного ларвіцидного препарату до фасування. Матеріал – нержавіюча сталь. Виробник: «Лаб&Фарма», Чехія. Місткість 20 л [86].
ФМ-26	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина фірми «Техноваги» до 10 кг, точність дозування 0,5-2%, дозування – вагове, продуктивність – 4-6 уп/хв, матеріал корпусу – нержавіюча сталь [72].

РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТУ

Технологічна схема біосинтезу ендотоксину препарату включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ), технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез) та стадії виділення і очищення цільового продукту (тангенціальна фільтрація, стандартизація препарату, сушіння продукту та фасування, пакування, відвантаження).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

Роботи санітарно-гігієнічного спрямування на біотехнологічних підприємствах є обов'язковою частиною підготовчих робіт. Основною метою проведення робіт санітарної підготовки виробництва є – мінімізувати кількість контамінантів в усіх стадіях виробничого процесу, таких як: підготовка поживного середовища, підготовка аераційного повітря, підготовка обладнання, підготовка допоміжних розчинів також забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика впливають на якісні показники продукції.

Роботи санітарно-гігієнічного призначення суттєво впливають на створення безпечних умов праці і охороні здоров'я працівників підприємства.

Виконання санітарної підготовки виробництва відбувається реалізацією по щоденному, позмінному та генеральному прибиранні основних виробничих приміщень та підготовки обладнання [83].

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих засобів

На стадії приготування миючих та дезінфікуючих засобів повинні використовуватись ті речовини які є визнанні допустимими для використання в біотехнологічній практиці: розчин хлораміну, розчин їдкого натру – каустична сода та інші дезінфектанти.

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми виробництва ларвіцидного ендотоксинувого препарату	Літ.	Аркуш	Аркушів	
Розроб.		Петренко О.В							
Перевір.		Ключка Л.В					128	17	
Консультан.									
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ			

На сьогоднішній день загальновизнаним способом стерилізації апаратури та комунікацій є термічна стерилізація насиченою водяною парою. Щоб вимити втурішній простір обладнання, які забруднюються після певних технологічних процесів, в даному дипломному проекті використовується розчин каустичної соди [47].

ДР 1.1.1 Приготування розчину каустичної соди

Робочі розчини каустичної соди готують у окремому збірнику СІР-мийки (СМ-1) який виготовлений з нержавіючої сталі. Препарат у вигляді порошку вносять у збірник СІР-мийки (СМ-1) додають воду та розчиняють при перемішуванні протягом 1–5 хв [49].

Робочий розчин каустичної соди (2 %) готують в установці СІР-мийка (СМ-1). На 1 цикл виробничого біосинтезу потрібно 37,2 л 2% розчину каустичної соди. Для цього зважують за допомогою об'ємно-вагового дозатора 759 г каустичної соди та додають 36,4 л води та отримуємо 37,2 л робочого розчину з концентрацією 2% [50].

ДР 1.1.2 Приготування розчину «Лойран – про 13»

Робочий розчин Лойран – про 13 продається з концентрацією 100%, а робочий розчин для миття 2%, тому розводимо його у такому відношенні:

Для щоденного прибирання для 1 циклу – 3,03 л води до об'єму 0,77 л розчину отримуємо 3,8 л робочого розчину з концентрацією 2%.

Для генерального прибирання для 1 циклу – 15,3 л води до об'єму 3,9 л розчину отримуємо 19,2 л робочого розчину з концентрацією 2% [55,56].

ДР 1.2 Підготовка приміщень

Під час підготовки виробничих приміщень прибирання відбувається у спецвзутті, гумових рукавичках і фартуху. Інструменти які призначений для миття (відра, губки, швабри) маркують і знезаражують на протязі 2 – 3 годин.

Стіни, двері і інші поверхні протирають поролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючим розчином 100 мл/м² поверхні, потім цим же розчином миють підлогу.

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання приміщень здійснюють після кожної зміни вологим способом. У виробничих приміщеннях підлогу миють 2% розчином миючого засобу із розрахунку 100 мл/м² поверхні підлоги.

Відпрацьований миючий розчин (до ЗВ 11.2).

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання приміщень проводять 1 раз в 30 днів.

У виробничих приміщеннях підлогу миють 2% розчином миючого засобу із розрахунку 100 мл/м² поверхні підлоги.

Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

Відпрацьований миючий розчин (до ЗВ 11.2).

ДР 1.3 Підготовка обладнання та комунікацій

Підготовку обладнання необхідно проводити для досягнення необхідного рівня чистоти та асептики. Для унеможливлення контамінації під час технологічного процесу.

ДР 1.3.1 Миття обладнання

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію СІР – мийки (СМ-1), питну воду і 2 %-й робочий розчин каустичної соди (від ДР1.1.1) протягом 10 хвилин при 70-80°C, для видалення наявних білково-жирових включень та забруднень неорганічного походження на стінках апарату [57].

ДР 1.3.2 Ополіскування обладнання

Ополіскування здійснюють питною водою, протягом 30 хвилин, для унеможливлення нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином луку.

Відпрацьована вода після ополіскування (до ЗВ 11.2)

ДР 1.3.3. Технічний огляд

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки

можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

ДР 1.3.4 Перевірка на герметичність.

Ємнісне обладнання та комунікації перевіряють на герметичність шляхом створювання надлишкового тиску 0,1 – 0,2 МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним.

Фланцеві з'єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води або галоген вмісної речовини (дифторхлорметан) при повітряному тиску від 0,1 до 0,2 МПа.

Відпрацьоване повітря (до ЗВ 11.2) та відпрацьована мильна вода (до ЗВ 11.1)

ДР 1.3.5 Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають глуху пару і нагрівають його до 80–90°C. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації (130 – 135°C) 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°C і надлишкового тиску $P = 0,003 - 0,005$ МПа.

Даний процес проходить з утворенням конденсату.

ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря

Атмосферне повітря забруднене твердими або рідкими частинки, які містять на собі різноманітні мікроорганізми, а основною вимогою аераційного повітря є його стерильність, тому повітря очищають багатоступеневими способами на фільтрах різного ступеня очистки.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 10 м за допомогою пристрою для забору повітря – повітрозабірника (ПЗ-2).

ДР 2.2 Очистка від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі грубої очистки (Ф-3). При проходженні повітря через фільтр грубого очищення (Ф-3) затримується пил та механічні частки, а очищене повітря надходить у компресор (К-4). Ступінь очищення $E = 90 \%$.

Тверді відходи відправляють (до ЗВ 11.3).

ДР 2.3 Компресування повітря

Для забезпечення умов нормальної аерації культури продуцента та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря необхідно стиснути.

При стисканні повітря у компресорі (К-4) його температура підвищується з 15-25 °С на вході в компресор (К-4) до 120-150°С на виході з неї і збільшується вмісту вологи повітря.

Після компресора (К-4) повітря має наступні характеристики: $P = 0,35$ МПа, $t = 120-150^{\circ}\text{C}$, $W = 70 \%$.

ДР 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря (Т-5) до температури 25-30 °С для відведення надлишкової вологи.

Повітря подають на ресивер (Р-6) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи $W = 60-70 \%$.

Процес відбувається з утворенням оборотної води та конденсатом.

ДР 2.6 Нагрівання повітря

Нагрівання повітря відбувається у теплообміннику-нагрівачі (Т-7) до 50°С та вмісту вологи $W=50\%$.

ДР 2.7 Очищення повітря на головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі (Ф-8). Ступінь очищення головного фільтра (Ф-8) становить $E = 95 \%$.

Заміну фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну. В такому випадку знешкоджують тверді відходи (до ЗВ 11.3).

ДР 2.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Ступінь очищення становить $E = 99,9999\%$. Остаточна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальному фільтрі (Ф-9, Ф-10, Ф-12, Ф-13, Ф-16, Ф-17).

Тверді відходи (до ЗВ 11.3).

ДР 3. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів.

Так як робочий об'єм поживного середовища становить 60 л, для ферментера 100 л, то кількість титрантів, яких необхідно приготувати та простерилізувати потрібно 2 мл на 1 л середовища, тобто 124 мл.

ДР 3.1. Приготування 6% HCl для ферментера об'ємом 100 л.

У колбу об'ємом 50 мл вносять 12 мл питної води і 3 мл 36% соляної кислоти, перемішують та отримують 15 мл 6% соляної кислоти. Нестерильний розчин 6% соляної кислоти подають через засівну колбу (до ДР 4.3.3) для доведення рН в ферментері об'ємом 100 л.

ДР 3.2. Приготування на стерилізація 6% NaOH для ферментера об'ємом 100 л.

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 21,8 г їдкого натру, засипають у колбу об'ємом 200 мл та додають 87,2 мл питної води та отримуємо 109 мл 6% їдкого натру. Перемішують, закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві САГ – 13 при температурі $131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (тиск – 0,15 МПа) протягом 30 хв. Стерильний розчин 6% їдкого натру подають через засівну колбу (до ТП 6.1) для доведення рН в ферментері об'ємом 100 л.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Для вирощування інокуляту в колбах на качалці необхідно приготувати 545 мл поживного середовища. Як джерело вуглецю в середовище вноситься кукурудзяний крохмаль, як джерело азоту – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та кормові дріжджі. Вміст компонентів для приготування 545 мл поживного середовища наведено у табл. 8.1.(згідно розділу 6. п. 6.2.5)

Таблиця 8.1

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 545 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Кукурудзяне борошно	24	13,2	А	470
Кормові дріжджі	20	11		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5	2,7	Б	24
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,5	0,83		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5	0,27	В	51
Разом:		545		545

ДР 4.1.1. Заварювання композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 13,2 г кукурудзяної муки та 11 г кормових дріжджів. Наважку кукурудзяної муки поміщають у колбу об'ємом 2 л, додаємо 470 мл теплої дистильованої води, суспендують і за постійного перемішування нагрівають на водяній бані при температурі 80°C протягом 15 хв (до гомогенізації). Додаємо до завареної кукурудзяної муки наважку кормових дріжджів та перемішуємо.

ДР 4.1.2. Стерилізація композиції А

Попередньо заварену кукурудзяну муку та кормові дріжджі що містяться в колбі об'ємом 1 л, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві САГ – 13 при температурі 112°C (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,83 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ та 2,7 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Розчиняють у 24 мл дистильованої води, переносимо у попередньо простерилізовану колбу об'ємом 50 мл. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві САГ – 13 при температурі 131°C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.1.4. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,27 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Розчиняють у 51 мл дистильованої води, переносять у попередньо простерилізовану колбу об'ємом 100 мл. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві САГ – 13 при температурі 131 °C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л.

Для культивування в інокуляторі (ІН-18) об'ємом 10 л необхідно приготувати 5,45 л поживного середовища. Як джерело вуглецю в середовище вноситься кукурудзяний крохмаль, як джерело азоту – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та кормові дріжджі.

Враховуючи, що для засіву інокулятора (ІН-18) використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 550 мл і при стерилізації утворюється конденсат (10%), загальна кількість води, яку потрібно додати для приготування середовища – 5,17 л. Вміст компонентів для приготування 5,45 л поживного середовища наведено у табл. 8.2.(згідно розділу 6. п. 6.2.4)

ДР 4.2.1. Заварювання композиції А.

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,13 кг кукурудзяної муки та 0,109 кг кормових дріжджів. Наважку кукурудзяної муки поміщають у попередньо простерилізований реактор-змішувач (Р-11) об'ємом 6 л, додають 4,7 л теплої питної води, суспендують і за постійного перемішування нагрівають глухою парою, яку

подають у сорочку збірника. Перемішування відбувається за допомогою мішалки, якою обладнаний збірник. Процес відбувається за температури 80°C протягом 15 хв (до гомогенізації). Додаємо до завареної кукурудзяної муки наважку кормових дріжджів та перемішують.

Таблиця 8.2

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощуванні посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 0,01 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,45 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяне борошно	24	0,13	А	4,7
Кормові дріжджі	20	0,109		
CaCl ₂ ×2H ₂ O	1,5	0,008	Б	0,24
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,0027		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5	0,027	В	0,51
Разом:		5,45		5,45

ДР 4.2.2. Стерилізація композиції А.

Стерилізацію здійснюють гострою парою. Подачу пари здійснюють через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 112°C (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,008 кг CaCl₂×2H₂O та 0,0027 кг MgSO₄×7H₂O. Розчиняють у 240 мл дистильованої води, переносимо у попередньо простерилізовану колбу об'ємом 500 мл. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві САГ – 13 при температурі 131°C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

Простерелізований розчин солей, за допомогою засівної колби перекаують самоплином у попередньо простерилізований інокулятор (ІН-18) об'ємом 10.

ДР 4.1.4. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,027 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Розчиняють у 510 мл дистильованої води, переносять у попередньо простерилізовану колбу об'ємом 1 л. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві САГ – 13 при температурі 131°C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

Простерелізований розчин солей, за допомогою засівної колби перекаують самоплином у попередньо простерилізований інокулятор (ІН-18) об'ємом 10.

ДР 4.3 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 100 л.

Для культивування в ферментері (ФР-19) об'ємом 100 л необхідно приготувати 54,5 л поживного середовища. Як джерело вуглецю в середовище вноситься кукурудзяний крохмаль, як джерело азоту – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та кормові дріжджі.

Враховуючи, що для засіву ферментера (ФР-19) використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого становить 5,5 л і при стерилізації утворюється конденсат (10%), то загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить – 51,7 л. Вміст компонентів для приготування 70 л середовища наведено у табл. 8.3.(згідно розділу 6. п. 6.2.5)

ДР 4.3.1. Заварювання композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 1,3 кг кукурудзяної муки та 1,1 кг кормових дріжджів. Відважену кукурудзяну муку поміщають у попередньо простерилізований реактор-змішувач (Р-14) об'ємом 60 л, додають 47 л теплої питної води, суспендують і за постійного перемішування нагрівають глухою парою, яку подають у сорочку збірника. Перемішування відбувається за допомогою мішалки, якою обладнаний збірник. Процес відбувається за температури 80°C протягом 15 хв (до гомогенізації). Додаємо до завареної кукурудзяної муки відважені кормові дріжджі та перемішують.

Склад композицій для стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 54,5 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Кукурудзяне борошно	24	1,3	А	47
Кормові дріжджі	20	1,1		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	0,27	Б	7,5
CaCl ₂ ×2H ₂ O	1,5	0,08		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,027		
Разом:		54,5		54,5

ДР 4.3.2. Стерилізація композиції А

Стерилізацію здійснюють гострою парою. Подачу пари здійснюють через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 112°C (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 4.3.3. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,08 кг CaCl₂×2H₂O, 0,027 кг MgSO₄×7H₂O та 0,27 кг (NH₄)₂HPO₄. Наважку поміщають у попередньо простерилізований реактор-змішувач (Р-15) об'ємом 10 л, заливають 7,5 л питної води. Розчин солі за допомогою насоса перекачують у попередньо простерилізований ферментер (ФР-19) об'ємом 100 л та через засівну колбу додають нестерильний розчин 6% HCl (від ДР 3.1.1) доводячи рН до 4,0 контролюючи рН датчиком. Вмикають мішалку, якою обладнаний ферментер (ФР-19), після перемішування її вимикають.

Стерилізацію здійснюють гострою парою в ферментері, яка подається через нижній патрубок апарату. Процес відбувається при температурі 131 °С (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 зберігають у пробірках зі скошеним рибним агаром та у пробірках під вазелиновим маслом з запарафінованими пробками в холодильнику при 4°C [17].

Пересіви здійснюють кожні 3 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять строго в стерильних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури з колекційної

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках на середовищі рибного агару, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі із рибним агаром і вирощують при температурі 30°C упродовж 24 год.

ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані з ізолюваних колоній (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним рибним агаром (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год.

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять 470 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.2), 24 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.3) та 51 мл композиції В (від ДР 4.1.4). Перемішують і розливають по 136 мл в 4 стерильних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, вирощеною на рибному агаризованому середовищі, вносять 10 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують клітини і піпеткою в асептичних умовах відбирають одержану суспензію та вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування у колбах на качалці 220-250 об/хв впродовж 24 год при 28-30 °С, культуральну рідину в асептичних умовах з колб переносять в засівну колбу об'ємом 1 л.

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

В попередньо простерелізований інокулятор (ІН-18) об'ємом 10 л з вносять попередньо простерелізовані та змішані в одну засівну колбу об'ємом 2 л композиції Б (від ДР 4.2.3) та композиції В (від ДР 4.2.4) – 0,24 та 0,51 л, в асептичних умовах самоплином перекачують 4,7 л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.2.2). За допомогою засівної колби перекачують посівний матеріал через патрубок відкривши вентиль (від ТП 5.4) і вмикають перемішуючий пристрій. У інокулятор (ІН-18) подається стерильне стиснуте повітря, а виводиться відпрацьоване (до ЗВ 11.1). У кожух інокулятора (ІН-18) подається холодна вода, а також виводиться вода на градирню.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі (ІН-18) – 28-30 °С, тривалість – 24 год. Швидкість перемішування становить 220-250 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в ферментер (ФР-19) об'ємом 100 л.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 100 л

В попередньо простерилізований ферментер (ФР-19) об'ємом 100 л з попередньо простерилізованою гострою парою композицією Б (від ДР 4.3.3) об'ємом – 7,5 л, в асептичних умовах самопливом перекачують 47 л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.3.2) та після цього через засівну колбу додають стерильний розчин 6% NaOH (від ДР 3.2.2) для доведення рН до 7,8-8, контролюючи рН датчиком. За допомогою труби перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 5.5) і вмикають перемішуючий пристрій. Перемішуючим пристроєм слугує одновальна турбінна мішалка, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 250 об/хв. Тривалість виробничого культивування становить 51 годину при температурі 28-30 °С та тиску у ферментері (ФР-19) 0,3-0,4 атм, рН 7,8-8 значення якого корегувати не потрібно. У ферментер (ФР-19) подається стерильне стиснуте

повітря, а виводиться відпрацьоване (до *ЗВ 11.1*). У кожух ферментера (ФР-19) подається холодна вода, а також виводиться вода на градирню.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

Процес ферментації проводили в умовах високої аерації і закінчується при досягненні вмісту вільних спор і кристалів ендотоксину до 70-80% від загальної кількості включень і при їх співвідношень 1:1 – 4,52 млрд.спор/мл [17].

ТП 7. Відділення біомаси та ендотоксину

ТП 7.1. Тангенціальна фільтрація

Отримана культуральна рідина після ферментації (від *ТП 6.1*) перекачується насосом (Н-20) у збірник для культуральної рідини об'ємом 0,06 м³ (Р-21). У сорочку збірника подається холодна вода охолоджуючи культуральну рідину до $t=20^{\circ}\text{C}$ та відводиться вода на градирню.

Зі збірника (Р-21) самоплином охолоджена культуральна рідина подається до модуля тангенціальної ультрафільтрації (Ф-22) де основна рушійна сила процесу фільтрації з поперечним потоком є трансмембранним тиском. Трансмембранний тиск є мірою різниці тисків між двома сторонами мембрани. В ході процесу, трансмембранний тиск може зменшуватися через збільшення в'язкості пермеата, отже, знижує ефективність фільтрації з і може зажадати багато часу для великомасштабних процесів. Це може бути припинено шляхом розбавлення пермеата або збільшення швидкості потоку в системі.

Осад збирається на поверхні мембрани а фільтрат проходить скрізь мембрану діаметром 0,2 мкм, таким чином що осад зневоднюється. Також мембрана є самоочисною, насос створює потік, який рухається уздовж поверхні мембрани, запобігаючи утворенню осаду, на її поверхні в процесі фільтрації. Таким чином ми отримуємо концентрат спрорвокристалічного комплексу, який під кінець фільтрації вивантажується через ніжний спуск апарату (до *ТП 8.1*)

Фільтрат подається на знешкодження рідких відходів (до *ЗВ 11.1*).

Відпрацьоване стиснуте повітря до знешкодження газоподібних відходів (до 3В 11.2).

Відпрацьоване фільтрувальне полотно до знешкодження твердих відходів (до 3В 11.3).

ТП 8. Стандартизація препарату

ТП 8.1. Внесення наповнювачу та прилипачу

Отриманий споровкористалічний концентрат після тангенціальної ультрафільтрації (від ТП 7.1) вивантажується через дно фільтруючої установки у збірник (Р-23) об'ємом 5 л. На 506 г біомаси отриманої після фільтрації (від ТП 7.1), відважують на технічних вагах у відтарованій ємності прилипач – пектин із яблучного жому 75,9 г та наповнювач – NaCl 1 948,1 г. Через воронку додають відважений пектин та NaCl у збірник (Р-23) об'ємом 5 л та перемішують разом з осадом отриманим після фільтрації (вологість осаду становить 60-80%) (від ТП 7.1).

ТП 9. Сушіння

ТП 9.1 Сушіння ендотоксिनного препарату

Отримана пастоподібна фракції після стандартизації препарату (від ТП 8.1), вручну вивантажують із збірника (Р-23) та переносять до сушильної шафи (СШ-24), розподіляють рівномірно товщиною 3 см по всій полиці. Сушіння відбувається за температури 70°C протягом 60-90 хв. Після сушіння даємо охолотитись продукту протягом 10-15 хв.

Знешкодження відходів на даній стадії не передбачено, оскільки сушильна шафа є лабораторною і трубопроводи до неї не під'єднуються. Робота сушильної шафи відбувається шляхом ввімкнення її в розетку та нагрівання теплообмінника і подальшого висушування сировини.

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 10.1. Фасування та маркування висушеного ендотоксिनного препарату

Після охолодження дістаємо полиці з сушильної шафи (СШ-24) та висушений сипкий препарат (від ТП 10.1) висипаємо у збірник для зберігання сипкого продукту (Зб-25). Так як за цикл об'єм препарату занадто малий щоб вмикати фасувальну

машину, адже це не раціонально, тоді ми приймаємо рішення зберігати і наповнювати збірник до 13 кг препарату, тобто включати фасувальну машину 2 раз в 12 циклів. Висушений препарат після накопичення висипаємо вручну в об'ємно ваговий дозатор яким оснащена фасувальна машина (ФМ-26). Запускаємо фасувальну машину (ФМ-26) за допомогою пульта управління, об'ємно ваговий дозатор автоматично відважує по 1 кг продукту (від *ТП 9.1*) та відбувається розсипання у пластикову банку.

Готові розфасовані пластикові банки маркують із зазначення наступної інформації: назва препарату, виробник, дата виробництва, термін зберігання, умови зберігання препарату, інструкція щодо використання та розведення препарату та склад препарату.

Виробничі відходи відправляються на знешкодження (до *ЗВ 11.3*).

ПМВ 10.2. Пакування та відвантаження

Пакування пластикових банок із порошком ендотоксिनного препарату (від *ПМВ 10.1*) у картонні коробки здійснюється вручну. Коробки відвантажуються на склад.

Утворені відходи йдуть на знешкодження (до *ЗВ 11.3*)

ЗВ 11. Знешкодження відходів

ЗВ 11.1. Знешкодження рідких відходів

Фільтрат (від *ТП 7.1*), зливають у каналізацію хімічно-забруднених стоків і далі в цех нейтралізації і очистки промивних стічних вод.

Рідкі відходи (від *ДР 1.2.1*, *ДР 1.2.2*, *ДР 1.3.2*, *ДР 1.3.4*). До рідких відходів відносять – відпрацьовану мильну воду після перевірки на герметичність та відпрацьовану промивну воду після миття дезинфікуючого засобу.

Склад рідких відходів здебільшого представлений неорганічними сполуками, органічними сполуками, залишками мікроорганізмів. Найнебезпечніша сполука серед наведених вище рідких відходів – каустична сода, яка утилізується добавок для сільськогосподарських птахів або для закладання бетону при будівництві.

ЗВ 11.2. Знешкодження газоподібних відходів

Стерильне стиснене повітря, аераційне повітря, (від ДР 1.3.4, ТП 5.5, ТП 6.1, ТП 7.1) які використовуються у виробництві, підготовлене стерильне повітря для вентиляції мікробіологічної лабораторії, та повітря підготовлене для функціонування заводу очищуються на фільтруючих системах та використовуються повторно.

ЗВ 11.3. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи (від ДР 2.2, ДР 2.7, ДР 2.8). До твердих відходів може входити відпрацьоване волокно під час підготовки повітря або відпрацьоване волокно під час процесу аерації.

Бракований пакувальний матеріал збираються в картонні коробки і передаються в загально цеховий збірник-контейнер для браку з наступним направленням відповідні організації для переробки (від ПМВ 10.1, 10.2).

Після закінчення процесу фільтрації раз у неділю перевіряють цільність і придатність фільтрувального матеріалу (від ТП 7.1), при потребі замінюють, а відпрацьований фільтрувальний матеріал вивантажують із модуля тангенціальної фільтрації і направляють в загальноцеховий збірник-контейнер для горючих відходів з наступним направленням на загальнозаводську установку термічного знешкодження відходів виробництва.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТУ

9.1. Доферментаційна ділянка виробництва

9.1.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль включає в себе:

- ✓ забезпечення та підтримання умов, яких потребує для нормальної життєдіяльності мікроорганізм-продуцент;
- ✓ контроль виробничого процесу та готової продукції;
- ✓ вчасне виявлення контамінації та встановлення причини або джерела її появи [89].

Під час процесу культивування біологічного агенту, періодично відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю – для визначення концентрації біомаси і цільового продукту, а також вмісту джерела вуглецю (кукурудзяний крохмаль), азоту (амонійні солі), визначення білку та ларвіцидної активності.

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем і подальшим мікроскопіюванням.

Відібрану пробу культуральної рідини з ферментера, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА).

Опис колонії має наступний вигляд: круглясті, світло-білого кольору, плоскі, матові, злегка волнистим опушеними краями [20].

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.	Петренко О.В				РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва			Літ.	Аркуш	Акрушів	
Перевір.	Ключка Л.В									145	22
Консультан.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.	Пирог Т.П.										



Рис.9.1 Ріст *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* на МПА [90].

Для мікроскопіювання використовують препарат – «роздавлена крапля». На предметне скло наносять краплю водопровідної води і поміщають в неї невелику кількість клітин мікроорганізмів які були вирощені на щільному живильному середовищі за допомогою бактеріологічної петлі. Потім це все розмішують і накривають покривним склом і розглядають з об’єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою 90х.

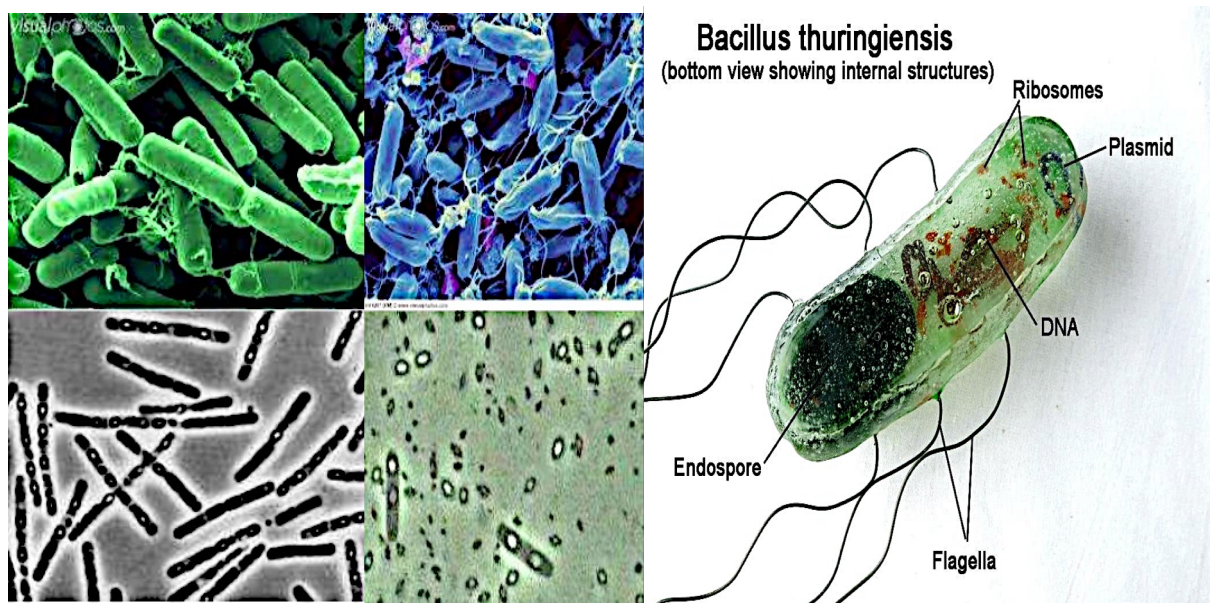


Рис. 9.2 Мікроскопіювання та морфолого-культуральні ознаки *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* [91].

При потребі перед мікроскопією звичайного препарату роблять препарат з фарбуванням за Грамом. Для кращого підтвердження чистоти культури:

1. Приготування фіксованого мазка на полум'ї пальника. Фіксований мазок забарвлюють генціанвіолетом протягом 1-2 хв, надлишок барвника зливають.
2. Обробляти препарат розчином Люголю протягом 1-2 хв до почервоніння та промити водою
3. Занурити мазок у стакан з 96% етиловим спиртом на 10-30 сек. Знебарвлення вважають закінченим, коли краплі, що стікають з мазка, вирівнюються з кольором зі спиртом у склянці. Потім промити препарат водою (під час мікроскопіювання таких препаратів грамнегативні бактерії безбарвні).
4. Виконати дофарбування препарату фуксином 1-2 хв, промити водою, підсушити, розглянути в мікроскоп з імерсією.

У препараті повинні бути лише грампозитивні клітини які фарбуються у фіолетовий колір [92].

9.1.2. Визначення концентрації біомаси

Так як поживне середовище має в своєму складі кукурудзяну муку та кормові дріжджі, дуже важко визначити концентрацію біомаси за оптичною густиною клітинної суспензії. Тому раціональніше культуральну рідину відстоїти (для осадження частинок кукурудзяної муки), декантувати, верхній шар декантату використовують для вимірювання оптичної густини на фотоелектрокалориметрі за довжини хвилі 600 нм з наступним перерахунком на суху біомасу за калібрувальним графіком [93].

Визначення титру клітин (концентрації клітин). Метод Коха [92]:

1-ий етап: відбір проби з ферментера.

2-ий етап: приготування серії розведень (ступінь розведення залежить від кількості КУО в 1 мл досліджуваного препарату).

3-ий етап: посів обраних обсягів досліджуваного матеріалу (100, 10, 1 мл) і його розведень по 1 мл в рідку живильне середовище. Для підвищення точності методу кожен обсяг може паралельно засіватися в кілька порцій живильного середовища

(двох-, трьох-, п'ятирядний посів). Оптимальним є триразове повторення (достатня достовірність при порівняно невеликій вартості).

4-ий етап: облік наявності зростання на рідкому поживному середовищі і висів з позитивних обсягів на щільну живильне середовище, по 0,1 мл мікробної суспензії висівають на чашки Петрі з поживним середовищем (МПА або рибним агаром). Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища шпателем Дрігальського до повного вбирання (висихання) суспензії. Чашки закривають і поміщають перевернутими догори дном в термостат для інкубації. Посіви інкубують при температурі $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ протягом 12 - 24 год.

5-ий етап: ідентифікація мікроорганізмів, які вирости на щільному живильному середовищі. При цьому враховуються культуральні властивості і при необхідності проводяться додаткові дослідження (вивчення тинкторіальних, морфологічних, біохімічних і серологічних властивостей).

Якщо використаний однорядний метод, як правило, результат виражається у вигляді титру шуканого мікроорганізму, за який приймається найменший обсяг (найбільше розведення), в якому ще він був виявлений.

Якщо був використаний багаторядний метод, облік результатів проводиться за допомогою спеціальних таблиць, що дозволяють по комбінації позитивних обсягів, що дали ріст, визначити титр, індекс (НВЧ) [92].

9.1.3 Виділення і очищення δ -ендотоксину

Взяту пробу з ферментеру об'ємом 50 мл що містить біомасу *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23, яка містить кристали ендотоксинів і спори продуцента, відмивають від компонентів живильного середовища і водорозчинних токсинів. Для цього біомасу суспендують в дистильованій воді, потім центрифугують при 3000 об/хв протягом 15 хв. Супернатант, що містить водорозчинні токсини, відкидають. Осад ресуспензують і знову центрифугують при 500 об/хв. При цьому осаджують елементи твердого живильного середовища, а супернатант містить спори і кристали. Очищення повторюють. Ступінь очищення споровокристалічних комплексів оцінюють за допомогою світлової мікроскопії. Кристали відокремлюють від спор послідовно, шляхом флотації та екстракції в двухфазній системі: хлороформ

- водний розчин Na_2SO_4 . Для цього до очищається суспензії додають рівний об'єм чотирьохлористого вуглецю та 1% -ний Na_2SO_4 , з розрахунку 7 мл на кожні 10 мл суспензії. Суміш інтенсивно перемішують механічною мішалкою до утворення стійкої емульсії і залишають розшаровуватися. Після розшаровування ретельно відбирають водну фазу, що містить в основному кристали. Останню процедуру повторюють двічі. Чистоту суспензії кристалів контролюють під мікроскопом - вона містила менше 1% спор.

До отриманої суспензії додають рівний об'єм хлороформу, інтенсивно перемішують до утворення стійкої емульсії і залишають до повного розшарування. Верхня каламутна (водна) фаза містить кристали і практично позбавлена від спор. Концентрацію отриманої суспензії визначають спектрофотометричним методом (Штерншіс, 1976). Вихід кристалів від початкової кількості становить близько 20%.

Лужний гідроліз кристалів здійснюють за методикою Кукси (Cooksey, 1968). Для цього 6 мг кристалів розчиняють при постійному перемішуванні в 3 мл 0,04 н NaOH протягом 1 год при 30°C . Після цього не розчинний матеріал осаджують центрифугуванням при 5000 г протягом 20 хв. До надосадової фази по краплям при постійному перемішуванні додають концентровану оцтову кислоту до досягнення рН 4,4. Суміш залишають на 30 хв при 0°C для остаточного формування осаду, який видаляють центрифугуванням протягом 15 хв при 8000 об/хв.

Лужний розчин дельта-ендотоксину піддають діалізу і доводять дистильованою водою до необхідної концентрації, потім знижують рН до 7,8 обережним титруванням 0,1 н HCl .

Доочищення і стерилізацію дельта-ендотоксину здійснюють мікрофільтрацією (діаметр пор 0,4 мкм). У всіх експериментах використовують свіжеприготовлені розчини кристалів [94].

9.1.4. Визначення загального білка

Кількість білка в усіх препаратах (ферментних, ендотоксинових) визначають за загальноприйнятим і найбільш точному методу Лоурі (Lowry, 1957).

Для цього до 0,2 мл розчину білка, що містить близько 1 мг / мл білка, додають 4 мл свіжоприготованого розчину, що містить 50 частин 2% Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH і 1

частина 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% Na, К-тарtratі і витримують протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім додають 0,4 мл розбавленого в співвідношенні 1:1 стандартного реактиву Фоліна і інкубують 10 хв при 37°C для розвитку забарвлення, охолоджують водою і спектрофотометріують при 750 нм. Кількість білка визначають за калібрувальним графіком, для побудови якого використовують розчини відомої концентрації сироваткового бичачого альбуміну.

Реактив Фоліна готують наступним чином. У круглодонну колбу на 1000 мл поміщали 350 мл дистильованої води, 50 г натрію вольфрамівокислого двухводного і перемішують до повного розчинення шляхом встряхування. До отриманого розчину додають 25 мл 85% ортофосфорної кислоти і 50 мл концентрованої соляної кислоти. Колбу встановлюють на піщаній бані, закривають пробкою, забезпеченою зворотним холодильником і суміш кип'ятять протягом 10 год. До отриманої суміші додають після кип'ятіння 75 г літію сірчанокислого, 25 мл дистильованої води і 3 краплі бромиду та продовжують кип'ятіння без зворотного холодильника протягом 15 хв. Приготовану суміш охолоджують до кімнатної температури, додають воду до досягнення кінцевого обсягу 500 мл і фільтрують через паперовий фільтр. Концентрацію кислоти в фільтраті доводять до 1 н, додаючи дистильовану воду, в кількості, розрахованому за результатами титрування фільтрату 0,1 н NaOH в присутності фенолфталеїну [94].

9.1.5. Визначення ларвіцидної активності

Ларвіцидну активність визначають по LK_{50} (концентрація числа спор/мл, викликаючи 50% гибель тест-об'єкта при вільному споживанні личинками спор і кристалічного ендотоксину із водної суспензії препарату).

Спочатку готували водяну суспензію в п'яти концентраціях, забезпечуючий від 10 до 96% гибелі тест-об'єкта. Так, наприклад, для отримання 1%-ної концентрації суспензії зміщували 1 мл культуральної рідини (КР) з 99 мл водопровідної води і ретельно встряхували протягом 2-х хвилин. Рецептuru використаних в дослідях розведень при початковому титрі бактерій штаму *BTH₁₄* 4×10^9 спор/мл КР приведена в табл. 9.1 [20].

Таблиця 9.1

Рецептура розведень КР			
№	КР (мл) + вода (мл)	% суспензії	Кількість спор/мл
1	1+99	1,0	4×10^7
2	1+99	0,01	4×10^5
3	5+95	$0,5 \times 10^{-3}$	20×10^3
4	50+50	$0,25 \times 10^{-3}$	10×10^3
5	25+75	$0,125 \times 10^{-3}$	5×10^3
6	12,5+87,5	$0,06 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^3$
7	6,25+93,75	$0,03 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^3$

Всі розведення готувались на відстійній водопровідній воді. Дослід ставили на чашках Петрі з 50 мл водяної суспензії культуральної рідини, куди поміщали по 25 личинок комарів роду *Bradysia pilistriata* Frey. (Sciaridae), а також в скляних банках ємкістю 250 мл з 100 мл суспензії, куди поміщали по 25 личинок комарів роду *Anopheles*. В дослідах використовували дози: 20,0; 10,0; 5,0; 1,25 тисяч спор/мл суспензії. В якості корму в кожен чашку чи банку добавляли по 2 краплини 5% водяної суспензії кормових дріжджів. В контролі личинок підсаджували у відстійну воду без препарату. Чашки і банки поміщали в термостат при температурі 28°C на 24 години, після чого враховували гибель личинок комарів.

Гибель личинок комарів для кожного штама по кожному варіанту розведень КР визначали з урахуванням гибелі личинок в контролі по формулі:

$$\text{Гибель личинок (\%)} = (M_0 - M_k) K_{\text{вих}} \times 100, \text{ де} \quad (9.1)$$

M_0 – гибель личинок в досліді (середнє значення),

M_k – гибель личинок в контролі (середнє значення),

$K_{\text{вих}}$ – вихідна кількість личинок в досліді (середнє значення).

Отриманні дані використали для визначення ЛК₅₀ (доза, яка викликає 50% гибелі личинок).

Значення ЛК₅₀ розраховують по формулі Кербера:

$$\lg \text{ЛК}_{50} = \lg C_m - \delta(\Sigma L_1 - 0,5), \text{ де:} \quad (9.2)$$

C_m – максимальна концентрація дослідної суспензії культуральної рідини в тис. клітин (в даному випадку 20 тис. кл.);

δ – логарифм кратності розведень (логарифм відношення кожної попередньої концентрації до наступної);

ΣL_1 – сума відношень числа личинок, загинувших від даної концентрації до загального числа личинок, які зазнали впливу цієї концентрації (з урахуванням правки на гибель личинок в контролі) [20].

9.1.6. Визначення концентрації амонійного азоту

Джерелом амонійного азоту в середовищі для культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*–7-1/23 є $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, до складу якого входить амоній.

Суть методу. Концентрацію амонію визначали за допомогою іонної хроматографії. Використання іонної хроматографії в якості потенційного методу для аналізу розчинних у воді аніонів (наприклад, хлориду, сульфату, нітрату, нітриту, броміду і фториду) і катіонів (наприклад, літію, кальцію, натрію, калію, амонію) в інших суспензіях або рідинах представляє відмінна альтернатива звичайним гравіметричним методами, які широко використовуються. Відповідні хроматографіческие колонки і елюентом використовуються для аналізу розчинних у воді аніонів та катіонів в бетоні.

Іонна хроматографія - це точний, довговічний метод, який дозволяє користувачеві швидко виконувати аналіз, коли зразки знаходяться в іонній, гомогенної формі. Для аналізу потрібно лише дуже невелика кількість проби, а кількісні результати отримані протягом декількох хвилин [95].



Рис. Іоннообмінний хроматограф 861 Advanced Compact Ion Chromatography [90] та колонки для іонної хроматографії IC YK-421 [96]

Техніка визначення. Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 3000 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію при кімнатній температурі фільтрували через 0,2 мкм-фільтр перед визначенням концентрації амонію з використанням 861 Advanced Compact Ion Chromatography (Metrohm, Herisau, Швейцарія). Використовуваний катіонний елюент складав 4 мМ H_3PO_4 з 5 мМ 18-краун 6-ефіром. Стовпчастий стовпчик являв собою IC YK-421 (Shodex, Токіо, Японія), а стовпчик охорони - IC-YK-G (Shodex). Стандартний розчин амонію готували з $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; концентрацію доводять до 1000 частин на мільйон (ppm) і розбавляють до відповідних концентрацій для отримання стандартної кривої [97].

9.1.7. Визначення джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*-7-1/23 є кукурудзяна мука, до складу якої входить вуглеводи. Кількість вуглеводів (крохмаль, фруктоза і глюкоза), що входять до складу кукурудзяної муки визначають за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (варіант рідинної хроматографії) [98].

Суть методу. Колонки Aminex HPLC заповнені матрицею на основі полімеру (полістирол дівінілбензол). Вони поділяють з'єднання з використанням методу іонної помірною розподільної хроматографії. Колонки аналізу вуглеводів Aminex поділяють

сполуки, використовуючи комбінацію механізмів виключення розміру і обміну лігандами [98].

- При відділенні олигосахаридов виключення за розміром є основним механізмом. Смоли з низьким ступенем зшивання дозволяють вуглеводів проникати, а олигосахариди поділяються за розміром
- Для поділу моносахаридів обмін лігандами є основним механізмом і включає зв'язування гідроксильних груп цукрів з фіксованим протиіоном смоли. Ліганд обмін залежить від природи протііона (Pb^{2+} , Ca^{2+} , і т.д.), так і просторової орієнтації гідроксильних груп вуглеводних

Колонки Aminex дозволяють використовувати прості ізократіческіе методи, елюючи водою чи розведеною кислотою. Приготування проби мінімально, зазвичай тільки фільтрація через фільтр 0,45 мкм без необхідності дериватизації. Носії Aminex володіють стабільністю при високому тиску, стабільністю рН і високою ефективністю і селективністю колонки.

Колонки Aminex є промисловим стандартом для аналізу вуглеводів. Bio-Rad пропонує повну лінійку колонок для аналізу вуглеводів, оптимізованих для забезпечення високої селективності для певного класу вуглеводів або вуглеводів. Колонки з довжиною дослідження (300 мм) забезпечують поділ складних вуглеводневих сумішей з високим дозволом приблизно за 20 хвилин, а більш короткі колонки забезпечують ефективний розподіл певних вуглеводів за 3-5 хвилин. Використовуйте наше керівництво по вибору, щоб вибрати стовпець, який відповідає потребам вашої програми.

Колонка Aminex HPL-87H

Ця воднева колонка розміром 300 x 7,8 мм використовується для аналізу вуглеводів в розчині з карбоновими кислотами, летючими жирними кислотами, коротко жирних кислот, спиртами, кетонами і багатьма нейтральними побічними продуктами метаболізму. Ця колонка, найбільш часто використовувана для аналізу органічних кислот, також корисна для моніторингу ферментації, аналізу біологічної рідини і поділу ацетильованого аміноцукри [99].



Рис. 9.3. Високоєфективний рідинний хроматограф HPLC-sistema-LC-20-Prominence (ліворуч) [94], колонка Aminex HPX-87H (праворуч)[100].

Техніка визначення. У колбу на 100 мл додають 50 мл відібраної проби з ферментера культуральної рідини. В пробу додають 15 мл 72%-ї сірчаної кислоти, ретельно перемішують і ставлять на 1 годину в термостат при температурі 30°C. У присутності кислоти відбувається гідроліз крохмалю до моносахариду глюкози. Через 1 годину до проби додають дистильовану воду об'ємом 420 мл таким чином розводячи пробу та ставлять на 20 хвилин до автоклаву при температурі 120°C.

Відфільтровану рідину, отриману після кислотного гідролізу, аналізували на колонці ВЕРХ (Bio-Rad Aminex HPX-87H). Для ВЕРХ аналіз, 20 мкл зразків вводили при температурі 63°C і швидкість потоку 0,6 мл/хв (елюент 4 мМ H₂SO₄). Крохмаль, фруктозу і глюкозу детектували за допомогою детектора показника заломлення (RI). Калібрувальна концентрація перебувала в діапазоні від 0,1 до 0,8 г.Л⁻¹ за кожен цукор. Лінійність r² для всіх цукру було більше 0,99 [98].

9.2. Післяферментаційна ділянка виробництва

Під час процесів виділення і очищення ларвіцидного ендотоксिनного препарату необхідно контролювати технічні і хімічні параметри, зокрема температуру, концентрацію допоміжних речовин, тиск під час фільтрації тощо. Карту постадійного контролю післяферментаційних процесів наведено у табл 9.2.

Готовий порошок ларвіцидного ендотоксिनного препарату контролюють за такими показниками як визначення масової частки вологи, контроль зовнішнього вигляду, контроль масової частки частинок та ларвіцидна активність.

9.2.1. Визначення масової частки вологи

Визначення масової частки вологи проводять по ГОСТ Р 54951 методом висушування до постійної маси при температурі від 100°C до 105°C.

Масова частка вологи порошкового препарату не повинна перевищувати 7,0 % [101].

9.2.2. Контроль зовнішнього вигляду і кольору

Зовнішній вигляд і колір ларвіцидного ендотоксинового препарату визначають візуально по кожній одиниці упаковки вибірки при відборі точкової проби.

Візуально: однорідний порошок від світло-сірого до світло-коричневого кольору [101].

9.2.3. Визначення масової частки частинок

Метод заснований на визначенні за допомогою сита масової частки частинок розміром понад 90 мкм [101].

Апаратура і матеріали:

- електрошафа сушильний загального призначення;
- ваги лабораторні загального призначення 2-го або 3-го класу точності;
- сито з сіткою № 009;
- стакан місткістю 600 см³;
- паличка скляна з гумовим наконечником;
- трубка медична гумова з внутрішнім діаметром 8-14 мм;
- вода питна.

Проведення випробування

Ларвіцидний ендотоксинний препарат масою від 10 до 20 г зважують з точністю до 2-го знаку після коми, поміщають в стакан при безперервному помішуванні скляною паличкою, доливають невеликими порціями (по 2-5 см³) 400 см³ води. Потім вміст склянки виливають на сито з сіткою № 009. Сито попередньо висушують при температурі від 100°C до 105°C до постійної маси і зважують з точністю до 2-го знаку після коми. Похитуючи сито, промивають залишок слабким струменем води протягом 10 хв. При промиванні залишку воду направляють за допомогою гумової трубки на відстані не більше 5 см від поверхні сітки. Потім сито висушують при

температурі від 100°C до 105°C до постійної маси. Постійна маса вважається досягнута, якщо різниця між двома наступними зважуваннями не перевищуватиме 0,1 г [101].

Обробка результатів

Масову частку частинок розміром понад 90 мкм $X_1, \%$, обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{M_1 \cdot 100}{M} \quad (9.3)$$

де M_1 – маса залишку на ситі, г;

M - маса наважки, г.

Обчислення проводять із точністю до 0,1%. За остаточний результат приймають середнє арифметичне значення результатів двох паралельних визначень, розбіжність між котрими не повинно перевищувати 10% по відношенню до більшого числа [101].

9.2.4. Дослідження ларвіцидної активності препарату

Визначення біологічної активності Бактокуліцид проводять на личинках комарів *Bradysia pilistriata* Frey. (Sciaridae). Метод заснований на визначенні концентрації препарату, що викликає 50%-ну загибель тест-об'єкта при вільному поглинанні личинками суперечка і ендотоксину з водної суспензії препарату [101].

Проведення випробування

Готують водну суспензію ларвіцидного ендотоксिनного препарату в п'яти концентраціях: 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 мг/л, що забезпечує від 95% до 100% загибелі тест-об'єкта. Кожну концентрацію слід розглядати в трьох повторностях.

Суспензію готують наступним чином: наважка препарату масою 1 г, зважену з точністю до 3-го десяткового знака, поміщають в колбу подрібнювачі, наливають 50 см³ стерильної водопровідної води і перемішують протягом 2 хв при 3 тис. об/хв, після чого в колбу наливають не більше 100 см³ стерильної води і знову суміш перемішують.

З отриманого розведення, що містить 10 мг/мл препарату, готують розведення S-1 (10⁻¹), для чого до 10 см³ суспензії додають 90 см³ стерильної води і перемішують. З отриманого розведення (S-1), що містить 1 мг/см³ препарату, готують розведення (S-2) і (S-3) у такий спосіб:

- (S-2) або (10^{-2}) - до 1 см^3 суспензії препарату з розведення (S-1) додають 99 см^3 стерильної води і перемішують;

- (S-3) або (10^{-3}) - до 40 см^3 суспензії препарату з розведення (S-2) додають 360 см^3 отстойної водопровідної води і перемішують.

З розведення (S-3), що містить $0,001 \text{ мг/см}^3$ чи 1 мг/л препарату, готують такі розведення:

- $0,5 \text{ мг/л}$ - 75 см^3 (S-3) + 75 см^3 води;

- $0,25 \text{ мг/л}$ - $37,5 \text{ см}^3$ (S-3) + $112,5 \text{ см}^3$ води;

- $0,125 \text{ мг/л}$ - $18,7 \text{ см}^3$ (S-3) + $131,3 \text{ см}^3$ води;

- $0,06 \text{ мг/л}$ - $9,3 \text{ см}^3$ (S-3) + $140,7 \text{ см}^3$ води.

Для проведення випробування в три чашки Петрі наливають по 50 см^3 відповідного розведення препарату і поміщають в кожену по 25 личинок, намагаючись при цьому не додавати зайву воду. У кожену чашку додають від $0,1$ до $0,2 \text{ см}^3$ 5% -ної водної суспензії сухих кормових дріжджів. Одночасно з досвідом ставлять контроль в трьох повторностях, використовуючи замість суспензії препарату відстійну воду. Чашки закривають кришками і залишають при температурі $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ і відносній вологості 70% на 24 год, після чого виробляють облік загибелі личинок.

Гибель личинок комарів для кожного штама по кожному варіанту розведень визначали з урахуванням гибелі личинок в контролі по формулі:

$$\text{Гибель личинок (\%)} = (M_0 - M_k) K_{\text{вих}} \times 100, \text{ де} \quad (9.4)$$

M_0 – гибель личинок в досліді (середнє значення),

M_k – гибель личинок в контролі (середнє значення),

$K_{\text{вих}}$ – вихідна кількість личинок в досліді (середнє значення).

Отриманні дані використали для визначення ЛК_{50} (доза, яка викликає 50% гибелі личинок).

Значення ЛК_{50} розраховують по формулі Кербера:

$$\lg \text{ЛК}_{50} = \lg C_m - \delta (\Sigma L_i - 0,5), \text{ де:} \quad (9.5)$$

C_m – максимальна концентрація дослідної суспензії культуральної рідини в тис. клітин (в даному випадку 20 тис. кл.);

δ – логарифм кратності розведень (логарифм відношення кожної попередньої концентрації до наступної);

ΣL_1 – сума відношень числа личинок, загинувших від даної концентрації до загального числа личинок, які зазнали впливу цієї концентрації (з урахуванням правки на гибель личинок в контролі).

Результати визначення LK_{50} висловлюють в міліграмах на літр препарату. LK_{50} випробуваного зразка ларвіцидного ендотоксинового препарату має бути в межах $(0,26 \pm 0,02)$ мг препарату на 1 л води [101].

9.3 Карта контролю

Таблиця 9.2

Карта контрольних точок виробництва ларвіцидного ендотоксинового препарату

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
Кх 1.1.1 <i>Приготування розчину каустичної соди</i>	Розчин каустичної соди Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчинів	C = 2%
Кх 1.1.2 <i>Приготування робочого розчину Лойран – про 13</i>	Розчин Лойран – про 13 Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчинів	C = 2%
Км Кх 1.2.1 <i>Щоденне прибирання</i>	Підлога, стіни Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль згідно пункту 9.1 цього розділу	Після прибирання	КУО < 300/см ² C = 2%
Км Кх 1.2.2 <i>Генеральне прибирання</i>	Підлога, стіни Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль згідно пункту 9.1 цього розділу	Після прибирання	КУО < 800/см ² C = 2%
Кт 1.3.1 <i>Миття обладнання</i>	Обладнання та комунікації Температура мийного розчину	Термометр	Під час миття	t = 70-80°C

Продовження таблиці 9.2

Кт 1.3.2 Ополіскування обладнання	Обладнання та комунікації Час ополіскування	Годинник	Після миття	T = 30 хв
Кт 1.3.4 <i>Перевірка на герметичність</i>	Обладнання та комунікації Тиск, час перевірки, герметичність обладнання	Годинник, манометр	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,2 МПа, t = 60 хв
Кт Км ДР 1.3.5 <i>Стерилізація обладнання</i>	Обладнання та комунікації Температура та час стерилізації, мікробіологічний контроль	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 9.1 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації	t = 130-135°C, T = 60 хв, відсутність мікробіоти
Кт 2.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	Повітря на виході з фільтру грубого очищення Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 80%
Кт 2.3 <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря Температура, тиск	Термометр, манометр	Вимірюється після стиснення	t = 125-130°C, P = 0,35 МПа
Кт 2.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охолоджене повітря Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після охолодження та видалення зайвої вологи	t = 25-30°C, w = 60-70%

Продовження таблиці 9.2

Кт 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після нагрівання	t = 50°C, w = 50%
Кт 2.6 <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 95%
Кт, Км 2.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Після проходження через фільтр	E = 99,99%, відсутність мікробіоти
Кх 3.1 <i>Приготування розчину 6 % соляної кислоти</i>	Розчин 6 % соляної кислоти Концентрація		Перевірка концентрації	C=6 %
Кт, Км, Кх 3.2, 3.3 <i>Приготування розчину 6 % їдкого натру</i>	Розчин 6 % їдкого натру Температура, час, концентрація, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації, Перевірка концентрації	t= 131 °C, τ= 30 хв, C=6 %, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 9.2

Кт 4.1.1, 4.2.1, 4.3.1 <i>Заварювання композиції А</i>	Композиція А Температура, час	Термометр, годинник	Температура визначається безперервно під час заварювання	t= 80 °С, τ= 15 хв
Кт, Км 4.1.2, 4.2.2, 4.3.2 <i>Стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 30 хв, Р=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.2.3, 4.3.3 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, рН доводять після додавання солей, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, рН = 4,0, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 9.2

Кт, Км 4.1.4 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> –7-1/23 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій, температура, час	Мікробіологічний контроль, термометр	Температура контролюється під час зберігання в холодильнику, мікробіологічний контроль та пересіви проводять кожні 3 місяці	Відсутність сторонньої мікробіоти, підтримання температури t = 4°С, τ= 3 місяці
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Колекційна культура <i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i> –7-1/23 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій, температура, час	Мікробіологічний контроль, термометр, годинник	Мікробіологічний контроль проводять кожні 5-6 годин	Відсутність сторонньої мікробіоти, t = 30°С, τ= 24 год

Продовження таблиці 9.2

Кт, Км 5.3 <i>Вирощування культури на агаризованих середовищах</i>	Ізольовані колонії <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i>–7-1/23 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, час	Мікробіологічний контроль, годинник	Мікробіологічний контроль проводять кожні 5-6 годин	Відсутність сторонньої мікробіоти, $\tau = 24$ год
Кт, Км 5.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	$t = 28 \pm 2$ °C, $\tau = 24$ год, $\omega = 220-250$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.5 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л</i>	Посівний матеріал , тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 5-6 годин	$t = 28 \pm 2$ °C, $\tau = 24$ год, $\omega = 220-250$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт 7.1 <i>Фільтрування культуральної рідини</i>	Культуральна рідина Температура, час, тиск, діаметр пор мембрани	Термометр технічний, манометр, годинник, перевірка діаметру пор згідно паспорту мембрани	Під час процесу фільтрації	$\tau = 30$ хв $d_{\text{пор}} = 0,2$ мкм $P = 0,1$ МПа $t = 20^{\circ}\text{C}$
Кт 8.1 <i>Внесення наповнювачу та прилипачу</i>	Вологий осад Оберти мішалки, точність зважування, час	Технічні ваги, таймер, датчик обертів	Під час процесу проведення операції	$n = 30$ об/хв $\tau = 10$ хв
Кт 9.1 <i>Сушіння ендотоксिनного препарату</i>	Стандартизований ендотоксин Температура, час, тиск	Таймер, датчик вологості, датчик температури	Під час процесу сушіння	$t = 70^{\circ}\text{C}$ $\tau = 60$ хв $W = 5\%$
Кт 10.1 <i>Фасування висушеного ендотоксिनного препарату</i>	Висушений порошковий препарат Маса для фасування, точність дозування, упаковка, цілісність, якість маркування	Об'ємно ваговий дозатор, візуальний огляд	Маса встановлюється перед процесом фасування	$m = 1$ кг $q = 0,5\text{-}2\%$. $N = 4\text{-}6$ уп./хв.

РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЛАРВІЦИДНОГО ЕНДОТОКСИНОВОГО ПРЕПАРАТУ

10.1. Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати масу пектину із яблучного жому, що надходить в апарат, яка має значення 75,9 г. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

У другому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати масу NaCl, що надходить в апарат, яка має значення 1948,1 г. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М1 відбувається перемішування в речовини в апараті із заданою частотою обертів.

У третьому контурі автоматичного контролю і управління, в сушильній шафі необхідно контролювати і регулювати температуру, яка має регламентоване значення 70⁰С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок дії нагрівача присторою.

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати вологість продукту, щоб знати коли закінчити процес. Вологість кінцевого продукту має регламентоване значення 5%. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві.

					НУХТ БТЕК 04.01.25 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Петренко О.В			РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва ларвіцидного ендотоксину препарату	Літ.	Аркуш
Перевір.							167
Консультант.		Клименко О.М					3
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Затверд.		Пирог Т.П					

Таблиця 10.1

Технологічні вимоги до системи автоматизації

№ п/п	Машина, апарат, агрегат	Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації		
				Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Збірник	Загрузка пектину із яблучного жому в апарат	75,9 г	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
2		Загрузка NaCl в апарат	1948,1 г	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
3		Оберти перемішуючого пристрою	30 об/хв	Контроль, управління	Покази	Керування двигуном (дискретне)
4	Сушильна шафа	Температура	70°C	Контроль Регулювання	Покази, реєстрація, стабілізація	АРМ оператора Вмикання/вимиканн я нагрівача пристрою
5		Рівень вологи	5%	Контроль	Покази, реєстрація, сигналізація	АРМ оператора

СПЕЦИФІКАЦІЯ ЗАСОБІВ АВТОМАТИЗАЦІЇ

Таблиця 10.2

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1а 2а	Маса	По місцю	Конвеєрні ваги, продуктивність до 50т/год, максимальна швидкість стрічки до 2,0м/с, чутливий елемент – тензодатчики, працює з інтегратором	Milltronics MLC	Siemens
1б 2б	Маса	На щиті	Інтегратор для роботи з стрічковими вагами, вихідний сигнал 4-20мА	Milltronics BW100	Siemens
KM1	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В	3RT2015-1AP01	SIEMENS
SA1	Перемикач	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210-2DA11	SIEMENS
SB1	Перемикач	На щиті	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato
3а	Температура	В агрегаті	Датчик термоперетворювач опору діапазон (-40 ...+180)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	TCM-100	ООО "ФИРМА КОНТРАГЕНТ, Україна
3б	Температура	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
4а	Вологість	По місцю	Ємнісний датчик відносної вологості, діапазон вимірювань 0...100%, клас точності 2, показник інерції 2хв	ДВ УТ-02-НІН	ПАО „Тера”, Україна

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пати́ка Т.І., Бойко М.В., Пати́ка М.В. Біотехнологічна поліфункціональність метаболітного споро-кристалічного комплексу та особливості культивування *Bacillus thuringiensis* // Мікробіол. журн. – 2017. – Т. 79, № 2, с. 78-85.
2. Пати́ка Т.І. *Bacillus thuringiensis* у мікробіологічному контролі чисельності комах – Умань, 2010.
3. Myhalchenko M.B., Galkin O.Yu., Dugan O.M. Особливості біотехнології отримання ентомопатогенного препарату на основі *Bacillus thuringiensis*. // MOTROL. – 2011. – Т.13В, с. 49–55.
4. Кривицька Т.М., Багаєва О.С., Ужєвська С.П., Непом'яца Н.М., Іваниця В.О. Характеристика штамів бактерій роду *Bacillus* з ларвіцидною активністю до грибних комариків *Bradysia Pilistriata* Frey (*Sciaridae*)//Мікробіологія і біотехнологія – 2010. – №3 – С. 86 – 94.
5. Кривицька Т.М., Багаєва О.С., Ужєвська С.П., Непом'яца Н.М., Іваниця В.О. Методи оцінки ентомоцидної активності мікроорганізмів щодо личинок грибного комарика (*Sciaridae*)//Мікробіологія і біотехнологія – 2010. – №4 – С. 96 – 108.
6. Буценко Л.М., Конон А.Д. Технології біопрепаратів для ветеринарної і сільського господарства. – Київ: НУХТ, 2014. – с. 106.
7. Патыка Т. И., Патыка Н. В., Патыка В. Ф. Энтомоцидная и лаврицидная активность *Bacillus thuringiensis* // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія біологія. – 2009. – No25. С.8-12.
8. Пат. 2033721 Российской Федерации. Штамм *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* для получения биоинсектицида. Шевцов В.В., Щелокова Е.В., Жиглецова С.К. – Оpubл. 30.04.1995. – 4 с.
9. Добрица А.П., Корецкая Н.Г., Гайтан В.И., Коломбет Л.В., Дербышев В.В., Жиглецова С.К. Разработка биопестицидов против колорадского жука // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2001. – Т. XLV. – No5-6. – С. 174–184.
10. Grochulski P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R.

- Brousseau, M. Cygler, Bacillus thuringiensis Cry1Aa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation, Journal of Molecular Biology, 1995, 254: 447–464.*
11. *Arthur I. Aronson, Yechiel Shai. Why Bacillus thuringiensis insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiology Letters – No195, 2001. – P. 1–8.*
 12. *Krieg A. Bacillus thuringiensis Berliner. Monograph N103; Paul Parey. Berlin-Hamburg, 1961. – 67 p.*
 13. *Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 589 с.*
 14. *Hofmann C., P. Luthy, Binding and activity of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin to invertebrate cells, 1986, Arch. Microbiology, 146: 7–11.*
 15. *Hofmann C., P. Luthy, R. Hutter, V. Pliska, Binding of the delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis to brush-border membrane membrane vesicles of the cabbage butterfly (Pieris brassicae), 1988, European Journal of Biochemistry, 173: 85–91.*
 16. *Ihara H., E. Kuroda, A. Wadano, M. Himeno, Specific toxicity of d-endotoxins from Bacillus thuringiensis to Bombyx mori, 1993, Bioscience, Biotechnology, Biochemistry, 57: P. 200–204.*
 17. Gnatrol [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.ebay.com>
 18. Вирощування печериць [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://homebiznes.in.ua>
 19. Пат. UA 60591. Спосіб випробування інсектицидної дії препаратів на грибних комариків/*В.О. Іваниця, О.С. Багаєва, С.П. Ужєвська, Н.М. Непомняща*
 20. Пат. № 2 539 732 С2 РФ. Штамм *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* 7-1/23А, используемый в качестве средства для получения препарата с ларвицидной активностью против комаров. *Тихонович I.A., Ермолова В.П., Гришечкина С.Д., Романова Т.А.* – Опубликовано 27.01.2015. Бюл. №30.
 21. Пат. № 312114 А01N 63/00. Способ получения биопрепарата против вредителей сельскохозяйственных культур. *Сагитов А. О., Дуйсембеков Б.А, Успанов А.М., Макаров Е.М., Баймагамбетов Е.Ж.* – Опубликовано: 15.06.2016. Бюл. №6.

22. Пат. № 2 514 023 РФ. Штамм *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* N 25 в качестве средства комплексного воздействия на вредных жесткокрылых насекомых и фитопатогенные грибы. Кандыбин Н.В., Смирнов О.В., Барбашова Н.М. – Опубликовано 27.04.2014. Бюл. №12.
23. Черенков М.С, Багаева Н.А., Джуртубаева Л.О., Багаева О.С. /Біологічні властивості ларвіцидних бактерій *Bacillus thuringiensis* Л-14/ Вісник ОНУ, Том 8, випуск 1, 2013, УДК 579.22.238
24. Васильев Д.А, Архипова Г.Ф., Николайчук Л.Ф./Бактерии *Bacillus cereus* и межвидовая рекомбинация с *Bacillus anthracis* как угроза здоровью человека/Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Научно-исследовательский инновационный центр по микробиологии и биотехнологии Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии / УДК 616.981.51 ББК П 873.2 Б 19 /Ульяновск 2013.
25. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія/ Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – ст: 102-354
26. De Vos, P. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer (2009).
27. Хімічний інсектицид «Актеллик» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://klioma-servise.in.ua>
28. Хімічний інсектицид «Дімілін» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tdnasinnya.com>
29. Хімічний інсектицид «Актара» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.syngenta.ua>
30. «Органик Машрумс» і «Эко-Машрумс» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://agroportal.ua>
31. Грибна ферма «Гелика-М» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.geleka-m.com.ua>
32. Грибна ферма «Боровик» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://namillion.com>
33. Грибна ферма «Закарпатшампінйон» [Електронний ресурс] – Режим доступу:

<https://zakarpatty.net.ua>

- 34.Грибна ферма «Ставиччина» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://agravery.com>
- 35.Грична ферма «Українські печериці» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://inspections.gov.ua>
- 36.Всеукраїнська асоціація грибівиробників [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.umdiss.org>
- 37.Директор ГС «Укргрибпром»: Рентабельність виробництва грибів становить від 15 до 40% [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://agravery.com>
- 38.Пирог Т. П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
- 39.Калунянц К.А., Голгер Л.И., Балашов В.Е. Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.
- 40.Елинов Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов; аспирантов и практических работников. Издательская фирма «Наука» СПб, 1995. – 600 с.
- 41.Ферментр з нержавіючої сталі фірми «BIORUS» [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bio-rus.ru>
- 42.Гельперин Н.И. Основные процессы и аппараты химической технологии. В двух книгах. – М.: Химия, 1981 г. – 812 с., ил.
- 43.Дытнерский Ю.И. Процессы и аппараты химической технологии: Учебник для вузов. Изд. 2-е. В 2-х кн. Часть 2. Массообменные процессы и аппараты. М.: Химия, 1995. – 368 с.: ил.
- 44.Сидоров Ю.І. Промислові ферментери // Журнал “Біотехнологія” – 2012. –Т.5, №3 – с. 33-39.
- 45.Гапонов К.П. Процессы и аппараты микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. – 240 с.
- 46.Стренк Ф.В. Перемешивание и аппараты с мешалками. Польша, 1971. Пер. с польск. под ред. Щупляка И.А. – Л.: «Химия», 1975. – 384 стр., 197 рис., 31 табл.
- 47.Санітарно-гігієнічні вимоги до територій, виробничих і допоміжних приміщень, споруд [Електронний ресурс] – Режим доступу:<https://pidruchniki.com>

48. Миючий та дезенфікувальний засіб «Супераль» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://novahim.com.ua>
49. Миючий та дезенфікувальний засіб «Каустична сода» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.plasma.com.ua>
50. Каустична сода, виробництво та застосування [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dobriva.dp.ua>
51. Миючий та дезенфікувальний засіб «Ексан про дез» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://novahim.com.ua>
52. Миючий та дезенфікувальний засіб «Гембар» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://biocide.com.ua>
53. Миючий та дезенфікувальний засіб «Хлор Ліквід» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.ukrdez.com.ua>
54. Миючий та дезенфікувальний засіб «Баланідас 300» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.dzo.com.ua>
55. Миючий та дезенфікувальний засіб «Лойран Про – 13» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://novahim.com.ua>
56. Средство для чистки духовок, плит, коптилен Лойран-Про 13 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://bigl.ua>
57. Мобильная установка СІР для очистки [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://sartorius.com.ua>
58. Стерилизационный горизонтальный автоклав промышленный на 1-у корзину САГ-13 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua>
59. Кротов А.С., Магарламов Т.Ю., Горобец Е.А., Мельникова Д.И., Шокур О.А. Разрушение спор и вегетативных клеток тетродотоксин-продуцирующей бактерии *Bacillus sp.* 1839 // УДК 579 – 2015. – с. 583–586.
60. Пат. SU 113504 А1. Штамм *Bacillus thuringiensis* Н № 71 способ получения ларвицидного препарата на его основе. Кандыбин Н.В., Барбашиова Н.М., Ермолова В.П., Смирнов О.В., Скворцов Г.Е., Пахтуев А.И., Комарских Р.П., Бессонов В.И., Виктор-Набоков О.В., Михновская Н.Д. – Опубликовано: 04.30.1987

61. Данилов І.П. Апарати мікробіологічної промисловості//Біотехнологія – Харків НТУ – 2008. – С.271
62. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв/ Київ НУХТ – 2019 – с. 253.
63. Мембранная фильтрация, ее применение в биотехнологии [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://biotechno.ru>
64. Система Sartoflow®Beta plus тангенціальної фільтрації [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua>
65. Касетні фільтри для тангенціальної фільтрації Sartocor® ECO [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua>
66. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua>
67. Пат.№ 2 027 369 С1 РФ. Способ получения эндотоксинсодержащих энтомопатогенных препаратов. Каменек Л.К. – Опубликовано 27.01.1991.
68. Пат. № 2 264 100 С2 РФ. Способ получения инсектицидного препарата и препарата на основе бактерий *Bacillus thuringiensis*. Каменек Л.К. – Опубликовано 20.11.2005 Бюл.№32.
69. Донченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов /– М.: ДеЛи, 2000. – 256 с.
70. Перетворення білків у технологічному процесі [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://cpo.stu.cn.ua>
71. Шафа сушильна СП-50С [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://ua.uoslab.com/sushylne-obladnannia/sushylni-shafy/sushilnyj-shkaf-sp-50c>
72. Фасувальна машини для сипкого матеріалу до 10 кг [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://technowagy.com.ua>
73. Санітарно-гігієнічні вимоги до пакувальних матеріалів [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://ua-referat.com>
74. Пластикові пакувальна тара [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua>
75. Трубкові насоси РСМ [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.prom-nasos.com.ua>

- 76.Фильтр карманный грубой очистки воздуха Фільтр ФПО FA-3 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://air-klimat.prom.ua>
- 77.Компрессор винтовой Atlas Copco GX 7 10P / 400B 3ф 50Гц без N / CE [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.companyair.ru>
- 78.Осушувач ОВ 42 «АСО» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ua/>
- 79.Ресивер вертикальний РВ 110/10 «АСО» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnofilter.ub.ua/ua/>
- 80.Теплообмінник HF75 «Pahlen» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.airone.ru>
- 81.Фільтр ФПО FA-3 «Уралкомпрессормаш» [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://air-klimat.prom.ua>
- 82.Реактор с мешалкой и нагревом NLF Bioengineering AG [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnolog.com.ua>
- 83.Фільтри НЕРА Н14 СКБ Технофільтр [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.airpol.com.ua>
- 84.Ферментер фірми «BIORUS» на 10 л [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://bio-rus.ru>
- 85.Реактор с мешалкой и нагревом NLF Bioengineering AG [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnolog.com.ua>
- 86.Збірник для зберігання об'ємом 10 л. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.labpharma.org>
- 87.Відцентровий насос [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://trudovik.com.ua>
- 88.Наказ від 14.12.2001 № 502 Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20011214_502.html.

89. Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.О. та ін. Медична мікробіологія, вірусологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П. Широбокова / Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011. – 952 с.
90. Васильев Д.А, Архипова Г.Ф., Николайчук Л.Ф. Бактерии *Bacillus cereus* и межвидовая рекомбинация с *Bacillus anthracis* как угроза здоровью человека. – Ульяновск 2013. – с. 88.
91. Мікроскопіювання *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://cafeplume.com/bacillus-thuringiensis-israelensis/>
92. Загальна мікробіологія і вірусологія: лабораторний практикум для студентів освітнього ступеня "Бакалавр" спеціальності 162 "Біотехнології та біоінженерія" денної форми навчання / уклад. : Т. П. Пирог, М. М. Антонюк ; Нац. ун-т харч. технол. — К. : НУХТ, 2016. — 110 с. — каф. біотехнології і мікробіології.
93. Fernando H.V., Edmar DE S.T., Maria I.S.L., Fernanda L.F. and Corina M. V. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources/ *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.9, n.1, p. 1-11, 2010
94. Честухина Г.Г., Залунин И.А., Костина Л.И., Котова Т.С., Камруха С.П., Люблинская Л.А., Степанов В.М. Протеиназы, связанные с кристаллами *Bacillus thuringiensis*. // Биохимия. — 1978. — Т. 43. — № 5. — С. 857-864.
95. Іоннообмінний хроматограф 861 Advanced Compact Ion Chromatography [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.thelabstore.co.uk>
96. Колонки для іонної хроматографії IC YK-421 [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.manualsdir.com>
97. San San Yu, Ei Phyu Kyaw, Tin mar Lynn, Zaw Ko Latt, Amy Aung, Tin May Sev, May Thet Nwe, Wai Wai Mon. The correlation of carbon source and ammonium accumulation in culture broth by nitrogen-fixing bacterial isolates/ *Journal of Scientific and Innovative Research* 2017; 6(2): 63-67
98. Jihane Rahbani Mounsef, Dominique Salameh, Mireille kallassy Awad, Cedric Brandam, Roger Lteif. Evaluation of a cereal milling byproduct for the low cost

- production of *Bacillus thuringiensis kurstaki* in submerged fermentation/ European Journal of Biotechnology and Bioscience 2014; 1 (6): 10-16
99. Високоєфективний рідинний хроматограф HPLC-sistema-LC-20-Prominence [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.bio-rad.com>
100. Колонка Aminex HPLC-87H [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://chemtest.com.ua>
101. ГОСТ Р 57601-2017 Продукция микробиологическая. Бактериальный инсектицидный препарат бактокулицид. Технические условия. Дата введения 2018-08-01