МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту(декан факультету)	**Завідувач кафедри**
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК	_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)	(підпис) (ім'я та прізвище)
«___» _____ 20__ р.	**«___» _____ 20__ р.**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

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

на тему: «Біосинтез еластази *Bacillus licheniformis*»

Виконав: здобувач_4_ курсу, групи_1_
_____ОВЧАРУК Анна Сергіївна_____ _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ___СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна___ _____
(прізвище , ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент __Андрій ЗАБАЛУЄВ___ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2025 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 «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Стабніков В.П.

«01» березня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНИЙ ПРОЕКТ (РОБОТУ) ЗДОБУВАЧА

ОВЧАРУК Анни Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) Біосинтез еластази *Bacillus licheniformis*

керівник проекту (роботи) СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна к.б.н., доцент

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «27» березня 2025 року № 188-кс

2. Строк подання здобувачем проекту (роботи) 28 травня 2025 року

3. Вихідні дані до проекту (роботи) біологічний агент *Bacillus licheniformis* цільовий продукт: еластаза

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; Характеристика біологічного агента; Техніко-економічне обґрунтування; Обґрунтування вибору технологічної схеми; Специфікація обладнання; Опис технологічної схеми; Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)

Технологічна схема виробництва біомаси – 1 аркуш формату А1 та 1 аркуш А3. Апаратурна схема виробництва біомаси – 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів проекту (роботи)

Розділ	Прізвище, ім'я, по-батькові консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв

7. Дата видачі завдання «01» березня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційного проекту (роботи)	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1	Характеристика цільового продукту;	*01.03.25-04.03.25*	
2	Характеристика біологічного агента;	*05.03.25-08.03.25*	
3	Техніко-економічне обґрунтування;	*09.03.25-19.03.25*	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми;	*20.03.25-29.03.25*	
5	Специфікація обладнання;	*30.03.25-01.04.25*	
6	Опис технологічної схеми;	*02.04.25-20.04.25*	
7	Контроль виробництва	*21.04.25-10.05.25*	
11	Оформлення пояснювальної записки.	*17.05.25- 23.05.25*	
12	Виконання графічної частини проекту.	*24.05.25-28.05.25*	

Здобувач Анна ОВЧАРУК

підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник проекту (роботи) Оксана СКРОЦЬКА

(підпис) (прізвище та ініціали)

ABSTRACT

This qualification thesis is dedicated to the development of technology of obtaining elastase via *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410, which has an activity of 495 U/mL. Elastase is proposed to be used in beef tenderization. Planned usage is for a small niche of total Ukrainian beef production, obtaining 200 m^3 of cultural broth per year during 52 work days.

Process of obtaining biomass is split into multiple stages, including auxiulary works (sterile aeration air procurement; medium preparation and sterilization for cultivation in flasks on a shaker, inoculators and fermenter) and technological process (culture storage, inoculant growth in flasks on a shaker, 20, 160 and 1 250 L inoculators and productive biosynthesis in 10 m^3 fermenter).

Degree thesis is composed of 72 pages, has 14 tables, 10 illustrations, has an introduction, 8 sections, literature (28 sources), has a technological (A1 papar format, 2 pages) and instrumental (A1 paper format, 1 page) schemes.

Key words: elastase, *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410, meat tenderization

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технології отримання еластази за допомогою *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410, що досягає активності 495 од/л в супернатанті. Еластазу пропонується використовувати для пом'яшкення м'яса. Планується покривати нішеву долю всієї яловичини України, отримуючи 200 м^3 культуральної рідини на рік впродовж 52 днів роботи.

Отримання біомаси включає декілька етапів, такі як допоміжні роботи (отримання стерильного аераційного повітря; підготовка поживного середовища для культивування в колбах на качалках, в інокуляторах та ферментері) та технологічний процес (чотири стадії вирощування інокуляту: в колбах на качалках, в апаратах 20 л, 160 л та 1250 л, та стадія виробничого біосинтезу в апараті 10 м^3, з коефіцієнтом заповнення 0.6).

Дипломний проект займає 72 сторінок, містить 14 таблиць, 10 рисунків, 5 додатків, складається з вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (28 посиланнь), технологічної (формат А1, 2 листи) та апаратурної (формат А1, 1 лист) схем.

Ключові слова: еластаза, *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410, пом'яшення м'яса

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ 5

ВСТУП 8

РОЗДІЛ 1. Опис цільового продукту 9

1.1. Характеристика еластази 9

1.2. Сфери практичного застосування 10

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента 12

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування 12

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 20

2.3. Таксономічний статус *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 22

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування 23

3.1. Потреба в цільовому продукті – еластазі 23

3.2. Розрахунок виробничих потужностей еластази 24

3.3. Розрахунок геометричного об’єму ферментеру 25

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу еластази 26

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту 29

4.1. Шляхи катаболізму триптону у біологічного агента 29

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт 31

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми 32

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера 32

5.2. Обгрунтування стадій повітропідготовки 33

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів 35

5.3.1. Обгрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів 35

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів 44

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища 51

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання 56

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми 59

РОЗДІЛ 8. Одержання еластази 66

РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва 68

9.1. Мікробіологічний контроль поживного середовища 68

9.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури 68

9.3. Контроль активності еластази 69

9.4. Концентрація джерела карбону 70

9.5. Концентрація джерела нітрогену 70

9.6. Концентрація біомаси 71

ЛІТЕРАТУРА 72

ВСТУП

Еластаза – це протеолітичний фермент, який розщеплює білки, зокрема еластин, який є важливим компонентом сполучної тканини. Існує кілька типів еластаз, але найбільш відомі з них – це еластаза-1 (панкреатична еластаза) та еластаза-2 (лейкоцитарна еластаза) [1].

Еластаза широко використовується в біохімічних дослідженнях для вивчення структури і функції білків, а також у клітинній біології для вивчення ролі цього ферменту у процесах запалення та деградації сполучної тканини. Крім того, еластаза відіграє важливу роль у фармацевтиці, де її застосовують для розробки препаратів, спрямованих на лікування захворювань, пов'язаних з надмірним накопиченням сполучної тканини, таких як хронічні обструктивні захворювання легень (ХОЗЛ). Також вона може використовуватись для пом’якшення тваринної сировини в промисловості [2, 3]

Ферменти отримують шляхом біологічного синтезу, і еластаза не є виключенням. Вона продукується як організмами тварин в підшлунковій залозі та лейкоцитах, так і різними мікроорганізмами, такими як *Priestia megaterium* gasm32, *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 та *Pseudomonas aeruginosa.* Другий продуцент має переваги по активності цільового продукту (495 од/мл) [4-6]

Новизною даної роботи є розробка використання високопродуктивного (495 од/л) штаму *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 для отримання практично цінного ферменту еластази.

РОЗДІЛ 1. ОПИС ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1 Характеристика еластази.

Еластаза – це серинова протеаза, що виробляється підшлунковою залозою, яка каталізує розщеплення карбоксильних груп присутніх у невеликих гідрофобних амінокислотах, таких як гліцин, аланін і валін. Його основна роль полягає в розщепленні еластину – білка, який надає еластичності сполучній тканині [1]. Однак еластаза також може брати участь в інших процесах, включаючи активацію або інактивацію білкових гормонів та інактивацію інгібіторів протеїназ плазми крові.

Нейтрофільна еластаза розщеплює зовнішню мембрану кишкової палички та інших грамнегативних бактерій [1]. Дана форма ферменту (нейтрофільна еластаза) складається з 218 амінокислот, з двома вуглеводними ланцюгами, пов'язаними з аспарагіном [2]. Еластази іншого походження можуть мати різну кількість амінокислот у своєму складі. Так, наприклад, панкреатична еластаза виділена з підшлункової залози свиней складається з одного пептидного ланцюга з 240 амінокислот [3].

У людини існує вісім генів, які кодують еластазу або еластазоподібні ферменти, п'ять з них класифікують як хімотрипсиноподібні (еластазу даного походження також називають панкреатичною), а на нейтрофільну, хімотрипсинову та макрофагову групи припадає всього по одному кодуючому гену [4]. Усі типи еластази мають спільну здатність розщеплювати білкові субстрати, але відрізняються у структурі, регуляції активності та ролі в організмі. Ці незначні, проте важливі, відмінності в амінокислотному складі, впливають на оптимальність умов активності та ступінь інгібування специфічними протеазними інгібіторами. Така різноманітність дозволяє адаптувати фермент до виконання різних функцій у клітині, в залежності від

фізіологічних потреб організму.

Молекулярна маса ферменту еластази становить від 24,5 кД до 26 кД. Оптимум pH для еластази може коливатись в районі 8,0-9,2 [5].

Еластаза зустрічається головним чином у підшлунковій залозі та панкреатичному соку багатьох ссавців і птахів, у сироватці крові людини, гранулоцитах та еритроцитах, а також у деяких мікроорганізмах (наприклад у *Flavobact elastolyticum*, *Clostrid histolyticum* та деяких інших).

1.2 Сфери практичного застосування еластази.

Еластаза має декілька напрямків потенційної реалізації. Як, наприклад, вона може мати використання в харчовій промисловості, де використовується для покращення текстури та жорсткості м’яса [6].

Також, наш цільовий фермент має місце застосування і в медичній сфері. Завдяки здатності розщеплювати еластин, він бере участь як у фізіологічних процесах ремоделювання тканин, так і у патологічних явищах, коли її надмірна або недостатня активність призводить до змін у структурі органів. Еластаза використовується для лікувань хвороб, пов’язаних з недостатністю підшлункової залози. Цей фермент в організмі людини розщеплює білки, і у випадку її недостачі лікарі виписують пацієнтам лікарські засоби з ферментами підшлункової залози, в склад яких входить і еластаза. Також цікавою є можливість використання еластази як вазодилятаційних ліків [7]. Сучасні дослідники активно вивчають механізми регуляції активності еластази, розробляють специфічні інгібітори для корекції її надмірної дії у патологічних станах, а також шукають способи підвищення стабільності ферменту за допомогою генетичних та хімічних модифікацій.

Підтверджено, що еластаза існує в підшлунковій залозі більшості тварин, включаючи людей, мавп, котів, кроликів тощо. Її рівень становить близько 3,1 мг/г підшлункової залози у людини, близько 2,2 мг/г у великої рогатої худоби та близько 10,2 мг/г у щурів. Існує взаємозв'язок між активністю еластази та віком

людини: помітне зниження активності еластази спостерігається в підшлунковій залозі та плазмі крові чоловіків старше 40 років і жінок старше 60 [8].

Дослідження фармакологічної дії еластази, що були проведені на щурах та кролях, виявили її здатність до:

- відновлення еластичності та розтяжності артеріальних стінок;
- покращення показників ліпідного спектру сироватки крові;
- пригнічення відкладення ліпідів та кальцію на стінках артерій;
- сприяння синтезу еластинових волокон у стінках артерій;
- зниження рівня ліпідів у сироватці крові;
- покращення метаболізму ліпопротеїнів у сироватці крові [9].

Еластаза, окремо і в комбінації з іншими агентами, є корисною при лікуванні захворювань біологічних каналів, включаючи біологічні канали, які зазнають або можуть зазнати обструкції і спазму судин [10].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

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

Еластаза знайшла широке застосування в багатьох промисловостях, серед яких харчова, хімічна, медична та косметична. Мікробна еластаза була виділена з видів *Priestia megaterium* gasm32, *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410, *Pseudomonas aeruginosa*, а також *Staphylococcus epidermidis*, *Flavobacterium*, штам *Alkalophilis B. Ya-B* та інших. Серед них лише невелика частина штамів мала достатню активність для промислового застосування.

Узагальнені дані щодо отримання еластази за допомогою трьох різних мікроорганізмів наведені в таблиці 2.1. Далі, в таблицях 2.2 та 2.3, можна побачити розрахункові дані щодо вартості поживних середовищ та умовну вартість 1 од еластази.

По таблицях видно, що тривалість культивування в *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 є найкраща серед обраних трьох мікроорганізмів. Щодо інших показників, то *B. licheniformis* ZJUEL31410 має також значно кращі результати за *P. megaterium* gasm32 та *Bacillus* sp. 051 – мінімум в 6,8 рази більше за інші значення – активність ферменту, а також найвигідніша умовна вартість 1 од цільового продукту (0.0207 грн/од). В останньому зазначеному показнику *P. megaterium* gasm32 також показав хороший результат (0.1260 грн/од), але все ж трохи поступається *B. licheniformis* ZJUEL31410. Мікроорганізм *Bacillus* sp. 051 виявився найбільш затратним по ціні, в порівнянні з іншими (0.2995 грн/од), і, оскільки він загалом мав всі показники гірші за два інші продуценти, можна сказати, що цей мікроорганізм підходить для застосування на виробництві найменше [11-13].

Отже, проаналізувавши середовища, режими культивування, активність отриманого продукту та розрахункові дані щодо вартості поживних середовищ та умовну вартість 1 од еластази, можна сказати, що використання мікроорганізму *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 є найбільш доцільним.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів еластази

Біологічний агент	**Склад поживного середовища**		**Тривалість культивування, год**	**Активність, од/мл**	**Особливості процесу біосинтезу**	**Використана література**
	компонент	**концентрація, г/л**				
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
Priestia megateriu m gasm32	Пептон Фруктоза KH_2PO_4 NaCl Дріжджовий екстракт $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ K_2HPO_4 $CaCl_2$ $MnSO_4$ $FeSO_4$ $ZnSO_4$	5 5 0.8 3 0.4 0.5 0.2 0.1 0.1 0.02 0.02	48	66.47 (у супернатанті)	pH середовища доводили до 7,0 і потім розподіляли при 20% у 250 мл колби Ерленмейера. Використовували 2% інокулят 12-годинних культур у бульйоні LB. LB складався з (%, мас./об.) триптону (1,0), NaCl (0,5) і дріжджового екстракту (0,5) при pH 7,0. Ферментацію залишали протягом 48 годин при 37°C зі струшуванням при 200 об/хв. Центрифугування проводили при 5000 об/хв протягом 20 хв з використанням охолоджуваної центрифуги при 4°C для відділення бактеріальних клітин	AlShaikh-Mubarak, G. A., Kotb, E., Alabdalall, A. H., & Aldayel, M. F. (2023). A survey of elastase-producing bacteria and characteristics of the most potent producer, Priestia megaterium gasm32. Plos one, 18(3), e0282963.

Bacillus licheniformis ZJUEL31410	Глюкоза Казеїн Кукурудзяне борошно K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	74 11.3 6.16 2.06 0.34	25	495 (у супернатанті)	Всі оптимізаційні експерименти проводили в не притертих колбах Ерленмейєра об'ємом 250 мл, що містили 25 мл середовища з оптимізованими концентраціями. 37 °C, pH 7.0	Chen, Q. H., Ruan, H., Zhang, H. F., Ni, H., & He, G. Q. (2007). Enhanced production of elastase by Bacillus licheniformis ZJUEL31410: optimization of cultivation conditions using response surface methodology. Journal of Zhejiang university science B, 8, 845-852.
Bacillus sp. 051	KH_2PO_4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $ZnSO_4 \cdot H_2O$ $(NH_4)_2SO_4$ Мальтоза Желатин Дріжджовий екстракт	1.0 0.75 0.25 0.5 1.0 10 0.15	144	17 (у супернатанті)	Культуру вирощували при 12, 28 та 37 °C за швидкості обертання 210 об/хв протягом 17 діб. Після закінчення ферментації біомасу відокремлювали центрифугуванням при 5000 g протягом 30 хв.	Gudzenko, O. V., Ivanytsia, V. O., & Varbanets, L. D. (2023). Proteolitic Activity of Marine Strain Bacillus sp. 051. Mikrobiolohichnyi Zhurnal, 85(5), 12-19.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів еластази

Продуцент	**Компонент поживного середовища**	**Концентрація у ПС, г/л**	**Ціна компонента, грн/кг**	**Вартість компонента (грн) на 1 л середовища**	**Джерело інформації**
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Priestia megaterium gasm32	Пептон	5	1 120	5.6	https://shop.hlr.ua/ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html
	Фруктоза	5	150	0.75	https://pischevik.in.ua/podslastiteli-naturalnye-2/fruktoza-1-kg-2
	KH_2PO_4	0.8	101	0.0808	https://megachem.com.ua/ua/kalij-fosfornokislyj-4-zameshennyj-ch.html
	NaCl	3	80	0.24	https://silur.prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html
	Дріжджовий екстракт	0.4	4020	1.608	https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html
	$MgSO_4.7H_2O$	0.5	90	0.045	https://gardentime.com.ua/sulfat-mahnija-mahnij-sirchanokyslyi-semyvodnyi-mgso4-7h2o-1-kg/

	K_2HPO_4	0.2	187	0.0374	https://harkiv-torg.com.ua/ua/p825624658-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html
	$CaCl_2$	0.1	53	0.0053	https://prom.ua/ua/p1296604649-kaltsij-hloristyj.html
	$MnSO_4$	0.1	39	0.0039	https://megachem.com.ua/ua/sulfat-marganca.html
	$FeSO_4$	0.02	45	0.0009	https://prom.ua/ua/p273592540-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html
	$ZnSO_4$	0.02	85	0.0017	https://reaktivov.net/tsynk-sirchanokyslyi-10-kh/
	Вартість 1 л середовища – 8.373 грн				
Bacillus licheniformis ZJUEL31410	Глюкоза	74	49	3.626	https://snabhim.com.ua/uk-ua/glyukoza
	Казеїн	11.3	495	5.085	https://harkiv-torg.com.ua/ua/p825618913-kazein.html
	Кукурудзяне борошно	6.16	28.3	0.1743	https://100pudiv.in.ua/shop/boroshno-kukurudzyane_-1-kg-p321
	K_2HPO_4	2.06	187	0.3852	https://harkiv-torg.com.ua/ua/p825624658-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html

	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.34	90	0.0306	https://gardentime.com.ua/sulfat-mahnija-mahnij-sirchanokyslyi-semyvodnyi-mgso4-7h2o-1-kg/
	Вартість 1 л середовища – 9.3011 грн				
Bacillus sp. 051	KH_2PO_4	1.0	101	0.101	https://megachem.com.ua/ua/kalij-fosfornokislyj-4-zameshennyj-ch.html
	$MgSO_4.7H_2O$	0.75	90	0.0675	https://gardentime.com.ua/sulfat-mahnija-mahnij-sirchanokyslyi-semyvodnyi-mgso4-7h2o-1-kg/
	$ZnSO_4 \cdot H_2O$	0.25	21	0,0053	https://megachem.com.ua/ua/cinka-sulfat-1-vodnyj.html
	$(NH_4)_2SO_4$	0.5	58	0.029	https://prom.ua/ua/p517297174-sulfat-ammoniya-1kg.html
	Мальтоза	1.0	280	0.28	https://prom.ua/ua/p1645864432-maltoza-500.html
	Желатин	10	300	3	https://marketing-place.com.ua/ua/p1074985287-zhelatin-pischevoj-tip.html
	Дріжджовий екстракт	0.15	4020	1.608	https://shop.hlr.ua/ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html
	Вартість 1 л середовища – 5.0908 грн				

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 од еластази, синтезованої на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	**Активність, од/мл**	**Тривалість культивування, год**	**Кількість утвореного продукту за годину, (од/мл)/год**	**Вартість 1 л середовища, грн/л**	**Умовна вартість 1 од цільового продукту, грн/од**
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
***Priestia megaterium* gasm32**	66.47	48	1.385	8.373	0.1260
***Bacillus licheniformis* ZJUEL31410**	495	25	18	9.3011	0.0207
***Bacillus* sp. 051**	17	144	0.118	5.0908	0.2995

2.2 Морфолого-культуральні ознаки

Bacillus licheniformis є паличкоподібною грам-позитивною бактерією. За розмірами вони досягають 2-6 мкм в довжину та менше 1 мкм в ширину (рис.1.1.) [14].

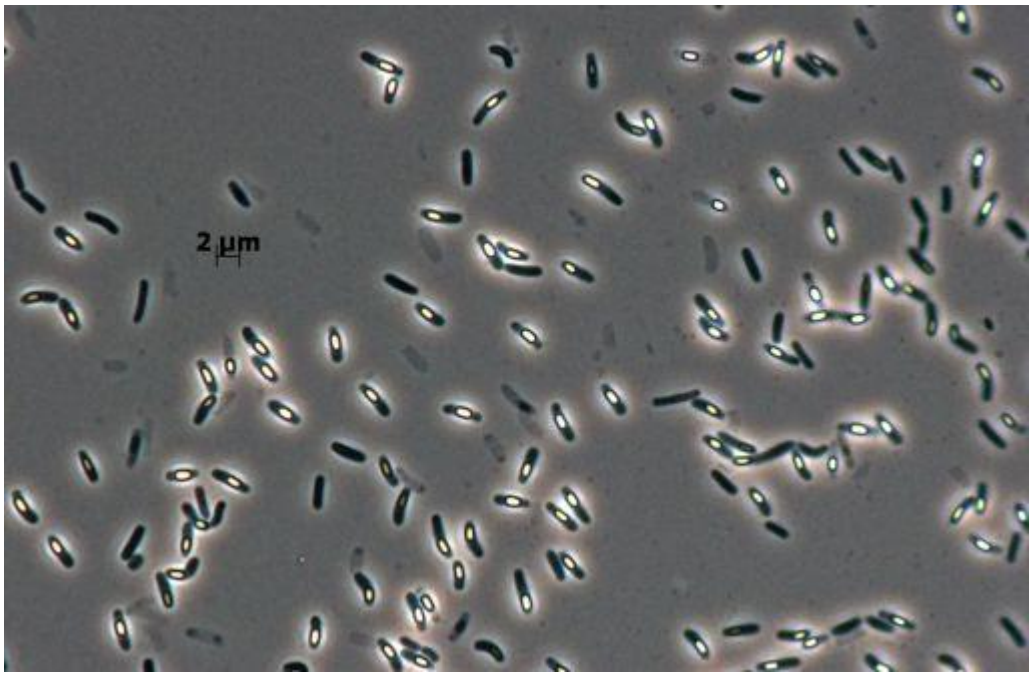


Рис. 1.1. Електронна мікроскопія *Bacillus licheniformis*

На кров'яному агарі *Bacillus licheniformis* формують білі або жовтуваті дрібні колонії з променевою поверхнею (рис. 1.2.) [15]

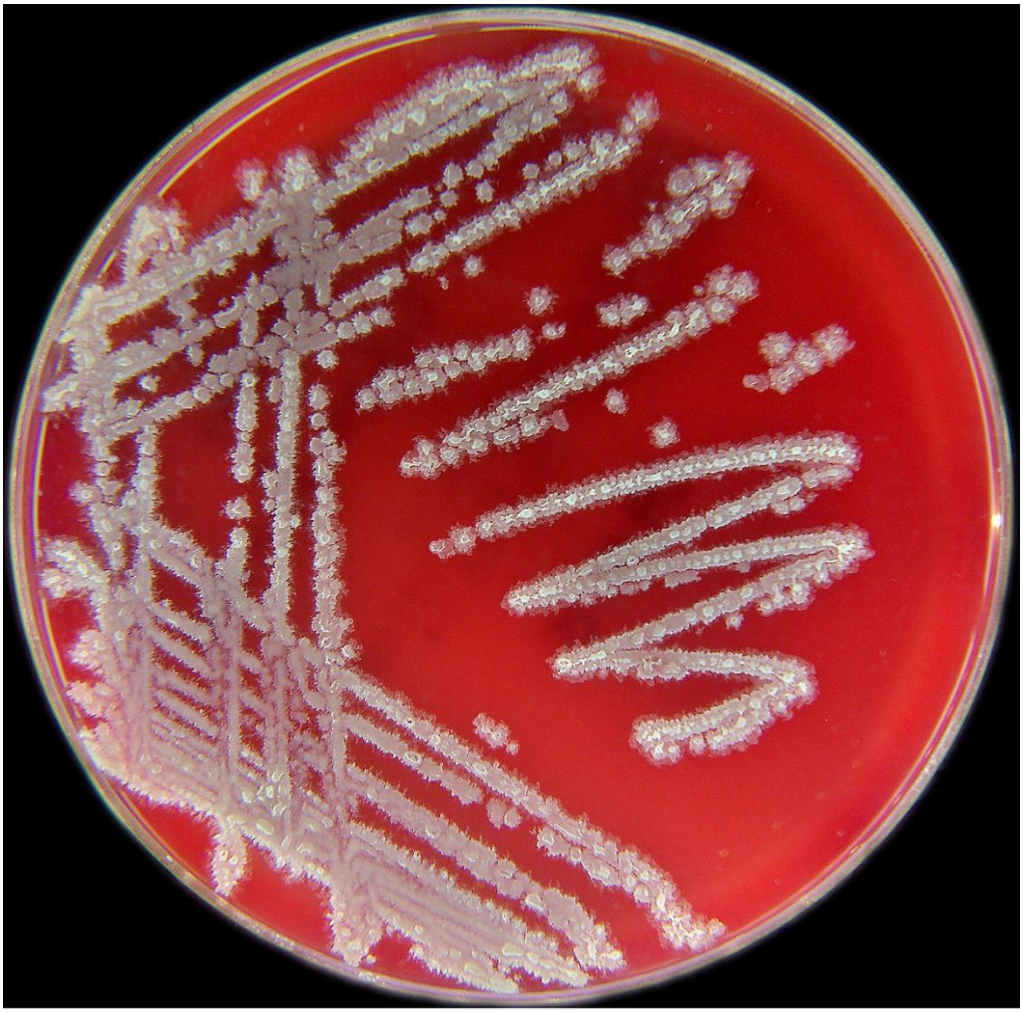


Рис. 1.2. Колонії *Bacillus licheniformis* на кров'яному агарі

Фізіолого-біохімічні характеристики

Bacillus licheniformis є хемоорганогетеротрофом, оскільки його джерело вуглецю, джерело електронів та джерело енергії є органічними речовинами. *B. licheniformis* не є ауксотрофом, як джерело азоту використовує розчинені в середовищі речовиних.

Бактерії добре ростуть при 28-30 °С, середньому pH, низькій солоності [16].

2.3 Таксономічний статус

Філогенетична класифікація *Bacillus licheniformis* [17]:

Домен: *Bacteria*

Тип: *Bacillota*

Клас: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *B. licheniformis*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба в цільовому продукті – еластазі

В сучасному світі еластаза знайшла декілька застосувань. По-перше, вона може мати використання в харчовій промисловості, де застосовується для покращення текстури та жорсткості м’яса [18].

В медицині дуже розповсюджений аналіз вмісту панкреатичної еластази в калі людини, що використовують, аби дізнатись, наскільки підшлункова залоза справляється зі своєю функцією і чи достатньо виробляє травні ферменти. Але в цьому випадку ми тільки аналізуємо наявну кількість ферменту у зразках, не користуючись еластазою як сировиною для промислових масштабів. Наразі тривають не одне дослідження на тему того, як еластаза може застосовуватись в більш просунутих методах діагностики і лікування, а також як еластаза впливає на протікання тої чи іншої хвороби, але до якихось остаточних конкретних висновків, які дозволили б використовувати еластазу на практиці, вчені ще не дійшли. [19]

В рамках даної курсової роботи пропонуємо розглядати виробництво еластази саме для пом’якшення м’яса.

Провівши аналіз ринку, з’ясувалося, що Україна не займається виробництвом ферментних пом’якшувачів м’яса. Всі пропонуємі позиції на ринку є імпортними.

Згідно з даними [20], річний обсяг виробництва яловичини в Україні становить 343 000 тон, що еквівалентно 343 000 000 кг. Для пом’якшення яловичини пропонуємо використовувати 1% розчин еластази активності 300 од/мл у співвідношенні 1:5 (маса м'яса до об'єму ферментного розчину) [21].

Розрахунок необхідного об'єму 1% ферментного розчину для обробки всього обсягу яловичини:

343 000 000 × 5 = 1 715 000 000 л

Розрахуємо масу еластази у даному об’ємі 1 % розчину:

1 715 000 000 × 0,01 = 17 150 000 кг

Приймемо, що з 1 літра культуральної рідини при культивуванні *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 ми отримаємо 1 г еластази. Тоді для отримання 17 150 000 кг еластази нам потрібно 17 150 000 000 л культуральної рідини. Але це ми не враховуємо втрати на виділення і очищення еластази.

3.2. Розрахунок потужності виробництва еластази

На ринку України, на жаль, не представлені еластазні субстанції в каталогах вітчизняних фармацевтичних та біохімічних виробників.

Щодо закордонних виробництв, то є дві великих компанії, які можуть запропонувати закупівлю потрібного нам ферменту, а саме: ChemWhat та Sigma-Aldrich. В асортименті першої є вибір з лейкоцитарної, макрофагічної та панкреатичної еластази. Другий постачальник може запропонувати нейтрофільну, лейкоцитарну та панкреатичну еластази.

Необхідна к-сть культуральної рідини, щоб забезпечити 1% розчином еластази для обробки 100% яловичини, що виробляє Україна:

17 150 000 000 л ≈ 17 150 000 м³

Оскільки пом’якшення використовується рідко відносно всього об’єму м’ясу (а саме для приготування стейків, різних видів грилю тощо), приймемо, що необхідно буде пом’якшити 8,14 * 10^{-4}% яловичини України

17 150 000 * 8,14 * 10^{-4}%≈ 143 м³

Враховуючи, що цільовим продуктом є фермент для харчової галузі, необхідно буде використовувати довгу і складну очистку (відділення супернатанту, хроматографування тощо), приймемо, що для покриття витрат при очищенні необхідно буде взяти 1,4 об'єму цільового продукту.

143 $м^3$* 1,4 = 200 $м^3$

Отож, необхідно буде підготувати 200 $м^3$ культуральної рідини за рік.

3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментеру

Щоб забезпечити річну потребу в еластазі, згідно підрозділу 1.2, потрібно отримати 200 $м^3$ культуральної рідини. Аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу, для початку нам треба дізнатись, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації. Приймаємо кількість трудоднів – 52, тоді об'єм культуральної рідини за цикл становить:

$V_{ЦК} = (К_1 \cdot V_{КР} \cdot Т_{ЦФ})/ Т_{РД}$ 24, де

$К_1$ – коефіцієнт запасу, який враховує втрати цільового продукту від нестерильних операцій, які визначаються величиною ($К_1$ = 1,1…1,5).

$V_{КР}$ – кількість культуральної рідини за рік, $м^3$ (л)

$Т_{ЦФ}$ – тривалість циклу роботи ферментера, год.

$Т_{РД}$ – кількість робочих днів на рік ($Т_{РД}$ = 30…330)

Виходить, що об'єм культуральної рідини за цикл (при 33 трудоднях) дорівнює 5.98 $м^3$.

Щоб дізнатись об'єм ферментеру, ми 5.7 $м^3$ ділимо на коефіцієнт заповнення (0.6), виходить – 9.5 $м^3$.

Стандартний об'єм - 10 $м^3$.

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу біомаси Bacillus licheniformis ZJUEL31410

За один виробничий цикл отримуємо 5.7 $м^3$ культуральної рідини (див. п.1.3). При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу, які становлять приблизно 10%. Розраховуємо необхідний об'єм: V = 5.7 * 1.1 = 6.27 $м^3$.

Зазвичай для засіву середовища необхідно підготувати інокуляту в об'ємі 10% від об'єму середовища:

$V_р$ = 6.27 * 0.1 = 0.63 $м^3$

Враховуємо краплевинос:

$V_р$ = 0.63 * 1.1 = 0.69 $м^3$

Геометричний об'єм ферментеру при коефіцієнті заповнення 0.6 буде 1.16 $м^3$. Найближчий стандартний об'єм – 1.25 $м^3$. Перевіряємо коефіцієнт заповнення:

0.69/1.25 = 0.55

Об'єм входить у оптимальний коефіцієнт заповнення для аеробних процесів (0.5-0.65), тому залишаєм цей геометричний об'єм ферментеру

Повторюємо розрахунки для наступного етапу:

$V_р$ = 0.69 * 0.1 = 0.069 $м^3$ = 69 л

$V_р$ = 69 * 1.1 = 76 л

$V_г$ = 76/0.6 = 127 л

$V_{ст}$ = 100 л

K = 76/100 = 0.76

Значення вище оптимального, обираємо інший стандартний об'єм

$V_{ст}$ = 160 л

K = 76/160 = 0.48

Це значення менше оптимального, але в іншому випадку буде перевищення об’єма ферментеру піною і контамінація, тому обираємо його.

Повторюємо розрахунки для наступного етапу:

$V_р$ = 76 * 0.1= 7.6 л

$V_р$ = 7.6 * 1.1 = 8.4 л

$V_г$ = 8.4 / 0.6 = 14 л

$V_{ст}$ = 10 л

K = 8.4/10 = 0.84

Значення вище оптимального, обираємо інший стандартний об’єм

$V_{ст}$ = 20 л

K = 8.4/20 = 0.42

Це значення менше оптимального, але в іншому випадку буде перевищення об’єма ферментеру піною і контамінація, тому обираємо його.

Проводимо розрахунки для наступного етапу:

$V_р$ = 8.4 * 0.1 = 0.84 л

Такий об’єм інокуляту є можливість підготувати і в колбах. Розрахуємо необхідну кількість колб:

N = 0.84/0.15 = 5.6 = 6 колб.

Таблиця 3.1

Об’єми поживних середовищ та апаратів для стадій підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	**$V_{кр}$, л**	**$V_{роб}$, л**	**$V_{пм}$, л**	**$V_{пс}$, л**	**$K_{зап}$**	**$V_{ст}$, л**
1	5 700	6 270	630	5 640	0,6	10 000
2	630	690	69	621	0,6	1 250
3	69	76	7,6	68,4	0,6	160
4	7,6	8,4	0,84	7,56	0,6	20
5	0,84	0,84	-	0,84	0.2	6 колб

4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1 Катаболізм ростового субстрату в *Bacillus licheniformis*

Згідно з базою даних KEGG, Bacillus licheniformis перетворює фруктозу на глюкозу за допомогою ксилозізомерази. Але в наведеній таблиці 1 нам дано середовище, яке одразу забезпечує мікроорганізм глюкозою, тому далі наведена, відповідно, схема метаболізму глюкози.

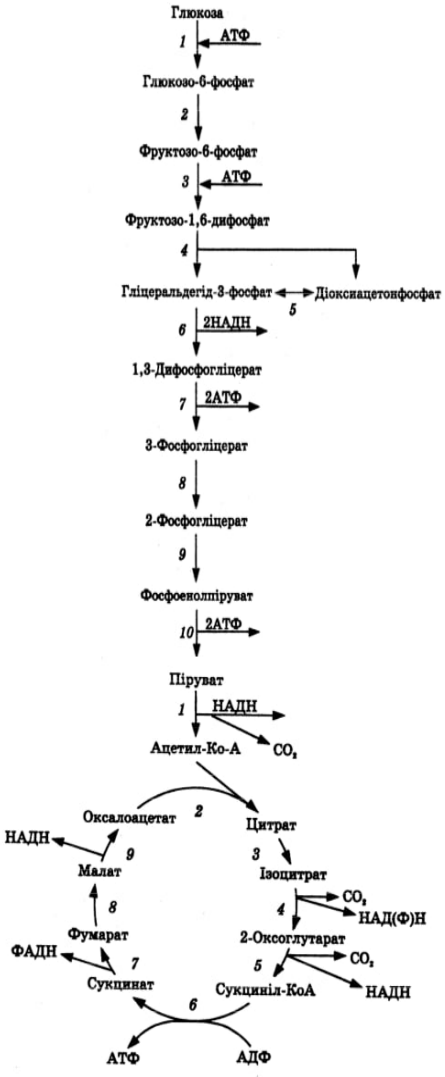
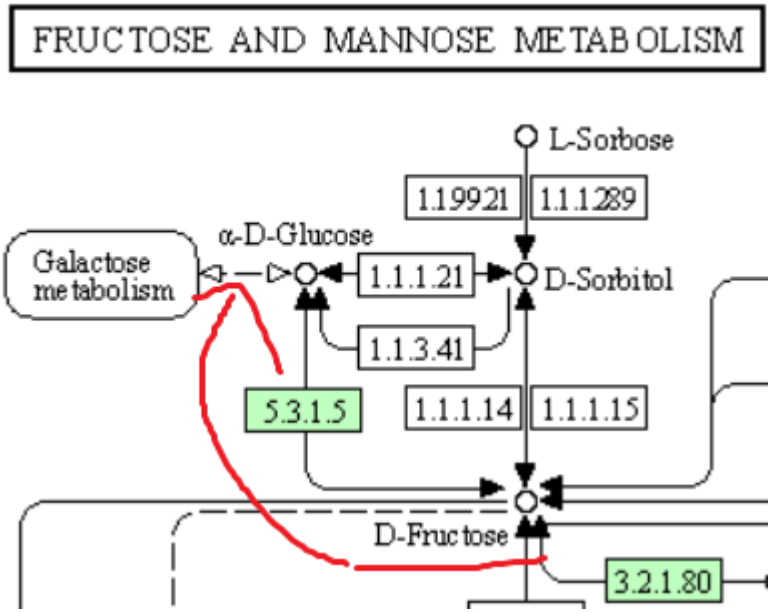
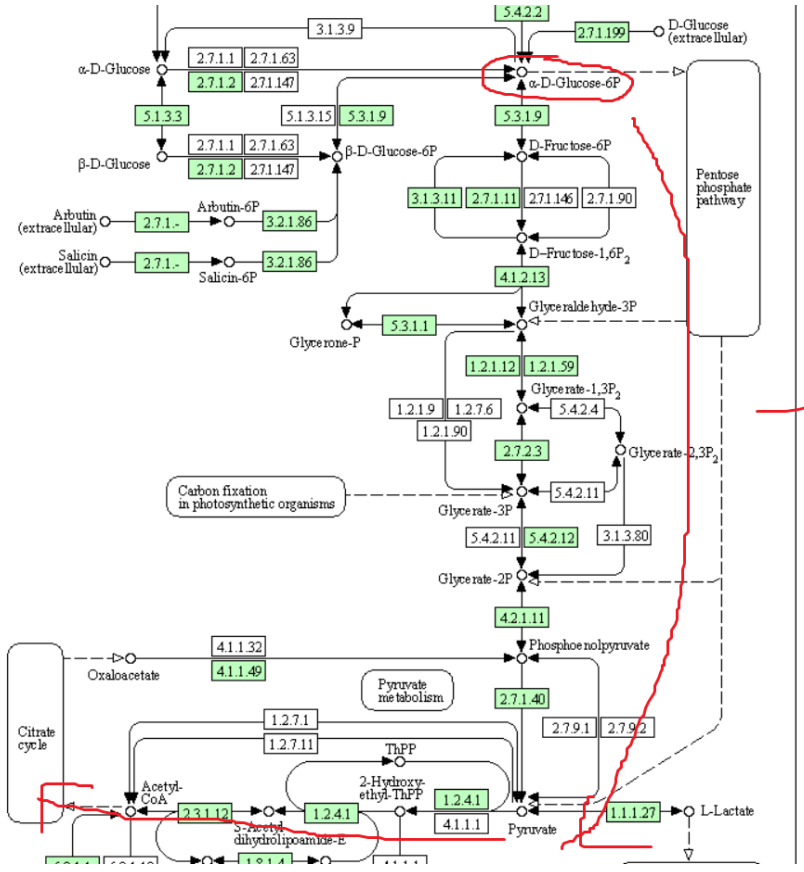


Рис. 1.3. Схема метаболізму глюкози



https://www.genome.jp/pathway/bli00051

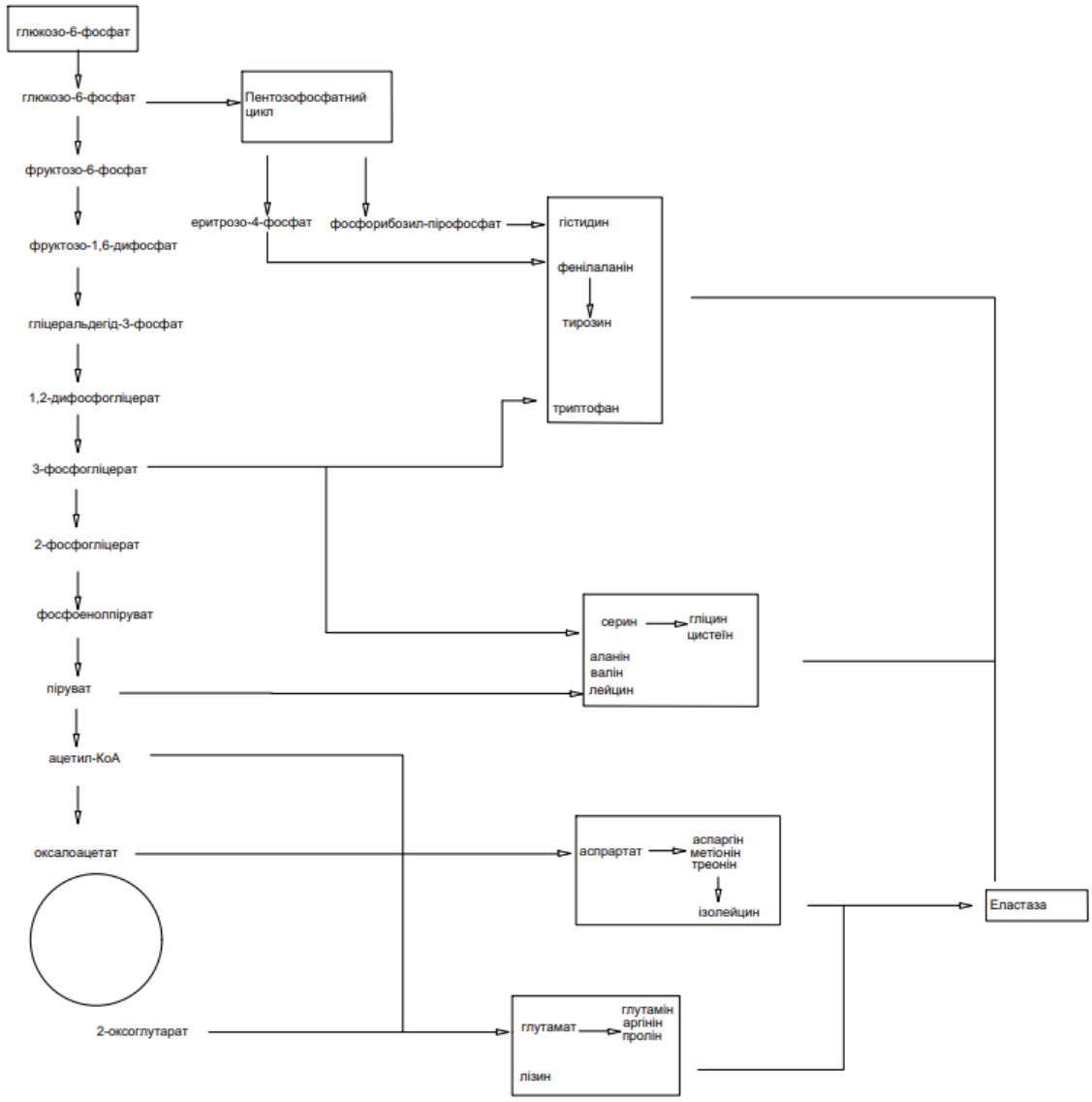


Гліколіз

https://www.genome.jp/pathway/bli00010

4.2. Біотрансформація ростового субстрату в цільовий продукт

В випадку з ферментом еластазою ми маємо справу з білком. Для біосинтезу білка необхідно синтезувати всі необхідні амінокислоти.



5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Вибір умов і способу культивування

1. Поверхневий метод культивування використовується тільки для окремих видів міцеліальних грибів, яким *Bacillus licheniformis* не є, в той час як глибинний краще піддається масштабуванню, тому більш доцільним варіантом буде саме він.
2. На даний момент, безперервне культивування більш ефективне тільки для отримання первинних метаболітів та біомаси, завдяки можливості підтримувати експоненційну фазу росту необмежену тривалість часу. У той же час, для більшості продуктів мікробного синтезу отримуються саме періодичним шляхом через більш ефективне споживання субстрату та меншу технологічну складність. Еластаза є вторинним метаболітом, тому варто використовувати періодичну технологію.
3. Технологія передбачає використання помірних температури та pH, тобто умов, при яких більшість мікроорганізмів здатні рости та розмножуватись, тому необхідно забезпечувати асептичні умови.
4. *Bacillus licheniformis* є факультативним анаеробом, тому для максимізації росту біомаси варто забезпечити доступ до кисню [22].
5. Для культивування мікроорганізму не потрібно використовувати регуляцію pH, бо кислотність середовища приблизно відповідає оптимальному pH для культивування *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410.

Підсумувавши даний підрозділ, культивування біологічно агенту необхідно проводити безперервним глибинним процесом з дробним підживленням в асептичних умовах.

Вибір типу ферментера

Для вищеописаного культивування, ферментер повинен мати наступні характеристики:

1. Для забезпечення стабільної температури ферментер необхідна наявність сорочки і датчика температури.
2. Для забезпечення масообміну необхідно використати мішалку. Оскільки про реологічні властивості середовища, які б сильно відрізнялися від води заявлено не було, а біологічний агент не потребує особливих умов культивування, можна взяти мішалку, що буде здатна ефективно працювати з великими об'ємами не в'язкої рідини, наприклад, така як турбінна мішалка.
3. Середовище має у своєму складі казеїн, що є білковим компонентом, який може спричинити посилене піноутворення. Щоб воно не призвело до негативних наслідків, варто встановити механічний піногасник.
4. Для забезпечення дробного підживлення ферментер має бути оснащений таймером та ємністю для розчина для підживлення.

Отже, необхідно встановити ферментер 10 $м^3$, з сорочкою для підтримання температури, турбінною мішалкою, додатковим механічним піногасником та обладнанням для підживлення. З цими вимогами може впоратись корейська фірма «Fermentec Co Ltd» [http://fermentec.co.kr/eng/product/plant-fermenter/], в якої можна замовити відповідне устаткування.

5.2. Обґрунтування підготовки повітря

Bacillus licheniformis ZJUEL31410 є факультативним аеробом, тому для отримання біомаси для виробничого біосинтезу доцільно буде проводити за безперервної подачі стерильного аераційного повітря через барботер. Підготовку посівного матеріалу та інокуляту здійснюють в приміщенні лабораторії та мікробіологічному боксі, тож повітря у цих приміщеннях стерилізують застосовуючи ультрафіолетове опромінення (УФ-лампи). Підготовку стерильного стисненого аераційного повітря для біореакторів здійснюють наступним чином:

1. Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту, на висоті 2- 3 м від найвищої точки будівлі, оскільки із збільшенням висоти над поверхнею концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується, тобто для проєктованого виробництва - на висоті 10 м (висота ферментера - 3 м, висота поверху 6 м, разом із косим дахом будівлі – 10 м);
2. Для звільнення повітря від грубого аерозолю – пилу, захисту компресорів від забруднення і зниження кількості контамінантів повітря очищають за допомогою фільтрів попереднього очищення. Пропоную обрати тканину Камінської, оскільки вона не потребує стерилізації;
3. Для досягнення підвищеного тиску з метою подолання опору фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях фільтрування, а також подолання гідравлічного опору під час 22 диспергування повітря у об’ємі культуральної рідини, повітря далі піддають стисненню у турбокомпресорі до 0,35–0,5 МПа (стиснення повітря в компресорі приводить до підвищення його температури до 120–250°С і збільшенню вологовмісту на одиницю об'єму);
4. Для охолодження нагрітого під час стиснення повітря та видалення вологи у краплевловлювачі, повітря охолоджують за допомогою водяного теплообмінного апарату;

5. Для остаточного видалення конденсованої вологи та вирівнювання тиску повітря подають у ресивер; для очищення повітря, що подається до усіх ферментерів цеху і видалення до 98% мікроорганізмів очищення проводять на головних фільтрах, які заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря;
6. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах, повітря надходить через колектори від головних фільтрів (встановлені безпосередньо на кожному ферментері, затримують 99,999% мікроорганізмів). Індивідуальними фільтрами варто обрати фільтри HEPA через їх високу ефективність і дешевизну [https://www.iso-aire.com/blog/what-is-a-hepa-filter-and-how-does-it-work#:~:text=A%20high%2Defficiency%20particulate%20air,it%20as%2099.97%25%20or%20BETTER.]

Технологічно і економічно виправданим у промисловості є спосіб очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів, тому що вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999%. Зважені в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному і дифузійному механізмам осадження. При експлуатації фільтрів необхідна їхня стерилізація. Найбільш ефективним методом є нагрівання вологою парою і витримка протягом визначеного часу при температурі 125–130°С. Після стерилізації фільтруючий матеріал висушують гарячим повітрям [23]

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

На фармацевтичних і мікробіологічних виробництвах контроль мікробної контамінації на кожному етапі технологічного процесу – від обробки обладнання та поверхонь до утримання виробничих приміщень – є обов’язковою складовою. Дезінфікуючі засоби стабілізують виробничий

процес, запобігаючи забрудненню патогенними мікроорганізмами, які можуть потім вплинути на процес вирощування культур або спричинити псування готової продукції. Підбір ефективних мийних і дезінфікуючих засобів має здійснюватися з урахуванням особливостей виробничого процесу та встановлених гігієнічних норм. Застосування засобів для дезінфекції забезпечує не лише відповідність нормативним вимогам виробництва та високу якість кінцевого продукту, а й підвищує рівень безпеки працівників, що також є однією з пріоритетних задач, яку ставлять перед собою всі фармацевтичні фірми.

Контроль мікробної контамінації здійснюється на кожному етапі технологічного процесу. Систематичний моніторинг і своєчасне реагування на будь-які відхилення від встановлених гігієнічних норм дозволяє запобігти розмноженню небажаних мікроорганізмів та забезпечити високий рівень санітарної безпеки.

Таблиця 5.1

Узагальнююча таблиця характеристики мийно-дезінфікувальних засобів

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
Засоби для миття та дезінфекції обладнання								
"ITS WATER PUR-260"	5,0% - гіпохлорит натрію, 5,0% - гідроксид калію; допоміжні речовини; вода – до 100%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Лужне не пінне миючий засіб на основі гідроксидів натрію і калію. Є прозорою рідиною зеленоватожовтого кольору із слабким специфічним запахом. Засіб добре змішується з водою. Виробник: ТзДВ «Пологівський хімічний завод «Коагулянт», Україна.	Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з корозійностійкого металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, фарфору, фаянсу, а також поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям, з епоксидної смоли, емалі і інших матеріалів.	Розчин готують шляхом розведенням у холодній воді у концентрації від 0.3 до 1%. Норма витрати робочого розчину: 100 мл/м². Способи обробки: протирання, зрошення, циркуляція.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Наказ від 17.11.2020 №2663. Термін дії до: 17.11.2025	1700 грн (20л засобу)	[11]
DR CIP FLUX	25-35% гіпохлорит натрію (4-6% активного хлору), 5-15% гідроксид натрію); допоміжні речовини; вода – до 100%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Висококонцентрований рідкий лужний засіб на основі гіпохлориту натрію. Проявляє дезінфікуючі властивості при низьких температурах, низьких концентраціях робочого розчину і нетривалому часу експозиції. Виробнк: «Draco-Bis Lewicki Marcin», Польща	Не спричиняє корозії металів. Не чинить негативного впливу на нержавіючу сталь, алюміній, пластмаси, тефлон, поліетилен, емаль, гуму, скло, бавовняні та синтетичні тканини.	Розчини готують шляхом розведення у холодній чи гарячій воді у концентраціях від 0,3% до 2%, в залежності від способу застосування. Способи обробки: зрошення, циркуляція	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Дата внесення: 10.06.2020 року.Термін дії до: 10.06.2025 року	1020 грн (20л засобу)	[12]

Продовження таблиці 5.1

Green Ros	Корос 70% (спирт, бензилідиметил [3-(міристоколаміно) пропил] амоній хлорид моногідрат, 2-гідроксипропанова кислота, 2-гідроксипропан-1,2,3-трикарбонових кислот, сполуки цинку), хлоргексидину біглюконат — 0,01%, запашник, ПАР, вода підготовлена.	Бактерії, віруси, гриби, спори	Універсальний засіб для дезінфекції будь-яких поверхонь, приміщень, обладнання, інвентаря, апаратури, меблів, систем вентиляції та кондиціонування повітря; також може бути використаний для обробки шкіри. Виробник: ТОВ "ГРИН ПЛАСТИК", Україна.	Засіб не спричиняє корозії металів, не пошкоджує скло, кераміку, полімери, гуму, одяг та тканини, пластмас. Добре видаляє жирові та білкові забруднення.	Засіб готовий для використання, застосовується у чистому вигляді. Способи обробки: зрошення, протирання.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Наказ від 13.01.2022 №63. Термін дії до: 13.01.2027 року	2600 грн (20л засобу)	[13]
ЕконормDEZ Експрес	60% - спирт ізопропіловий; 0,1% - алкілдиметилбензила моній хлорид; допоміжні речовини; вода – до 100%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Являє собою прозору безбарвну рідину. Універсальний засіб для дезінфекції будь-яких поверхонь, приміщень, обладнання, інвентаря, апаратури, меблів. Але дозволяється одночасно обробляти не більше 10% від загального об'єму приміщення. Після обробки поверхні не потребують промивання водою. Виробник: ТОВ «ДЕЗ-ЕКОМ», Україна.	Не спричиняє корозії металу та його сплавів, не пошкоджує скло, кераміку, пластмас, гуму, лакофарбовані покриття тощо.	Засіб готовий для використання, застосовується у чистому вигляді. Норма витрати робочого розчину: 30-50 мл/м². Способи обробки: зрошення, протирання.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Дата внесення: 19.08.2020. Термін дії до: 19.08.2025 року	6000 грн (20л засобу)	[14]

Засоби для миття та дезінфекції приміщень								
Віндез НОК	15% надоцтової кислоти, 25% перекису водню, 30% оцтової кислоти, допоміжні речовини, вода – до 100%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Концентрований засіб у формі прозорої безбарвної рідини з характерним запахом оцтової кислоти. Застосовується для дезінфекції виробничого обладнання та комунікацій, посуду, тари, інвентарю, поверхонь виробничих та інших приміщень. Не потребує змивання. Виробник: ТОВ «Торговий дім «Санітарний щит України», Україна.	Розчин не пошкоджує скляні поверхні, глазуровану кераміку, фарфор, плитку, хімічно стійкі полімери (поліпропілен, високощільний поліетилен) емальовані покриття та корозійностійкі метали.	Розчин готують розведенням у холодній воді з концентрацією: від 0,05% до 0,2%. Норма витрати робочого розчину: 100 мл/м² Способи обробки: зрошення, протирання.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Наказ від 19.09.2023 №1649. Термін дії до: 19.09.2028	2159.94 грн (20л засобу)	[15, 16]
Dezaldum 20	>15% бензалконію хлорид; > 10 % глутаровий альдегід, ізопропіловий спирт; н-ПАР, регулятор кислотності, комплексоутворювач, вода підготовлена – до 100%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Засіб являє собою прозору безбарвну або жовтуватого кольору рідину зі слабким запахом. Застосовується для дезінфекції та миття поверхонь. Після дезінфекції додаткового промивання не потрібно (але санітарно-технічне обладнання рекомендують промивають водою) Виробник: ТОВ «АТМА». Україна	Розчин не пошкоджує не корозійностійкі метали, гуму на основі натурального і синтетичного каучуку, пластмас, скло, емальовані ємності, поліпропілен, тканини.	Розчин готують розведенням у холодній воді у концентрації: 1:100. Норма витрати робочого розчину: 100 мл/м² (для протирання) Способи обробки: зрошення, протирання.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Наказ від 04.01.2021 №3. Термін дії до: 04.01.2026.	3792 грн (20л засобу)	[17]

Грін Лайн Преміум	Суміш четвертинних амонієвих сполук (ЧАС) – 20,0 %; додецилдипропілентриамін – 4,5 %; допоміжні речовини, вода – до 100%	Бактерії, віруси, гриби, спори	Являє собою прозору безбарвну рідину. Виробник: ТОВ "ІНТЕКС-МЕД", Україна.	Засіб не спричиняє корозії металів, не пошкоджує скло, кераміку, полімери, емаль, гуму, тканини.	Робочі розчини дезінфекційного засобу готуютьу холодній воді у концентрації: 1:100. Норма витрати робочого розчину: 100 мл/м². Способи обробки: зрошення, протирання.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Наказ від 29.09.2023 №1707.Термін дії до: 29.09.2028 року	4390 грн (5л засобу)	[18]
Засоби для дезінфекції рук працівників								
Софта-Ман ISO	Пропанол-2 (ізопропіловий спирт) 45%, пропанол-1 (пропіловий спирт) 30%; допоміжні речовини, вода – до 100%	Бактерії, віруси, гриби	Засіб прозорого кольору із специфічним запахом. Виробник B. Braun Medical AG, Швейцарія.	Засіб не спричиняє шкідливої дії на шкіру і одяг працівників	Засіб готовий для використання, застосовується у чистому вигляді. Для обробки рук використовується доза в не менше як 3 мл засобу. Способи застосування: зрошення, протирання.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Наказ від 29.09.2023 №1707. Термін дії до: 29.09.2028	3880 грн (10л засобу)	[19]
SOLNEX ACTIVE	Алкіл (С12-С16) диметилбензиламоній хлорид – 0,2 %; функціональні домішки, у том числі для пом'якшення та регенерації шкіри; очищена вода – до 100 %	Бактерії, віруси, гриби	Рідина прозорого кольору. Виробник: ТОВ "ІНТЕКС-МЕД", Україна.	Засіб не спричиняє шкідливої дії на шкіру і одяг працівників	Засіб готовий для використання, застосовується у чистому вигляді. Способи застосування: зрошення, протирання.	Дезінфекційний засіб внесено до Державного реєстру дезінфекційних засобів. Наказ від 13.01.2022 №63. Термін дії до: 13.01.2027	1590 грн (10л засобу)	[20]

"ITS WATER PUR-260". Лужний непінний миючий засіб з дезинфікуючою дією на основі активного хлору. Універсально може бути використаний як для дезінфекції приміщень (стіни, підлоги, тощо), так і для технологічного обладнання, трубопроводів, тари та інших об’єктів на підприємстві. Високоефективно видаляє жирові та білкові забруднення. В інструкції виробник радить не застосовувати для обробки кольорових металів; а також зазначає, що засіб запобігає утворенню стійких до дезінфектанту штамів. Робочі розчини не спричиняють подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки очей. Рекомендується для використання на харчових підприємствах. (*Додаток 1*)

DR CIP FLUX. Висококонцентрований рідкий лужний безпінний засіб на основі гіпохлориту натрію. Володіє хорошими миючими, знежирюючими, дезінфікуючими властивостями та відбілюючим ефектом. Має особливо сильну бактерицидну, фунгіцидну дію. Добре підтримує дезінфікуючі властивості при низьких температурах, низьких концентраціях робочого розчину і нетривалому часу експозиції. Чудово розчиняється у воді. Не чинить негативного впливу на оброблювані поверхні (за умов дотримання рекомендацій щодо застосування). Основний напрям застосування – мийка та дезінфекція робочого обладнання, трубопроводів та тари. Гарно підходить для CIP-мийки. Рекомендується для використання на фармацевтичних та мікробіологічних підприємствах.

Green Ros. Універсальний засіб для дезінфекції будь-яких поверхонь, приміщень, обладнання, інвентаря, апаратури, меблів, систем вентиляції та кондиціонування повітря. Склад засобу настільки безпечний та нешкідливий, що розчин може бути використаний для дезінфекції шкіри та ран. Не містить шкідливих для здоров'я людини та довкілля речовин. Рекомендується для використання на харчових підприємствах.

ЕконормDEZ Експрес. Універсальний засіб для дезінфекції будь-яких поверхонь, приміщень, обладнання, інвентаря, апаратури, меблів. Але дозволяється одночасно обробляти не більше 10% від загального об'єму приміщення. Після обробки поверхні не потребують промивання водою. Не залишає плям та нальоту. Рекомендується для використання на фармацевтичних та мікробіологічних підприємствах. (*Додаток 2*).

Віндез НОК. Особливістю цього засобу є якісна дезінфекція при мінімальних концентраціях, невисоких температурах і короткому часі дії. Зручний у використанні, не потребує змивання. Демонструє повний біологічний розпад. Засіб і його робочі розчини не мають віддалених наслідків для здоров'я; робочі розчини належать до малонебезпечних речовин при нанесенні на шкіру. Оскільки у складі є перекис водню – не радимо для обробки металів, адже викликає корозію. Засіб рекомендується для використання на фармацевтичних та мікробіологічних підприємствах.

Dezaldum 20. Використовується для дезінфекції поверхонь в приміщеннях, поверхонь приладів, апаратів, твердих меблів. Після дезінфекції додаткового промивання не потрібно. Також може застосовуватись для обробки санітарно-технічного обладнання, але в такому разі варто все ж промивати його додатково водою. Під час використання засобу необхідно користуватися захисними засобами (нітрилові рукавички, окуляри, респіратор, тощо), адже в нерозбавленому вигляді може викликати слабке подразнення шкірних покривів і слизової оболонки очей. Засіб рекомендується для використання на фармацевтичних та мікробіологічних підприємствах. (*Додаток 3*).

Грін Лайн Преміум. Може бути використаний як для обробки поверхонь приміщення, так і для обладнання та приладів. Під час готування робочих розчинів чи безпосереднього використання засобу можуть знадобитись захисні засоби (нітрилові рукавички, окуляри, респіратор тощо), адже концентрований дезинфікат може викликати слабке

подразнення шкіри і слизової оболонок. Рекомендується для використання на фармацевтичних та мікробіологічних підприємствах.

Софта-Ман ISO. Засіб має пролонговану антимікробну дію, що зберігається не менше трьох годин. Для якісної дезінфекції виробник радить втирати антисептик в шкіру до висихання, але не менше 30 секунд. Він не викликає подразнення шкіри, але може спричиняти помірне подразнення слизових оболонок очей. Рекомендується для використання на фармацевтичних та мікробіологічних підприємствах.

SOLNEX ACTIVE. Засіб має пролонговану антимікробну дію, що зберігається до трьох годин. Не викликає подразнення шкіри, але може спричиняти помірне подразнення слизових оболонок при попаданні на них. Для найкращого результату варто нанести 3 мл засобу на руки та втирати до повного висихання (30-60 секунд). Рекомендується для використання на фармацевтичних та мікробіологічних підприємствах.

5.3.2 Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва.

Процес біосинтезу ферменту еластази із використанням бактерій *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 триває 52 днів і включає організацію наступного обладнання: інокулятори об'ємом 20 л, 160 л, 1.25 м^3; ферментер для основного виробництва об’ємом 10 м^3; реактори-змішувачі для підготовки та стерилізації поживного середовища й титрувальних розчинів; установки безперервної стерилізації; качалки; а також спеціальні бокси та лабораторне оснащення.

Виробничий процес здійснюється в окремих приміщеннях: у біотехнологічному цеху для проведення біосинтезу, та в лабораторії для виконання допоміжних операцій, обладнаній автоклавами, термостатами, холодильниками, ламінарним боксом та приладами для необхідних контрольних процедур.

На рисунку 5.1 подано орієнтовну схему приміщення, призначеного для отримання еластази. При проектуванні приміщення враховано габарити обладнання, а також мінімально необхідні відстані між апаратами (не менше 1 метра) та від стін (від 1,5 метра).

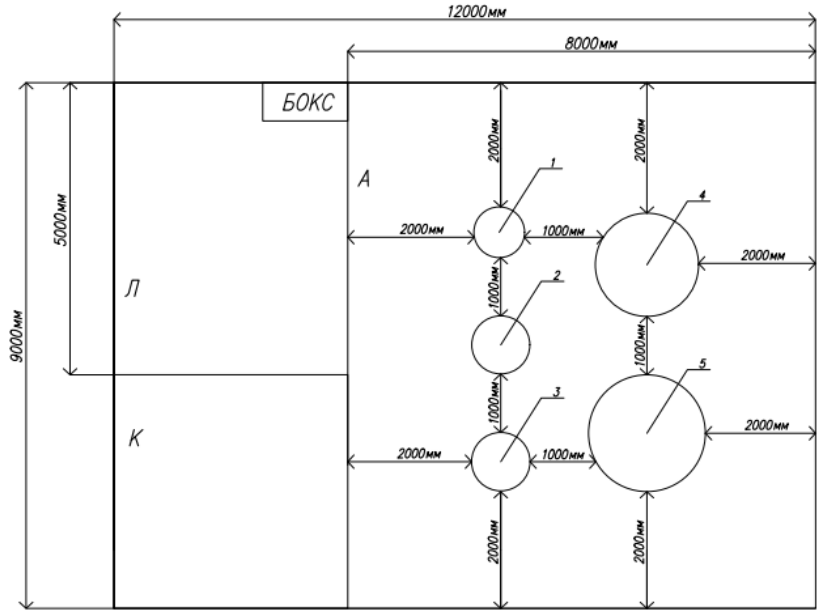


Рис. 5.1. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва еластази з використанням Bacillus licheniformis ZJUEL31410 (А – цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту (1 – інокулятор об'ємом 20 л (І-1), 2 – інокулятор об'ємом 160 л (І-3), 3 – інокулятор об'ємом 1250 л (І-5), 4 – установка безперервної стерилізації об'ємом 20 л (УБС-20), 5 - ферментер (ФР-8) об'ємом 10 000 л; Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками).

Варто зважати на те, що для біотехнологічних виробництв, які використовують ферментаційне обладнання великих об'ємів (ферментери від 1 м³ і більше), слід враховувати будівельні норми. Грунтуючись на цьому, ширину будівлі приймаємо згідно до найближчого стандартного значення – 12 м. Хоч довжина будівлі і має бути кратною розміру довжин стандартних будівельних плит (6 м), але в деяких випадках дозволяється брати параметри, що кратні 3 м. Оскільки ідеальною довжиною для нашого приміщення є 9 м, то зупинимось на цьому варіанті. Габаритні параметри основного обладнання подано в таблиці 5.3

Таблиця 5.3

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва еластази з використанням *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер (ФР-8)	10 000	2,2	5,8
Інокулятор (І-5)	1 250	1	1,95
Інокулятор (І-3)	160	0,6	0,55
Інокулятор (І-1)	20	0,95	1,35
Реактор-змішувач (Р-4) для приготування Композиції А	150	0,9	1,72

Закінчення таблиці 5.3

Реактор-змішувач (Р-2) для приготування Композиції А	15	0,8	1,2
Установка безперервної стерилізації (УБС-5)	5 000	2	1,5
Висновок:	**11 600**		

Опираючись на дані з таблиці 5.3, загальний обсяг реакторів-змішувачів, установки безперервної стерилізації та апаратів для вирощування посівного матеріалу і біосинтезу складає 11,600 м³.

Для підтримання чистоти виробничих приміщень підлогу миють щодня, тобто 52 рази. Генеральне прибирання, яке охоплює миття стін, підлоги, вікон тощо, проводять один раз на місяць, а враховуючи, що на біосинтез ферменту йде 52 дні, такі поглиблені прибирання в нас проводитимуться двічі. При розрахунку необхідної кількості мийних та дезінфікуючих засобів слід визначити приблизну площу оброблюваних поверхонь, взяти до уваги як підлогу, так і стіни до певної висоти. Оскільки деякі компоненти поживного середовища подаються до ферментера за допомогою самопливу, потрібно також врахувати, що частина обладнання розташована безпосередньо над ним. Згідно з апаратною схемою, на висоті 3,6 м на майданчиках біля інокуляторів знаходяться: реактор-змішувач (Р-2) для приготування композиції А, та реактор-змішувач (Р-4) для приготування композиції А. Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу складає 108 м² (12×9 м), а площа стін розраховується за формулою: $[(8 \times 6) + (9 \times 6)] \times 2 + [(4 \times 6) + (5 \times 6)] \times 2 + (4 \times 6) \times 4 = 204$ м^2 + 108 м^2 + 144 м^2 = 456 м². Загальна площа обробки складає 108 + 456 = 564 м². Показники загальної площі поверхні для обробки мийними засобами наведено в таблиці 2.2.2.

Таблиця 5.4

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	72	204	276
Мікробіологічна лабораторія	20	108	128
Приміщення з качалками	16	144	144
Загальна площа	**108**	**456**	**564**

Виробництво еластази передбачає 38 виробничі цикли. Оскільки перед кожним циклом проводиться миття обладнання, а після завершення останнього циклу виконується додаткове миття, загальна кількість обробки обладнання становить 39. Таким чином, сумарний об'єм для миття та дезінфекції дорівнює:

$$11{,}600 \times 39 = 452{,}400 \text{ м}^3.$$

Узагальнені результати розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь виробничий період подано в таблиці 5.5.

Таблиця 5.5

Розрахунок загальної площі миття оброблюваного об'єкту за весь період біосинтезу еластази *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, $м^2$ ($м^3$)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, $м^2$ ($м^3$)
Обладнання	11,600	39	452,400
Підлога	108	52	5616
Стіни, двері, вікна	456	2	912

Для миття ємностей використовується CIP-мийка. Витрати робочого розчину складають від 20 до 30% від об'єму обладнання, яке підлягає миттю. Приймаючи

середній рівень витрат 25%, для очищення та дезінфекції 452 985 м³ обладнання необхідно використовувати:

$$452{,}400 \times 0{,}25 = 113{,}100 \text{ м}^3 \text{ засобу на рік.}$$

Інформацію про вибір мийних і дезінфікуючих засобів доцільно подавати у вигляді узагальненої таблиці 2.4. При виборі таких засобів важливо враховувати їх ефективність, вартість, а також витрати на обробку необхідної площі або об’єму. Зазвичай для обробки 1 м² поверхні потрібно 100 мл мийного чи дезінфікуючого розчину.

Таблиця 5.6

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва еластази

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м^2	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
ITS WATER PUR-260[1]	Обладнання	1%	452,400	113,100	85	0,85	96,14
DR CIP FLUX[2]	Обладнання	2%	452,400	113,100	51	1,02	115,36
Green Ros[3]	Обладнання	100%	452,400	113,100	130	130	14 703
ЕконормDEZ Експрес[4]	Обладнання	100%	452,400	113,100	300	300	16 965*
Віндез НОК[5]	Поверхні приміщень, обладнання	0,2%	6 980.4	699	108	0,216	150,98
Dezaldum 20[6]	Поверхні приміщень, обладнання	1%	6 980.4	699	189,6	1,896	1 325,3
Грін Лайн Преміум[7]	Поверхні приміщень, обладнання	1%	6 980.4	699	878	8,78	6 137,22

* - розрахунок було проведено згідно норм витрат засобу для обробки обладнання 50 мл/м² (всі інші засоби – 100 мл/м²);
Джерела: 1 – [11]; 2 – [12]; 3 – [13]; 4 – [14]; 5 – [15, 16]; 6 – [17]; 7 – [18].

Опираючись на результати розрахунків, наведених у таблиці 5.6, нам добре могли б підійти для миття та дезінфекції «ITS WATER PUR-260» чи «DR CIP FLUX», але в їх складі присутній хлор, залишки якого можуть погано вплинути на процес самого біосинтезу. Тому, було вирішено обрати основним засобом для обробки обладнання – «Green Ros». Для очищення ж поверхонь обладнання, стін, вікон, дверей і підлоги найоптимальніше буде обрати «Віндез НОК» за його високу ефективність та невисоку вартість.

Водночас потрібно враховувати необхідність запобігати появі мікроорганізмів, які набувають стійкості до застосовуваних дезінфікуючих засобів. З цією метою рекомендується регулярно змінювати засоби відповідно до встановленого графіка чергування, який передбачає заміну кожні 1–3 місяці.

Як альтернативу «Green Ros» можна взяти «ЕконормDEZ Експрес» для обробки обладнання, що має середню ціну як для свого сегменту.

«Віндез НОК» має перекис водню у складі, що викликає корозію деяких металів, тож варто це враховувати при митті чи дезінфекції приміщення. Його заміною може бути «Dezaldum 20», який досить прийнятний по вартості.

5.4 Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування Bacillus licheniformis ZJUEL31410

Склад поживного середовища для отримання інокуляту наступна (г/л):

-Пептон – 6

-Дріжджовий автолізат – 2

-Екстракт яловичини – 4

-NaCl – 5

Можна поділити його на 2 композиції: органічну, що потребує м’якший режим стерилізації (А), оскільки органічні сполуки можуть розкладатись при високих температурах, та неорганічну, який треба буде стерилізувати в ферментером у більш жорстких умовах, для подальшого зменшення шансу контамінації.

В склад композиції А будуть входити пептон, дріжджовий екстракт та екстракт яловичини, вона буде стерилізуватись при 112 ℃ 30 хв за тиску 0.05 МПА. В склад композиції Б буде входити NaCl, вона буде стерилізуватись при 131 ℃ 40 хв за тиску 0.15 МПА.

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 0,84 л середовища, г**	**Композиція**	**Об’єм композиції, л**
Пептон	6	5,04	А	0,17

Закінчення таблиці 5.7

Дріжджовий екстракт	2	1,68		
Екстракт яловичини	4	3,36		
Вода		0.17 (л)		
NaCl	5	4.2	Б	0,67
Вода		0.67 (л)		
Усього				**0.84**

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 20 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 8,4 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
Пептон	6	50,4	А	1,7
Дріжджовий екстракт	2	16,8		
Екстракт яловичини	4	33,6		
Вода		1,7 (л)		
NaCl	5	42	Б	6,7
Вода		6,7 (л)		
Усього				**8,4**

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 160 л

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 76 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
Пептон	6	456	А	15
Дріжджовий екстракт	2	152		
Екстракт яловичини	4	304		
Вода		15 (л)		
NaCl	5	380	Б	61
Вода		61 (л)		
Усього				**76**

Таблиця 5.10

Композиції стерилізації компонентів для інокулятору 1,25 м^3

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 690 л середовища, г**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
Пептон	6	4140	А	138
Дріжджовий екстракт	2	1380		
Екстракт яловичини	4	2760		

Закінчення таблиці 5.10

Вода		138 (л)		
NaCl	5	3450	Б	552
Вода		552 (л)		
Усього				**690**

Склад середовища для виробничого біосинтезу відрізняється від отримання інокуляту. Його склад наступний (г/л):

-Глюкоза – 47,5

-Казеїн – 11,3

-Кукурудзяне борошно – 6,16

-K_2HPO_4 – 12,92

-$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,34

Оскільки при виробничому біосинтезі буде використовуватись УБС-5, то розділення на неорганіку та органіку не є необхідним. Тобто всі складові цього середовища будуть входити в одну композицію А. Процес стерилізації в УБС-5 проходить при температурі 135 °С. Виробнича потужність даної моделі: 5 тон/год. Але оскільки у середовищі для виробничого біосинтезу присутнє кукурудзяне борошно – є потреба в попередньому розварюванні цього складнику в окремому збірнику.

Таблиця 5.11

Склад композиції для стерилізації компонентів для ферментеру 10 м^3

Компонент поживного середовища	**Вміст, г/л**	**Кількість для приготування 6,27 м^3 середовища, кг**	**Композиція**	**Об'єм композиції, л**
Глюкоза	47,5	297,83	А	6270 (л)
Казеїн	11,3	70,85		
Кукурудзяне борошно	6,16	38,62		
Вода		5634 (л)		
Конденсат		626 (л)		
K_2HPO_4	2.06	12,92		
Вода		8 (л)		
Конденсат		2 (л)		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.34	2,13		
Усього				**6270**

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу еластази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
І-1	Інокулятор	1	*Лабораторний інокулятор 20 л. Габарити: 800*710*2600 мм* [https://www.alibaba.com/product-detail/UL-Certificate-Lab-Chemical-Bioreactor-Jacketed_1600288063883.html?spm=a2700.7724857.0.0.1886265cVRqVat]
Р-2	Реактор	1	*Промисловий реактор 15 л. Номінальний діаметр - 500 мм* [https://www.alibaba.com/product-detail/100l-200l-300l-500l-Jacket-Heating_62247859230.html?spm=a2700.7724857.0.0.35f17deeU7OheI]
І-3	Інокулятор	1	*Інокулятор 150 л. Матеріал - нержавіюча сталь, є сорочка, механічний піногасник. Габарити 1004*2120 мм* [https://www.zhanghua1976.com/Reactor-tank/30l-32000l-pressure-vessel-stainless-steel-jacketed-reactor?_gl=1*1jbskk9*_up*MQ..*_gs*MQ..&gclid=CjwKCAiApsm7BhBZEiwAvIu2XyhsOcGBIEFuI-RDx-gP6eVsD2jGOo5eQ3t-Wg5wPh6sQ21vxTvxixoCgXcQAvD_BwE]

Продовження таблиці 6.1

Р-4	Реактор	1	*Промисловий реактор 160 л. Номінальний діаметр - 500 мм* [https://www.alibaba.com/product-detail/100l-200l-300l-500l-Jacket-Heating_62247859230.html?spm=a2700.7724857.0.0.35f17deeU7OheI]
І-5	Інокулятор	1	*Інокулятор 1,25 м^3. Матеріал - нержавіюча сталь, є сорочка, механічний піногасник. Габарити - 1000*1950*1000 мм* [https://brouwland.com/en/fermentation-vessels/829-speidel-fermentation-tank-fs-mo-1250-litres.html]
Р-6	Реактор	1	*Промисловий реактор 1 м^3.* [https://www.indiamart.com/proddetail/1-cubic-meter-process-reactors-22643409591.html?srsltid=AfmBOoqfgv5PNG6HSLKrBJOvSahXfDQmji_afU6k8I6KXxwj2P0V6C8f]
УБС-5	Установка безперервної стерилізації	1	*Установка безперервної стерилізації* *Виробнича потужність: 5 тон/год.* *Габарити: 2500 * 1500 * 2000 мм.* [http://www.sdlcentrifuge.com/9-continuous-sterilization-system/192767/]
ФР-8	Ферментер	1	*Ферментер 10 м^3. Матеріал - нержавіюча сталь, є сорочка, механічний піногасник Габарити: 2200 * 5800 * 2200 мм.* [https://www.alibaba.com/product-detail/10000-liter-10m3-high-pressured-conical_1600170295485.html?spm=a2700.7724857.0.0.25fb5346Wjucql]
Н-9, 10, 11, 12	Насос	1	*Швидкість потоку: до 400 м/год.* [https://tcmagneticpump.com/product/imc-grease-lubricated-metal-magnetic-centrifugal-pump/]

Закінчення таблиці 6.1

ПЗ-13	Повітрозабірник	1	*Повітрозабірник з нержавіючої сталі (AxelAir Ventilation)* *Діаметр – 160 мм* [https://www.syveco.com/en/stainless-steel-air-intake-for-expanded-pe-duct.html]
Ф-14	Фільтри попереднього, головного очищення	2	*Зірчастий фільтр із поліефірного нетканого матеріалу з ПТФЕ-покриттям, клас М, 2,2м², максимальна температура – 150 °С* [https://www.kaercher.com/ua-uk/aksesuari/zirchastii-filtr-iz-poliefirnogo-netkanogo-materialu-z-ptfe-pokrittjam-klas-m-2-2m2-69076510.html]
К-15	Компресор	1	*Повітряний компресор. Продуктивність – 130 м³/год* [https://www.gemmecotti.com/chemical-pumps]
Т-16,18	Теплообмінник	2	*Промисловий осушувач повітря Dryair DK 50 Продуктивність - 130 м³/год,* [https://dalgakiran.ua/uk/products/refryzheratorni-osushuvachi-stysnenogo-povitrya-dalgakiran-dryair-seriyi-dk/]
Р-17	Ресивер	1	*Промисловий ресивер. Об'єм – 500 л.* [https://www.dayuwz.com/Custom-500-20000L-Air-Receiver-Tanks-Compressed-Air-Tank-Gas-Storage-Tank-pd572847698.html]
Ф-20,21,22,23	Фільтри індивідуального очищення	3	*ULPA фільтри, клас очищення U15* [https://selton.com.ua/en/products/filtry-hepa-ulpa/]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка поживного середовища

ДР 1.1. Приготування поживного середовища для колб для качалок

ДР 1.1.1. Приготування композиції А

На технічних вагах відважують 5,04 г пептону, 1,68 г дріждового екстракту, 3,36 г екстракту яловичини, поміщають в колбу 0.2 л в яку було додано мірним циліндром 0.1 л такий же об'єм води, перемішують, закривають ватно-марлевим корком, перемішують і стерилізують в автоклаві при 112 ℃ (30 хв).

ДР 1.1.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах відважують 4,2 г NaCl. Наважку вносять у колбу 1 л**,** доливають 0,4 л води дистильованої за допомогою мірного циліднра на 500 мл, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при 131 ℃ (40 хв).

ДР 1.2. Приготування поживного середовища для інокулятору 20 л

ДР 1.2.1. Приготування композиції А

На технічних вагах відважують 50,4 г пептону, 16,8 г дріждового екстракту, 3,4 г екстракту яловичини, поміщають в колбу 2 л в яку було додано мірним циліндром 1 л такий же об'єм води, перемішують,

закривають ватно-марлевим корком, перемішують і стерилізують в автоклаві при 112 ℃ (30 хв).

ДР 1.2.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах відважують 42 г NaCl. Наважку вносять у інокулятор (І-1)**,** доливають 4 л води питної з системи водопостачання , закривають ватно-марлевим корком і стерилізують при 131 ℃ (40 хв).

ДР 1.3. Приготування поживного середовища для інокулятору 160 л

ДР 1.3.1. Приготування композиції А

На технічних вагах відважують 456 г пептону, 152 г дріждового екстракту, 304 г екстракту яловичини, поміщають в реактор 15 л (Р-2) в який було додано 10 л води питної з системи водопостачання, перемішують і стерилізують при 112 ℃ (30 хв).

ДР 1.3.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах відважують 380 г NaCl. Наважку вносять у інокулятор (І-3)**,** доливають 40 л води питної з системи водопостачання і стерилізують при 131 ℃ (40 хв)

ДР 1.4. Приготування поживного середовища для інокулятору 1,25 $м^3$

ДР 1.4.1. Приготування композиції А

На технічних вагах відважують 4140 г пептону, 1380 г дріждового екстракту, 2760 г екстракту яловичини, поміщають в реактор 150 л (Р-4) в який було додано 100 л води питної з системи водопостачання, перемішують і стерилізують при 112 ℃ (30 хв).

ДР 1.4.2. Приготування композиції Б

На технічних вагах відважують 3450 г NaCl. Наважку вносять у інокулятор (І-5)**,** доливають 400 л води питної з системи водопостачання , закривають і стерилізують при 131 ℃

ДР 1.5. Приготування поживного середовища для виробничого ферментеру 10 м^3

ДР 1.5.1. Приготування композиції А

Ваговим дозатором відважують 38,62 кг кукурудзяного борошна, поміщають в реактор 1 м^3 (Р-6), в який було додано з системи водопостачання 500 л води питної, перемішують та розварюють при 70 ℃ 20 хв, після чого перекачують вміст до УБС-5. В установку безперервної стерилізації поступово додають 297,83 кг глюкози, 70,85 кг казеїну, 12,92 кг K_2HPO_4, 2,13 кг MgSO4·7H2O та доливають 5134 л води питної. Вміст стерилізується зі швидкістю 5 тон/год, після чого самоплином потрапляє в ферментер (ФР-8).

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (ПЗ-10) у найвищій точці Н = 10 м.

ДР 2.2. Очищення від грубих домішок

Попередню очистку повітря здійснюють на ПТФЄ фільтрі грубого очищення (Ф-14). Очистка від грубих домішок проводиться з ефективністю Е = 90%, затримуються частинки діаметром більше 50 мкм.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Для забезпечення умов аерації та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря стискають у компресорі (К-15), відбувається нагрівання до 120-200 °С, тиск становить 0,35 МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Стиснене повітря (від ДР 1.3) необхідно охолодити в теплообміннику-осушувачі (Т-16) до температури 25-30 ºС для подальшого видалення надлишкової вологи.

ДР 2.5. Видалення вологи та нагрівання повітря

Для видалення вологи використовується ресивер (Р-17), в якому усуваються пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря.. Оптимальна вологість повітря після очищення має становити 60-70%. Нагрівання проводиться у теплообміннику-нагрівачі (Т-18) при температурі 40-50 °С, вологість повітря після має становити 50 %.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря проходить очищення в головному фільтрі (Ф--19), де видаляється 95% залишкових домішок. Зміну фільтрувального матеріалу рекомендується проводити двічі на рік.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним посівним апаратом або ферментером встановлюється індивідуальний фільтр, який забезпечує 99,999% очищення повітря.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 зберігають у пробірці на скошеному агаризованому середовищі МПА, при температурі 4±2°С. Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1…2 рази на місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при t = 30±1 ºС (48 год).

ТП 3.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 3.2.) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при t = 30±1 ºС (24 год).

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об’ємом 1 л з композицією Б (від ДР 1.1.2.) вносять композицію А (від ДР 1.1.1.), перемішують і розливають по 140 мл у 6 качалочні колби об’ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 (від ТП 3.3.) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру),

піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (250 об/хв) при t = 30±1 ºС (12 год). Після культивування здійснюють мікробіологічний контроль культуральної рідини.

ТП 3.5. Вирощування інокуляту в посівному апараті 20 л

В асептичних умовах в балони для асептичної передачі вносять композицію А (від ДР 1.2.1) та композицію Б (від ДР 1.2.2), подають їх у посівний апарат об'ємом 20 л. Через засівну колбу вносять 0.84 л посівного матеріалу (ТП 3.4.). Культивують при 250 об/хв мішалки та температурі 30±1 ºС впродовж 12 год. Кожні 6 год відбирають проби культуральної рідини і здійснюють мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси.

ТП 3.6. Вирощування інокуляту в посівному апараті 160 л

В асептичних умовах в балони для асептичної передачі вносять композицію А (від ДР 1.3.1) та композицію Б (від ДР 1.3.2), подають їх у посівний апарат об'ємом 160 л, після чого самоплином з інокулятора 5 л вносять посівний матеріал (від ТП 3.5). Культивування здійснюють при швидкості перемішування 250 об/хв та температурі 30±1 ºС впродовж 12 год. Кожні 12 год відбирають проби культуральної рідини і здійснюють мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси.

ТП 3.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті 1,25 м^3

В асептичних умовах в балон для асептичної передачі вносять композицію композицію А (від ДР 1.4.1) та композицію Б (від ДР 1.4.2),

подають їх з реактора самоплином у посівний апарат об’ємом 1,25 м^3, після чого самоплином з інокулятора 160 л вносять посівний матеріал (від ТП 3.6). Культивування здійснюють при швидкості перемішування 250 об/хв та температурі 30±1 ºС впродовж 24 год. Кожні 12 год відбирають проби культуральної рідини і здійснюють мікробіологічний контроль та визначають концентрацію біомаси.

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1. Виробничий біосинтез (отримання біомаси)

У ферментер об’ємом 10 м^3 самоплином з установки безперервної стерилізації подають композицію А (від ДР 1.5.1), після чого через трубу перетискання вносять інокулят (від ТП 3.7.) Культивування здійснюють при швидкості перемішування 220 об/хв та температурі 30±1 ºС впродовж 24 год до досягнення активності ферменту 250 од/л. Кожні 12 год відбирають проби культуральної рідини і здійснюють мікробіологічний контроль та визначають активність еластази, концентрацію біомаси та джерел азоту та вуглецю.

РОЗДІЛ 8. ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Одним з найефективніших методів буде осадження та хроматографічна очистка ферменту.

На першому етапі — осадження — використовуються фізико-хімічні методи, зокрема додавання солей (наприклад, сульфату амонію) або зміна pH середовища для зниження розчинності білків. Цей процес дозволяє сконцентрувати фермент та відокремити його від більшості домішок за рахунок різниці у розчинності. Осаджений фермент потім центрифугують і розчиняють у буфері для подальшої очистки.

Другим етапом є хроматографічна очистка, яка дозволяє досягти високого ступеня чистоти ферменту. Залежно від властивостей білка, застосовують іонообмінну, гель-фільтраційну, афінну або гідрофобну хроматографію. Кожен метод забезпечує розділення компонентів суміші за специфічними фізико-хімічними характеристиками — зарядом, розміром, спорідненістю до лігандів тощо.

В статті з виробничого біосинтезу [24] вже був вказаний метод очистки фермента, і полягає в наступному:

1. Центрифугувати культуральну рідину при 16 700 g 10 хв при 4 °C.
2. Додати в супернатант з минулого етапу амоній сульфат (500 г/л), щоб фермент випав в осад при 4 °C.
3. Відцентрифугувати осад при 4 °C 10 000 g 10 хв.
4. Розчинити осад в буферному розчині pH 7.0 (1 мМ CaCl2, 10 mM буферу P-10), очистити від солей на хроматографічній колонці Bio-Gel P-10 40 см.

5. Очистити суміш з минулого етапу на колонці Sephadex-SP 37 см на буфері Р-10 з градієнтом 20-150 мМ.

6. Зібрати після очистки середню фракцію, концентрувати за допомогою ультрафільтрації через мембрану РМ-5.

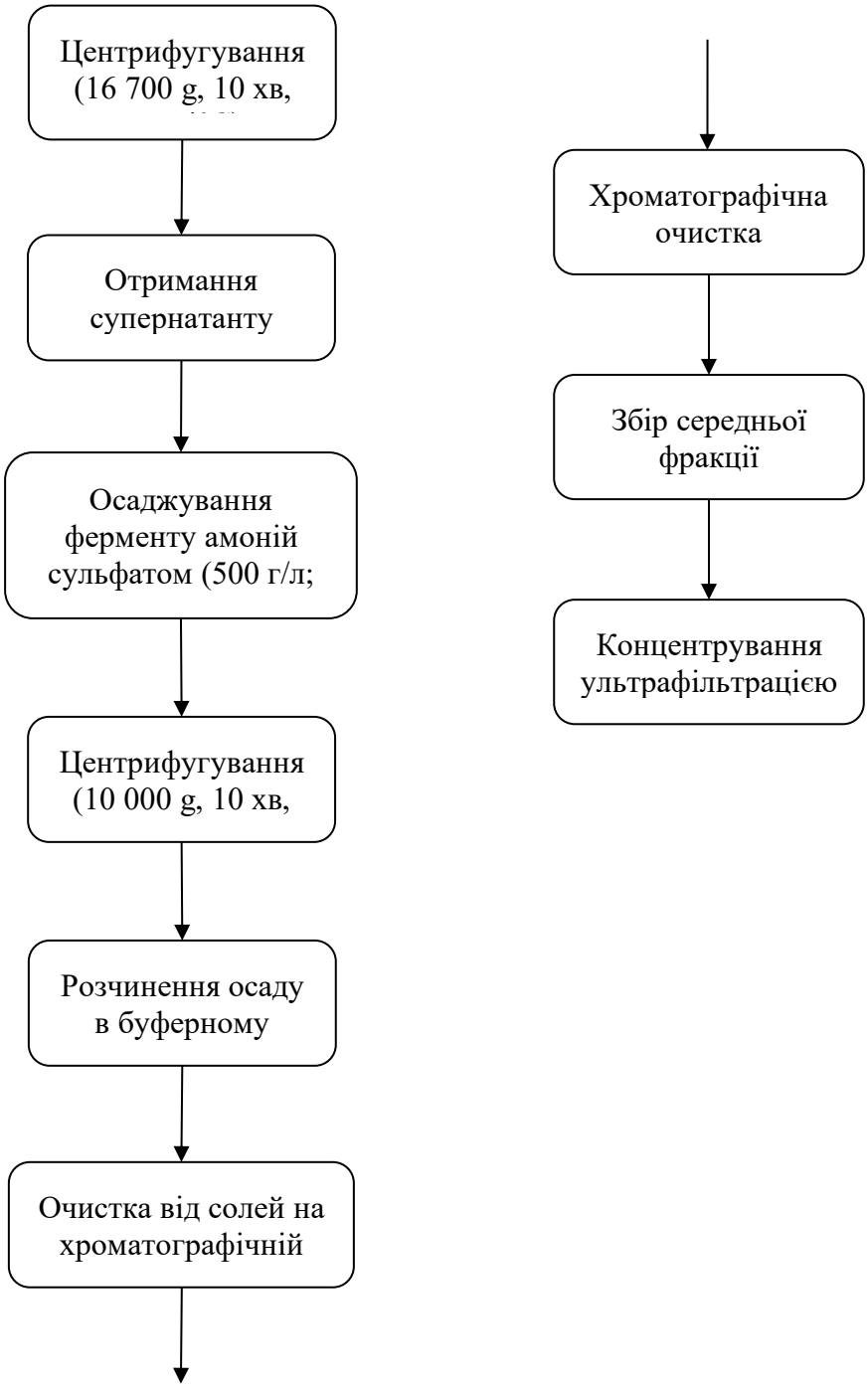


Рис 8.3. Стадії виділення і очищення еластази *Bacillus licheniformis*

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА ЕЛАСТАЗИ

9.1. Мікробіологічний контроль поживного середовища

Для мікробіологічного контролю рідкого поживного середовища може використовуватись метод прямого посіву [25] Необхідно нанести 0.1 мл контрольованого середовища на СА/МПА (для виявлення грибів або бактерій відповідно) та рівномірно розподілити цей об'єм по поверхні. Культивувати чашки необхідно при 30…32 °С протягом 6…8 годин. Якщо середовище стерильне і аналіз був виконаний правильно, на поверхні середовища будуть відсутні колонії мікроорганізмів.

9.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Можна провести прямий висів на МПА. Якщо культура була чиста, тоді на чашках проростуть тільки рівні округлі бліді гладкі колонії неправильної форми *Bacillus licheniformis* [https://tgw1916.net/Bacillus/licheniformis.html]

Рис.5.1. Колонії *Bacillus licheniformis* на чашці Петрі

Також необхідно використати мікроскопіювання. [25]. Оскільки *B. lichenformis* є бактерією з малими розмірами, необхідно використовувати об’єктив на х90 та імерсійну систему. На знежирене предметне скельце треба нанести краплю препарату, розподілити по поверхні, висушити при кімнатній температурі, зафіксувати препарат за допомогою спиртівки, нанести одну краплю метиленового синього для фарбування і роздивитись його під мікроскопом. Бактерії являють собою палички довжиною 1.5-3 мкм і 0.6-0.8 мкм в діаметрі.

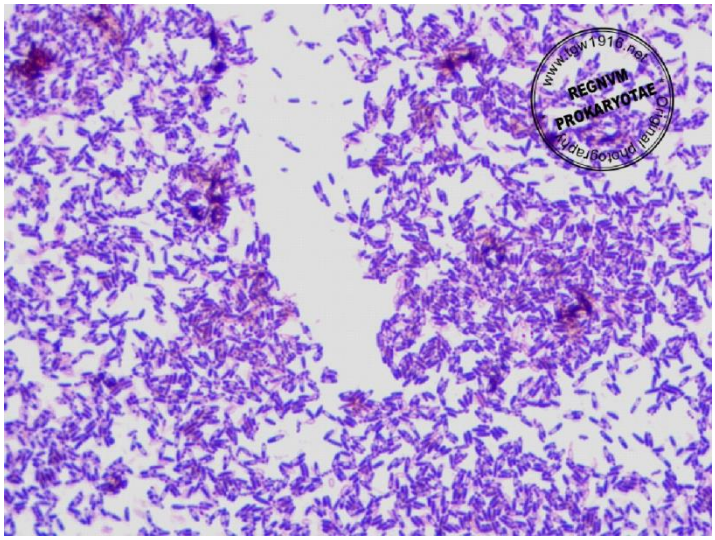


Рис. 5.2. *Bacillus licheniformis* в світловому мікроскопі.

9.3. Контроль активності еластази

Еластолітичну активність можна контролювати методом Сачера. Він полягає в наступному:

- Культуральну рідину центрифугують при 1500 g протягом 15 хв, відбираючи супернатант
- Препарат ферменту утримують з еластином-Конго червоним в буфері борної кислоти (pH 7.8) протягом 20 хв при 37 °C
- Реакцію зупиняють за допомогою 2 мл фосфатного буферу (pH 6.0)
- Поглинання зчитують при довжині хвилі 495 нм [3]

9.4. Концентрація джерела карбону

Основним джерелом вуглецю в даному середовищі виступає глюкоза. В розчині її можливо виявити поляриметричним методом.

Глюкоза є оптично-активною речовиною що змінює кут заломлення світла яка проходить через її розчин. При різній концентрації глюкози зміна кута заломлення буде різна. Для визначення концентрації відносно показників приладу будується калібрувальна крива за допомогою розчинів з вже відомою концентрацією глюкози [26].

Методика полягає в наступному:

- Відібрати зразок культуральної рідини
- Відфільтрувати зразок
- Відібрати зразок у кювету
- Провести вимірювання

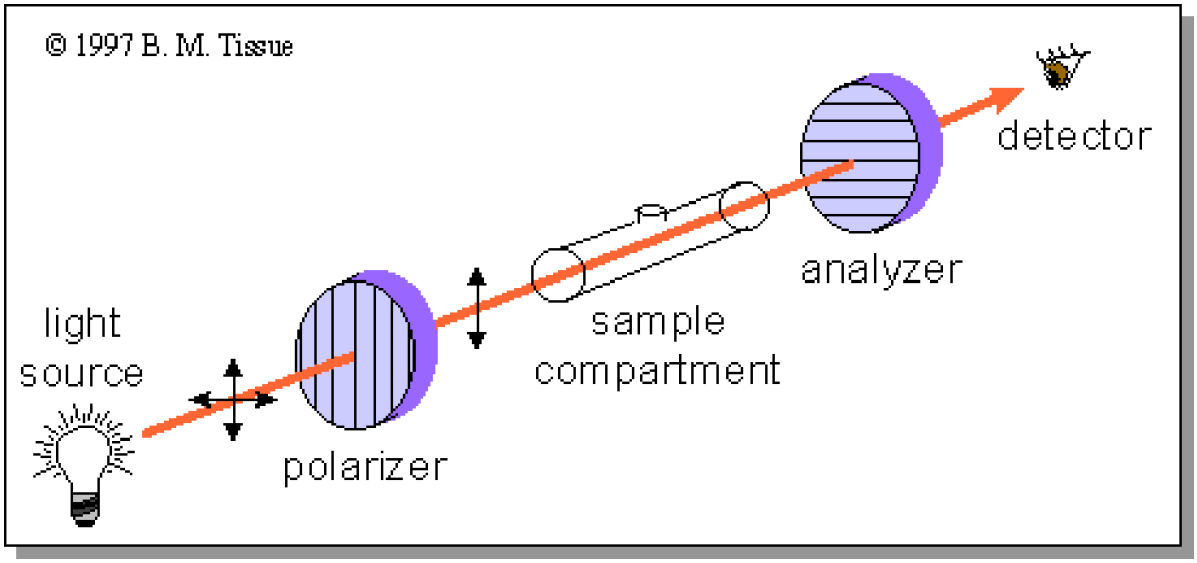


Рис 5.3. Схема поляриметричного методу

9.5. Концентрація джерела нітрогену

Джерелами азоту виступають пептон і екстракт яловичини для середовища для отримання інокуляту і казеїн для середовища для виробничого біосинтезу. Оскільки продуктом біосинтезу в цій технології

виступає позаклітинний фермент еластаза, не можна використовувати метод К’єльдаля, оскільки він враховує будь-який органічний азот. Замість нього краще використати формольне титрування, яке вже має використання у виноробстві:

[27]

Рис 5.4. Фото сучасної автоматичної титрувальної бюретки.

9.6. Концентрація біомаси

Спектрофотометричне визначення. Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (600 нм) з наступним перерахунком на суху біомасу за калібрувальним графіком [28]

ЛІТЕРАТУРА:

1. Cotten, S. W. (2020). Evaluation of exocrine pancreatic function. In Contemporary Practice in Clinical Chemistry (pp. 573-585). Academic Press.
2. Hajjar, E., Broemstrup, T., Kantari, C., Witko-Sarsat, V., & Reuter, N. (2010). Structures of human proteinase 3 and neutrophil elastase - so similar yet so different. FEBS Journal, 277(10), 2238–2254. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07659.x
3. Elastase - Worthington enzyme manual. Worthington Biochemical. (n.d.). https://www.worthington-biochem.com/products/elastase/manual
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). Molecular Biology of The Cell. New York: Garland Science.
5. Berlov, M. N., Lodygin, P. A., Andreeva, Y. V., & Kokryakov, V. N. (2001). Isolation and some physical and chemical properties of elastase and cathepsin G from dog neutrophils. Biochemistry, 66, 1008-1013.
6. Chen, Q. H., Ruan, H., Zhang, H. F., Ni, H., & He, G. Q. (2007). Enhanced production of elastase by Bacillus licheniformis ZJUEL31410: optimization of cultivation conditions using response surface methodology. Journal of Zhejiang university science B, 8, 845-852.
7. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). Molecular Biology of The Cell. New York: Garland Science.
8. Robert, L., Robert, A. M., & Jacotot, B. (1998). Elastin–elastase–atherosclerosis revisited. Atherosclerosis, 140(2), 281-295.
9. Loeven, W. A., and Maureen M. Baldwin. "Elastolytic enzymes and elastin in the aging rat." *Gerontology* 17, no. 3 (1971): 170-182
10. Pat 0198645A1. Human pancreatic elastase/ Yo C/O Bio-Science Research Laboratory TakiguchiTokyo C/O Bio-Science Research Laboratory TaniIchiro C/O Bio-Science Research Lab. KawashimaHidehiko C/O Bio-

Science Research Lab. EurukawaToshinori C/O Bio-Science Research Lab. OhmineJun C/O Bio-Science Research Lab. Ohsumi Publ 07.04.06

11. Robert, L., Robert, A. M., & Jacotot, B. (1998). Elastin–elastase–atherosclerosis revisited. Atherosclerosis, 140(2), 281-295.
12. Loeven, W. A., and Maureen M. Baldwin. "Elastolytic enzymes and elastin in the aging rat." *Gerontology* 17, no. 3 (1971): 170-182
13. Pat 0198645A1. Human pancreatic elastase/ Yo C/O Bio-Science Research Laboratory Takiguchi HYPERLINK "https://patents.google.com/?inventor=Tokyo+C%2fO+Bio-Science+Research+Laboratory+Tani&peid=61c3f6fffb3d0%3A47%3Afb43d6a1"Tokyo C/O Bio-Science Research Laboratory Tani HYPERLINK "https://patents.google.com/?inventor=Ichiro+C%2fO+Bio-Science+Research+Lab.+Kawashima&peid=61c3f7000cd10%3A48%3A94e2c1ae"Ichiro C/O Bio-Science Research Lab. Kawashima HYPERLINK "https://patents.google.com/?inventor=Hidehiko+C%2fO+Bio-Science+Research+Lab.+Eurukawa&peid=61c3f6faf6920%3A42%3A52fbc0eb"Hidehiko C/O Bio-Science Research Lab. Eurukawa HYPERLINK "https://patents.google.com/?inventor=Toshinori+C%2fO+Bio-Science+Research+Lab.+Ohmine&peid=61c3f6fadd2e0%3A41%3A67c2e49"Toshinori C/O Bio-Science Research Lab. Ohmine HYPERLINK "https://patents.google.com/?inventor=Jun+C%2fO+Bio-Science+Research+Lab.+Ohsumi&peid=61c3f6f46e350%3A24%3Afd809c3c"Jun C/O Bio-Science Research Lab. Ohsumi Publ 07.04.06
14. Errington, J., & Aart, L. T. V. D. (2020). Microbe Profile: Bacillus subtilis: Model organism for cellular development, and industrial workhorse. Microbiology, 166(5), 425-427.
15. Bisset, K. A., & Street, J. (1973). Morphological phases in the swarm of Bacillus licheniformis. Microbiology, 76(2), 369-373.

16. https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/41202/1/Yurchenko_bakalavr.pdf
17. https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_licheniformis
18. Qihe, C., Guoqing, H., Yingchun, J., & Hui, N. (2006). Effects of elastase from a Bacillus strain on the tenderization of beef meat. Food Chemistry, 98(4), 624–629. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06
19. Diagnostic Performance of Measurement of Fecal Elastase-1 in Detection of Exocrine Pancreatic Insufficiency – Systematic Review and Meta-analysis Rohini R Vanga 1, Aylin Tansel 1, Saad Sidiq 2, Hashem B El-Serag 1,3,4, Mohamed Othman 1
20. [https://www.linkedin.com/pulse/cagr-43-meat-tenderizer-enzymes-market-size-industry-share-gupta]
21. Ye Z, Zhang J, Lorenzo JM, Zhang M, Zhang W. Effects of bromelain on the quality of smoked salted duck. Food Sci Nutr. 2021 Jun 24;9(8):4473-4483. doi: 10.1002/fsn3.2422. PMID: 34401095; PMCID: PMC8358376. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8358376/]
22. Bieth, J G “Elastases: catalytic and biological properties,” at pp. 217-320
23. Пенчук, Ю. М. Загальна біотехнологія [Електронний ресурс] [Текст] : конспект лекцій для здобувачів освіт. рівня "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. / Ю. М. Пенчук ; уклад. : Ю. М. Пенчук ; Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2019. — 80 с. — каф. біотехнології і мікробіології.
24. Chen, Q. H., Ruan, H., Zhang, H. F., Ni, H., & He, G. Q. (2007). Enhanced production of elastase by Bacillus licheniformis ZJUEL31410: optimization of cultivation conditions using response surface methodology. Journal of Zhejiang university science B, 8, 845-852.
25. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] [Текст] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" світ.-проф. програми "Біотехнологія"

ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ;Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2019. — 252 с. — каф. біотехнології і мікробіології.
26. Cote, G. L., & Cameron, B. D. (1997). Noninvasive polarimetric measurement of glucose in cell culture media. Journal of Biomedical Optics, 2(3), 275-281.
27. Gump, B. H., Zoecklein, B. W., & Fugelsang, K. C. (2001). Prediction of prefermentation nutritional status of grape juice: The formol method. Food microbiology protocols, 283-296
28. Santos-Ballardo, D. U., Rossi, S., Hernández, V., Gómez, R. V., del Carmen Rendón-Unceta, M., Caro-Corrales, J., & Valdez-Ortiz, A. (2015). A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important