

**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)

(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

« » червня 2022 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ

(підпис) (ім'я та прізвище)

« » червня 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

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

на тему: Біосинтез протеази *Bacillus cereus*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

ЗАБАШТА Єгор Георгійович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ГУДЗЕНКО Олена Володимирівна _____
(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 БОРЗОВА Наталія _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ - 2022р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЗАБАШТА Єгор Георгійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез протеази *Bacillus cereus*

керівник роботи Гудзенко Олена Володимірівна,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи продуцент протеази *Bacillus cereus* GVK21,
об'єм ферментера 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6

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

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва протеази – 2 аркуші формату А1.
Апаратурна схема виробництва протеази – 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика протеази	04.04.22-14.04.22	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	01.04.22-14.04.22	
3	Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.22-14.04.22	
4	Специфікація обладнання	14.04.22-22.04.22	
5	Опис технологічної схеми	14.04.22-22.04.22	
6	Контроль виробництва	28.04.22-01.06.22	

Здобувач

_____ (підпис)

Єгор ЗАБАШТА

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олена ГУДЗЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

Реферат

Дипломний проект присвячений розробленню біотехнології виробництва ферментапротеаза, який буде використовуватись для покращення прання дитячої одежі.

У даному дипломному проекті розраховано техніко-економічне обґрунтування річної потреби фермента протеаза для забезпечення засобом для прання дітей України. Розглядається технологія отримання фермента за допомогою мікроорганізму *Bacillus cereus* GVK21.

Новизною є використання нового штаму *B. cereus* GVK21, який дає змогу отримувати фермент більшою активністю (912 од/мл) в порівнянні з іншими штамми-продуцентами та розробка принципово нової промислової схеми виділення на основі опрацьованих літературних даних. Розрахована потужність виробництва препарату – 296 кг/рік. Технологічна схема виробництва фермента включає допоміжні роботи (стерильного аераційного повітря, приготування та стерилізація титрувальних агентів (6% HCl та 6% NaOH) і піногасника, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез фермента протеаза у ферментері об'ємом 6,3 м³, Технологія отримання протеази передбачає три стадії підготовки посівного матеріалу (колби на качалках, вирощування в інокуляторі (10 л) та в посівному апараті(100 л)).

Проект виробництва протеази складається зі вступу, семи розділів, графічних матеріалів та списку використаної літератури з 54 найменувань. Загальний обсяг роботи – 89 сторінки, 8 рисунків, 20 таблиць, 2 креслення формату А1

Ключові слова: фермент, протеаза, *Bacillus cereus*, ферментер, засоби для прання одежі.

					НУХТ БТЕК 04.01.17 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата	Реферат	Літера	Аркцш	Аркцшів	
Розробник	Забашта Е.Г								
Керівник	Гидзенко О.В						2	91	
Н. контр								4	
Консульт						Кафедра БТМ			
Зав. каф.	Стадніков								

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Характеристика протеази.....	7
1.2 Сфери застосування протеази.....	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	14
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	23
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	25
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	25
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	26
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	31
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	34
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	34
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	34
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	35
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	37
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	41
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	43

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	48
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	63
7.1. Мікробіологічний контроль.....	64
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	63
7.2.2. Визначення протеолітичної активності (ПС)(модифікований метод Ансона).....	64
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	67
ЛІТЕРАТУРА.....	84
ДОДАТКИ.....	91

Вступ

Безперервне збільшення чисельності населення планети, яке за оцінками досягне 9 мільярдів до 2050 року, створює серйозну проблему для досягнення глобальної продовольчої безпеки. Тому необхідність забезпечення зростаючого населення планети і своєчасного реагування на наслідки змін клімату повинні стати глобальним пріоритетом. Сучасні біотехнологічні дослідження, зокрема в сфері мікробних ферментів, розробки в галузі фармацевтики, харчових продуктів та сільського господарства, є ефективним способом вирішення глобальної проблеми продовольчої безпеки. Біотехнологія – це наука, яка зможе вирішити ці проблеми та задовольнити усі потреби зростаючого людства [1].

Мікробні ферменти набули значної уваги на сьогодні. У них є ряд переваг, які роблять їх такими привабливими для дослідників та промисловості.

Серед таких переваг можна виділити такі: економічна вигідність, високий вихід продукту, можливість модифікації, відсутність залежності від сезонних змін, використання відходів інших галузей промисловості для одержання продукту та в решті- решт більша каталітична активність.

Протеази, ймовірно, виникли на найбільш ранніх стадіях еволюції білка як прості руйнівні ферменти, необхідні для катаболізму білка і генерації амінокислот в примітивних організмах. Здавалось така проста функція, але вона знайшла місце для використання у багатьох промислових сферах таких як фармацевтична, харчова, легка промисловість та інші. Як можна зрозуміти протеази мають дуже широкий спектр використання.

					НУХТ БТЕК 04.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата	ВСТУП	Літера	Аркуш	Аркушів
Розробник	Задашта Е.Г							
Керівник	Гцдзенко О.В						5	91
Н. контр						Кафедра БТМ ⁷		
Консульт								
Зав. каф.	Стадніков							

Одна із активних галузей де використовують ферменти, протеази у тому числі, стала вироблення миючих засобів. За допомогою ферментів полегшують відмивання забруднень різного походження від жирових до білкових. Саме із білковими забруднення допомагає боротися протеази, роблячи засоби більш дієвими та економічними[3,4].

Новизна: у даному курсовому проекті для спрощення відмивання білкових забруднень з дитячої одежі пропонується додавання гідролітичного ферменту протеаза, який синтезує продуцент *Bacillus cereus* GVK21. В біосинтезі використовується, як джерело вуглеводів відходи буряково-цукрового виробництва – меляса, середовище є сильно лужне та з температурою, для термофільних мікроорганізмів, що означає меншу вірогідність контамінації.

В кінці синтезу ми отримуємо фермент з активністю 912 од/мл.

Розділ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕАЗИ

Протеаза (КФ 3.4.21.53)- це фермент основною функцією якого є розщеплення білків, що містяться в навколишньому середовищі, і перетворення їх у форму, здатну легко проникати всередину клітини. У зв'язку з цим більшість відомих протеаз функціонують як екстрацелюлярний фермент. Протеолітичні ферменти класифікують за трьома основними критеріями: за типом каталізуючої реакції; за механізмом каталізу в активному центрі; по гомології амінокислотної (А.К.) послідовності каталітичного домену, що показує еволюційну спорідненість. Комітетом по номенклатурі Міжнародного союзу біохіміків і молекулярних біологів (NC-IUBMB) прийнято основний принцип класифікації ферментів - тип каталізуючої реакції.

У класифікації ферментів, виділений клас гідролаз КФ 3, до підкласу КФ 3.4 якого відносяться всі протеолітичні ферменти, або протеаз (вони ж - протеїнази, застаріла назва). Протеази поділяються на 14 субпідкласів по типу каталізуючих реакцій, об'єднані в дві великі групи: екзопептидази, що розщеплюють пептидний зв'язок тільки в кінцевих областях поліпептиду (субпідклас КФ 3.4.11-19), і ендопептидази, що діють на зв'язку всередині поліпептидного ланцюжка (субпідклас КФ 3.4.21-24 і КФ 3.4.99) [5].

Типовими представниками продуцентів протеаз являються бактерії родини *Bacillus* (*B. cereus* та *B. subtilis*), актиноміцети *Streptomyces* (*S. bradia*, *S. griseus*, *S. fradiospiralis*) та мікроміцети роду *Aspergillus*(*A. flavus* та *A. niger*).

					НУХТ БТЕК 04.01.17 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата	Розділ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА	Літера	Аркш	Аркшів	
Розробник	Задашта Е.Г								
Керівник	Гідзенко О.В						7	919	
Н. контр						Кафедра БТМ			
Консульт									
Зав. каф.	Стадніков								

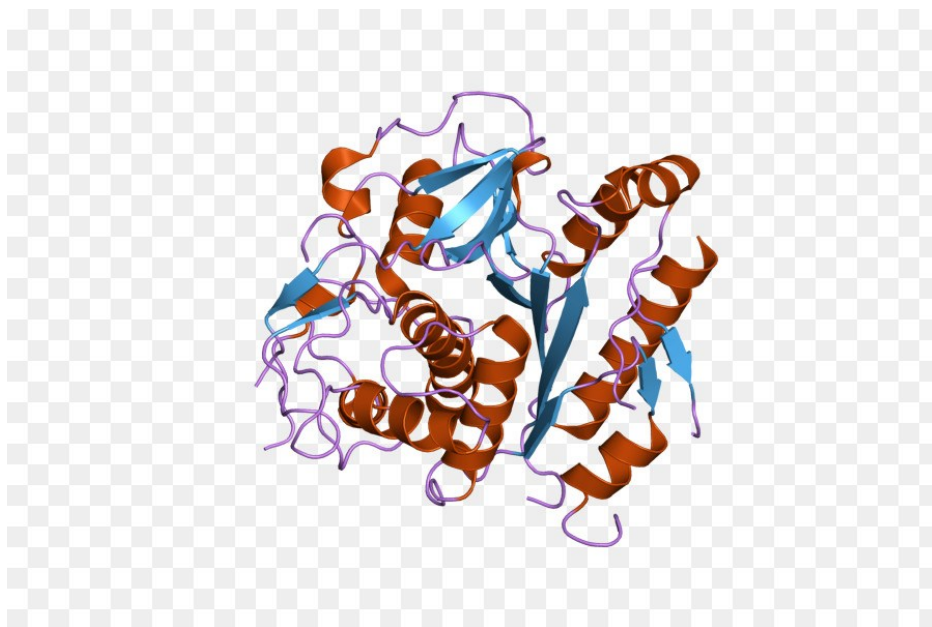


Рис1.1 Модель молекули протеази

(<https://www.pngwing.com/ru/free-png-vkrgo>)

Протеази були вперше згруповані в 84 сімейства відповідно до їх еволюційної спорідненості в 1993 році і класифіковані за чотирма каталітичним типам: серинові, цистеїнові, аспарагінові і металопротеази. Потім з 1995 до 2004 були описані ще два типи кислих протеаз - треонінові і глутаматові. Механізм, який використовується для розщеплення пептидного зв'язку, включає перетворення амінокислотного залишку, який має цистеїн і треонін (протеази) або молекулу води (аспарагінова кислота, метало- і кислотні протеази), щоб він міг атакувати карбоксильну групу пептиду [6,7].

Протеази синтезуються практично всіма живими організмами: тваринами, рослинами і мікроорганізмами. В медицині на сьогодні здебільшого використовуються протеолітичні ферменти тваринного походження. Але, природна сировина може містити інфекційні агенти, проонкогени, нуклеїнові кислоти, пріони. Тому значна частина сучасних наукових досліджень присвячена вивченню різноманітних ферментативних

систем мікроорганізмів. Короткий цикл розвитку бактерій, довготривале зберігання ферменту без втрати його активності та відсутність перешкод під час очистки, все це робить мікроорганізми перспективними продуцентами ферментів для промисловості і медицини [7].

Даний фермент є промислово важливим так як велика частка ферментів які застосовуються в народному господарстві є протеазами. Ці ферменти складають 40% ферментів світового ринку з яких 8% становлять тварини та 4% рослинного походження. Отже, основна частина промислових протеаз отримують з мікроорганізмів (грибів і бактерій). Протеази широко застосовують в практичному житті – в харчовій промисловості, в складі миючих засобів та у медичній сфері.

Мікроорганізми продукують всі три типи протеаз: кислу, нейтральну і лужну. Протеази грибів стійкіші і ефективно діють в широких межах кислотності (рН 4-8), в той час як бактеріальні протеази, за невеликими винятками, найбільш ефективні в більш вузькій зоні (рН 7-8) кислотності [8].

1.2 Сфери застосування протеази

Харчова та кормова промисловість

При виробництві сиру з молока протеази додаються для гідролізу каппа-казеїну, щоб запобігти коагуляцію за рахунок стабілізації утворення міцел. У хлібопекарській промисловості для більш швидкого приготування тіста його глютен частково гідролізується термолабільною грибковою протеазою. Приготування протеїнового гідролізату з високою харчовою цінністю досягається додаванням мікробних лужних протеаз. Біоактивні пептиди грають важливу роль в різних фармацевтичних лікарських формах і як потенційні молекули в стресових умовах навколишнього середовища. Цей препарат гідролізату життєво важливий для приготування дитячого харчування та збагачення безалкогольних напоїв та соків [9]. Гідроліз білків до амінокислот викликає утворення антиоксидантів, які пригнічують автоокислення лінолевої кислоти і ефект поглинання вільних радикалів α , α -

дифеніл-β-пikpілгiдpазiла [10]. Було виявлено, що довгi пептиди з молекулярною масою 1400 Да були сильнiшими антиоксидантами в порiвняннi з пептидами меншого розмiру з молекулярною масою вiд 200 до 900 так було виявлено, що утворення великих гiдролiзатiв бiлка за допомогою послiдовної дiї екзопpтеаз i ендопептидаз в поєднаннi з вивiльненням i розвитком процесiв постгiдролiза вважається найбiльш ефективним способом отримання гiдролiзатiв бiлка, якi показали чiтко визначенi характеристики пiд час гiдролiзу бiлка [11]. Бiоактивнi пептиди, що утворюється в результатi гiдролiзу рiзних харчових бiлкiв, вiдiграє важливу роль в якостi антиоксидантiв в клiтцi. Бiлковий гiдролiзат показали вiдмiнну розчиннiсть, завдяки чому антиоксидантна активнiсть бiлкових гiдролiзатiв були посиленi. Бiоактивнi пептиди проявляють протипухлиннi i гiпохолестеринемiчну властивостi, а також iснують багатофункцiональнi властивостi пептидiв, отриманих з харчових бiлкiв [12].

Миюча промисловiсть

Протеази широко використовуються в промислових масштабах в iндустрiї миючих засобiв. Рiзнi продукти в iндустрiї миючих засобiв, що мiстять протеази в якостi основного компонента або iнгредiєнта, використовувалися для чищення домашнього бiлизни, зубних протезiв або контактних лiнз. Iз загального обсягу продажiв ферментiв використання протеаз в iндустрiї миючих засобiв становить ~ 20%. У 1913 році був виготовлений найперший ферментний препарат «Брун», що складається з сирого екстракту пiдшлункової залози i карбонату натрiю. Цей ферментний препарат вперше надiйшов у продаж в 1956 році пiд торговою маркою BIO-40. Алькалаза з торговою назвою BIOTEX, синтезована *Bacilluslicheniformis*, була представлена на ринку компанiєю Novoindustry A / S в 1960 році. Протеаза, що продукується *B. cereus* BM1 вважається хорошим iнгредiєнтом миючого засобу i демонструє стабiльну активнiсть в розчинi 10% (мас. / Про.) [13].

Ще одним прикладом використання протеази в миючих засобах являється Американська торгова марка «Tide», одним із ферментів який входить до складу деяких видів їх продукції являється протеаза. Ферменти які є у складі цього засобу допомагають видаляти плями органічного походження при тому не завдаючи шкоди одягу та людині яка її носитиме [14].



Рис 1.2 Миючий засіб торгової марки «Tide» який має у своєму складі протеазу

(<https://tide.com/en-us/coupons-and-rewards>)

Медицина сфера

Згодом вчені знайшли широке застосування протеаз в області медицини. У медицині різні форми, такі як марля, неткані серветки і мазеві композиції, що містять лужні протеази, які продукують *B. subtilis*, демонструють багатообіцяючі терапевтичні властивості. Певним синдромам недостатності літичних ферментів допомагає пероральний прийом лужних ферментів. Повідомлялося, що розщеплення фібрину досягається лужними фібринолітичними протеазами. Використання цього фібринолітичного ферменту передбачає його майбутнє застосування в якості протипухлинного препарату і в тромболітичної терапії. Препарат лікарської форми з уповільненим вивільненням, що містить колагенази з лужними протеазами.

Гідроліз колагену ферментом вивільняє низькомолекулярні пептиди без вивільнення амінокислот і використовується для терапевтичних цілей [13,15].

Прикладом медичного використання протеази може послугувати відомий препарат «Мезим» Німецької компанії Берлін-Хемі АГ. Показаннями для прийняття препарату є одночасне вживання тяжко перетравлюваної рослинної, жирної та незвичної їжі; метеоризм, пов'язаний із вищевказаними розладами.. Він у своєму складі має протеазу тваринного походження точніше панкреатин.

Є український аналог «Мезима», препарат «Креазим» виробника ПрАТ «Технолог».



Рис 1.3 (<https://www.berlin-chemie.ru/preparats/Mezim/3.phtml>)



Рис 1.4 (<https://1sa.com.ua/ru/kreazim-10000-0-14-g-kapsuly-20.html>)

Розділ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

На мікробний синтез припадає дві третини комерційних протеаз в усьому світі.

З моменту появи ензимології мікробні протеолітичні ферменти почали дуже інтенсивно вивчатися. З кожним роком дослідники все більше знаходять нових продуцентів протеаз, які мають ті чи інші переваги.

Ці ферменти викликають інтерес не тільки через їх життєво важливі ролі в метаболічній активності, але і завдяки їх величезній необхідності в промисловості. [16,17]

На сьогоднішній день одним із найпопулярніших промислових продуцентів протеаз є бактерії роду *Bacillus*. Серед інших продуцентів протеаз можна виділити бактерії родів *Streptomyces* та *Pseudomonas* і мікроскопічні гриби родів *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* і ін. Важливим фактором в процесі культивування протеаз є оптимізація рН та час культивування, оскільки різні мікроорганізми продукують різні типи протеаз. Так, кислі протеази загалом продукуються різними грибами (*Mucormichei*, *Mucorpusillus*, *Endothiaparasitica*, *Aspergillussaitoi*); нейтральні мають широкий спектр штамів продуцентів (*Aspergillusoryzae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaretium*, *Pseudomonasaeruginosa*); лужні утворюють різні штами бактерій та деякі гриби (*Bacilluslicheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaretium*, *Bacillus pumilis*, *Streptomycesfradiae*, *Aspergillusniger*) [18].

					НУХТ БТЕК 04.01.17 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата			
Розробник	Задашта Е.Г				Розділ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літера	Аркш
Керівник	Гідзенко О.В						13
Н. контр							915
Консульт						Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Стадніков						

Дані, наведені у табл 2.2, свідчать, що найактивнішу протеазу синтезує *Bacillus. cereus*GVK21.

Як видно з даних, наведених у табл 2.2, середовище *Bacillus cereus*GVK21 являється найдорожчим серед обраних мікроорганізмів. Проте тривалість культивування штаму *Bacillus. cereus*GVK21, являється найшвидшим серед усіх наведених мікроорганізмів.

Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартості 1 од/мл цільового продукту. Дані, наведені у табл 2.3, засвідчують, що умовна вартість протеази, синтезована *B. cereus*GVK21, є нижчою (0,017 грн/од) чим у біологічних агентів *StreptomycesAlbidoflavu*C4 та *Streptomycessp. Al-Dhabi*-82, а кількість утвореної активності являється найвищою серед усіх наведених біологічних агентів (19 од/год).

Отже, *B. cereus*GVK21 можна вважати найкращим продуцентів серед наведених мікроорганізмів.

Особливості одержання протеолітичних ферментів на суміші ростових субстратів

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища г/л :	Тривалість культивування, год	Особливості культивування	Активність Од/мл	Література
<i>Bacillus cereus</i> GVK21	М'яса - 10; Пептон – 15,0; Дріжджовий екстракт - 5,0; MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,02 KH ₂ PO ₄ -0,05	48	Організм вирощували в 250 мл колбах при температурі 40 °C pH 9	912	Keshavamurthy. M, Vishwanatha. T, Suresh Kumar M1, Subhaschandra M Gaddad.2019. Enhanced Production of Extracellular Alkaline Protease by <i>Bacillus cereus</i> GVK21 by Optimized formulations. 9 (1): 1103-1113

<i>Bacilluslicheniformis</i> MTCC NO. 7053	Рисове лушпиння-60; Нітрат калію-7,5; MgSO ₄ ·7H ₂ O -5; KH ₂ PO ₄ -5; FeSO ₄ *7H ₂ O- 0.2; CaCO ₃ -5;	72	Організм вирощували в 250 мл колбах при температурі 65 °C pH 10,	184±0.2 5	InternationalJournalofCurrentMi crobiologyandAppliedSciences I SSN:2319-7692(Print), ISSN:2319-7706
<i>StreptomycesAlbidofl avu</i> C4	Глюкоза- 10,0; Казеїн-5,0, Дріжджовий автолізат - 5,0; KH ₂ PO ₄ -2,0; K ₂ HPO ₄ - 2,0, MgSO ₄ ·7H ₂ O- 1,0;	72	Організм вирощували в 250 мл колбах при температурі 40 °C pH 10	121.46	Optimazingsomefactorsaffecting alkalineproteaseproductionby a marinebacterium <i>StreptomycesAl bidoflavu</i> Hanaa A. El-Shafei , Mohamed S. Abdel-Aziz , Mohamed F. GhalyandAhmed A. H. Abdalla 2010 54(3) : 502- 512
<i>Streptomycessp. Al-</i>	Глюкоза- 0,5;	120	Організм вирощували в	269 ±	Characterizationandfermentation

<i>Dhabi-82</i>	KNO_3 - 0,6; Пептон- 10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5 NaCl - 5; CaCl_2 - 1,0 K_2HPO_4 - 0,5.		250 мл колбах при температурі 40 °C pH 9	10.4	optimization of novel thermostable alkaline protease from <i>Streptomyces</i> <i>ssp.</i> <i>Al-Dhabi-82</i> from the Saudi Arabian environment for eco- friendly and industrial applications Naif Abdullah Al-Dhabi , Galal Ali Esmail, Abdul- Kareem Mohammed Ghilan, Mariadhas Valan Arasu, Veeramuthu Duraipandiyar, Karuppiyah Ponmurugan. 2019 25(2): 403–408.
-----------------	---	--	--	------	--

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів протеази

Таблиця 2.2

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)*
<i>Bacillus cereus</i> GVK21	Меляса	10	15	0,15	4
	Пептон	15	700	10,5	4
	Дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.02	10	0,0002	5
	KH ₂ PO ₄	0.05	55	0,00275	2
	Вартість 1 л середовища – 16,15 грн				
<i>Bacillus licheniformis</i> MTCC NO. 7053	Рисове лушпиння	60	14.60	0,876	3
	KNO ₃	7.5	36	0,27	2

	MgSO ₄ *7H ₂ O	5	10	0,05	5
	KH ₂ PO ₄	5	55	0,275	2
	FeSO ₄ *7H ₂ O	0.2	38	0,0076	2
	CaCO ₃	5	36	0,18	2
	Вартість 1 л середовища – 1,65 грн				
<i>StreptomycesAlbidoflavu</i> C4	Глюкоза	10	33	0,33	1
	Казеїн	5	250	1,25	3
	Дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	2
	KH ₂ PO ₄	2	55	0,11	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	1	10	0,01	5
	Вартість 1 л середовища – 7,2грн				
<i>Streptomycessp.</i> Al-Dhabi-	Глюкоза	0.5	33	0,0165	1

82	KNO ₃	0.6	36	0,0216	2
	Пептон	10	750	7,5	4
	MgSO ₄ *7H ₂ O	5	10	0,05	5
	NaCl	5	4,5	0,0225	2
	CaCl ₂	1	13	0,013	2
	KH ₂ PO ₄	0.5	55	0,0275	2
	Вартість 1 л середовища – 7,65 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2021 р. 1- <https://www.systopt.com.ua/> 2 - <http://prom.ua>, 3-www.мульча.рф.com 4-<https://flagma.ua/uk/fermentativny> 5-<https://www.systopt.com.ua/>

Умовна вартість 1 мл фермента, синтезованих на суміші ростових субстратів

Таблиця 2.3

Біологічний агент	Активність ферменту Од/ мл	Тривалість культивування,	Утворення активності ферменту за	Вартість 1 л середовища,	Умовна вартість 1 мл цільового продукту,
-------------------	-------------------------------	---------------------------	----------------------------------	--------------------------	--

		год	годину, од/год	грн/л	грн/од
1 <i>Bacillus cereus</i> GVK2	912	48	19	16,15	0,017
<i>Bacillus licheniformis</i> MTCC NO. 7053	184	72	2,5	1,65	0,009
<i>Streptomyces Albido</i> fl avu C4	121,46	72	1,7	7,2	0,059
<i>Streptomyces</i> sp. Al- Dhabi-82	269	120	2,24	7,65	0,029

2.1 Морфолого-культуральні ознаки. Грампозитивна паличкоподібна бактерія. Клітини великі, 1 x 3-4 мікрон, ендоспори розташовані центрально, не перевищують розміру клітини. Кожна клітина має кілька джгутиків, розміщені перетрихіально. [19]

У першу добу, на МПА *B. cereus* утворюють «восковидні» сіро-білі розпластані колонії з нерівними краями, що мають зернисту структуру (часто утворюють коричневий пігмент) розміром 5-10 мм, через 48 годин культивування колонії збільшувалися в діаметрі до 1,5-2 см.

На кров'яному агарі при температурі 37 ° С протягом 24 год. *B. cereus* формує великі шорсткі матові колонії в R-формі, з нерівними хвилястими краями, утворюючи чітку зону β -гемолізу[20,21]



Рис3.1. Клітини *B. Cereus* форма клітин під електронним

мікроскопом, збільшення $\times 11000$

(<https://www.sciencesource.com/CS.aspx?VP3=LoginRegistration&L=True&R=False>)

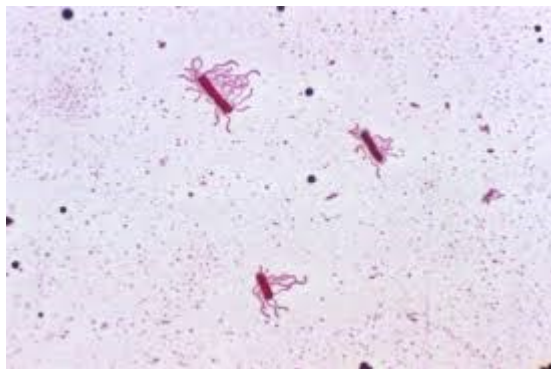


Рис 2.2. Клітини *B. cereus*, забарвлення джгутиків за Лейфсоном
 (<https://www.ecolab.com/expertise-and-innovation/resources/microbial-risks/b-cereus>)

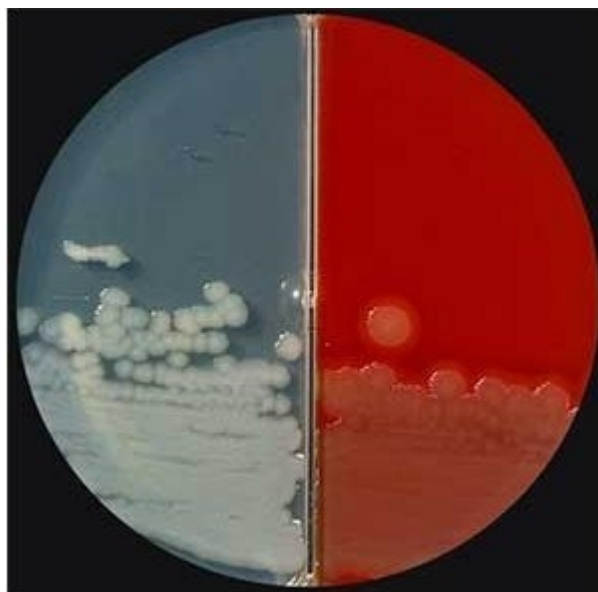


Рис3.3. Клітини *B. Cereus* вирощені на МПА (зліва) та на кров'яному агарі (з права)

2.2 Фізіолого-біохімічні ознаки.*B. Cereus* хемоорганогетеротрофи, факультативні анаероби, здатні до відновлення нітрату. Росте, на твердих поживних середовищах. Здатні до росту і розмноження у діапазоні температури від 25 до 42 °С, оптимальна температура становить 37–39°С , однак спори його можуть проростати при широкому інтервалі температур від 3 - 5 ° С до 70 ° С; клітини можуть рости при рН від 4 до 12,5, оптимум рН 7 - 9,5. [19,23]

При культивуванні на цитратному агарі Сіммонса змінюється колір середовища (з зеленого на синій), що свідчить про здатність утилізувати цитрат натрію

Реакція Фогеса- Проскауера- позитивна, не здатний до розщеплення маніту, ксилози, арабінози, сорбіту та багатоатомних спиртів. Утворює каталазу, оксидазу, фосфофатазу та уреазу і не утворює індол [23,24]

3.3Таксономічний статус біологічного агента. Сучасна (філогенетична)

класифікація для *B. cereus* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій

Domain:*Bacteria*

Phylum:*Firmicutes*

Class:*Bacilli*

Order:*Bacillales*

Family:*Bacillaceae*

Genus:*Bacillus*

Species:*B. cereus*

Розділ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті

Миючі засоби – це невід’ємна частина побуту будь-якої сучасної людини. За допомогою них виводять плями білків, хімікатів, жирів, вуглеводів або забруднення будь-якого іншого походження. Склад миючого засобу для прання містить безліч компонентів і може бути як твердим порошком так і рідким. Типовий склад прального порошку містить наступні компоненти: добавки, такі як триполіфосфат натрію, нітрилотриоцтової кислота або полікарбоксилати для зменшення жорсткості та підтримки лужності, аніонні, катіонні або неіоногенні поверхнево-активні речовини, відбілюючі агенти, такі як перкарбонати або перборати, ароматизатори, і, нарешті, добавки, такі як ферменти, щоб зробити процес очищення більш ефективним. Миючі засоби видаляють плями за рахунок електростатичного взаємодії та стеричних перешкод. Негативно заряджені міцели миючого засобу зв’язуються з частинками бруду, а також з тканиною і передають їм негативний заряд. В присутності води ці міцели відштовхуються одна від одної за рахунок електростатичного відштовхування, що запобігає повторне прилипання частинок бруду до поверхні тканини. Ці міцели потім змиваються за допомогою води [25].

Ферменти складають важливу частину миючих засобів. За допомогою них знижують енергію активації реакції, тим самим роблячи процес реакції більш ефективним з зменшеним споживанням енергії. До того ж використання ферментів в хімічних процесах дозволяє економити значну кількість води.

					НУХТ БТЕК 04.01.17 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата	Розділ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ АГЕНТА	Літера	Аркш	Аркшів
Розробник	Забашта Е.Г							
Керівник	Гидзенко О.В						25	90
Н. контр								27
Консульт						Кафедра БТМ		
Зав. каф.	Стадніков							

В індустрії миючих засобів типи ферментів, що використовуються в складах миючих засобів, варіюються від ліпаз, амілаз і целюлаз до протеаз. Протеолітична група ферментів, це група яка гідролізує пептидні зв'язки і перетворює білки на прості амінокислоти. Залежно від типу задіяної протеази розщеплюються пептидні зв'язку, прилеглі до конкретних амінокислот. Серед різних протеаз лужна протеаза отримала найбільше застосування в індустрії миючих засобів, оскільки вона оптимально функціонує при рН вище 8, а так як складова миючих засобів також мають дуже високу рН в діапазоні від 9,0 до 12,0 це має дуже важливу роль для оптимальної активності ферменту [26].

3.2 Розрахунок щоденної потреби населення України у миючому засобі для дитячої одежі з ензимами

Ми пропонуємо використовувати фермент протеазу для миючих засобів для дитячої одежі, які будуть продаватись у дозованих капсулах по 25 мл, як випускають наприклад Tide, Ariel та Start.

Згідно статистичних даних дитячого населення (від 0-4 років) в Україні на 2021 рік нараховується 1 989 356 осіб (<http://database.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/>).

Умовно візьмемо, що на прання одежі використовується по одній капсул по 25 мл на день. Тобто для забезпечення миючим засобом дитячого населення України необхідно $1\,989\,356 \times 25 = 49\,733\,900$ мл або 49 733,9 л в день, а в рік $49\,733,9 \times 365 = 18\,152\,873,5$ л = 18 152,9 м³ на рік миючого засобу.

Річна потреба ферменту протеаза для забезпечення миючим засобом дітей України віком від 0-4 років (за даними 2021)

Цільовий споживач	Кількість цільового споживача на	Використання	Необхідна кількість засобу на	Кількість капсул на рік, шт.

	2021 рік, осіб		рік, м ³	
Діти від 0-4	1 989 356	Щоденно	≈18 152,9	726 114 940

Таблиця 1.1

3.3 Розрахунок потужності виробництва протеази як компонента миючого засобу для дитячої білизни

Нами не було знайдено аналогів українського виробництва миючих засобів з ензимами, але існує дуже великий асортимент імпортованих засобів, вище наведені Tide, Ariel та Start. Зважаючи на те, що наведені компанії вже досить довго існують на ринку та низький рівень довіри до нових продуктів, виробництво буде забезпечувати 24 % цільового споживача приблизно 486 900 дітей України віком від 0-4.

Так як у літературі не вказують протеолітичну активність у вже готовому миючому засобі ми будемо відштовхуватись від вказаної масової частки протеази у миючому засобі та лабораторних даних, в яких сказано, що вже при 131.96 ± 1.75 од/мл відбувається гідроліз білкових забруднень [27]. Відповідно літературних даних масова частка протеази у миючому засобі буває від 1% до 4 % [28] . Ми візьмемо середнє число , $(1\%+4\%)/2 = 2,5\%$ необхідна масова частка протеази у миючому засобі.

Беручи до уваги вище наведені дані, розрахуємо необхідну кількість активності протеази на рік, розфасованої у капсулах по 25 мл з масовою часткою ферменту 2,5% з умовою, що кожен день споживач витрачає по одній капсулі:

$$A_{\Sigma} = 25 \text{ мл} \times 0,025 \times 133 \text{ Од/мл} \times 365 \text{ днів} \times 486\,900 = 1,48 \cdot 10^{10} \text{ Од/рік}$$

Для зручності транспортування фермент, буде представлений у вигляді сухої маси із стандартною активністю 50000 од/г (<https://enzim.ua/index.php?lng=ru&page=protease>). Кількість лужної протеази в умовних кг складе:

$$A_{\text{цк}} = A_{\text{ст}} \cdot 1000 = 5 \cdot 10^4 \cdot 1000 = 5 \cdot 10^7 \text{ од/кг}$$

Кількість ферменту на рік с

$$G_{\text{гп}} = A_{\Sigma} / A_{\text{ст}} = 14,8 \cdot 10^9 \text{ Од} / 5 \cdot 10^4 \text{ Од/г} = 2,96 \cdot 10^5 \text{ г або } 296 \text{ кг/рік.}$$

Отже, для забезпечення протеазою як компонента засобу для прання дитячої одежі необхідно 296 кг/рік.

3.4 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для повного забезпечення дітей, миючими засобами з протеазою як компоненту бактерією *Bacillus cereus* GVK21 необхідно одержати 296 кг/рік протеази з стандартною активністю 50 000 од/г.

Беремо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 85, в інший час до кінця року підприємство може бути переорієнтовано на випуск аналогічної продукції, однак із залученням інших біологічних агентів. Тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) складатиме:

Кількість циклів (партій) за рік

$$N_{\text{цк}} = 24 \times T_{\text{рд}} / T_{\text{ц}} = 24 \times 85 / 58 = 35 \text{ циклів}$$

де $T_{\text{цв}}$ – цикл роботи ферментера, що включає тривалість виробничого біосинтезу (48 год) і необхідний час підготовки ферментера до здійснення ферментаційних процесів (10 год).

Підготовка ферментера до роботи складається із таких процесів: процес миття та огляд (2 год), здійснення перевірки на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів інокулятом (0,5 год) та вивантаження культуральної рідини (1 год).

Розрахуємо кількість ум.кг ферменту/цикл

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}}/N_{\text{цк}}=296/35=8,5 \text{ ферм.}/\text{цикл}$$

Розрахуємо кількість одиниць активності ферменту, що знаходяться в 1 умовному кг, Од фм / ум. Кг препарату

$$A_{\text{цк}} = A_{\text{ст}} \cdot 1000 = 5 \times 10^4 \times 1000 = 5 \times 10^7$$

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

$$A_{\text{крт}} = A_{\text{кр}} \times 10^6 (1 - E_a) / P_{\text{кр}} = 912 \times 10^6 (1 - 0,30) / 2 = 273,6 \times 10^6 \text{ од/тов. кг}$$

Де, $A_{\text{кр}}$ – активність препарату в культуральній рідині, од/ мл КР, E_a – сумарні втрати активності фермента при виділенні, $P_{\text{кр}}$ – Концентрація фермента в КР, кг фм/м³ КР (так як у статті не вказано кількості ферменту, ми умовно беремо 2 г/л)

Кількість товарного ферменту за цикл, тов.кг/цикл

$$G_{\text{цкт}} = A_{\text{цк}} \times G_{\text{цк}} / A_{\text{крт}} = 5 \times 10^7 \times 8,5 / 273,6 \times 10^6 = 1,55 \text{ тов.кг/цикл}$$

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

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цкт}} \cdot C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \times 1,55 \times 0,9 / 2 (1 - 0,30) = 3,1 \text{ м}^3$$

$E_{\text{св}}$ – сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат по стадіям виділення готового продукту), K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$). Приймаємо $K_1 = 1,1$.

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{\text{ф}}$, м³

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 3,1 / 1 - 0,1 = 3,4 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, м³

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_{\text{ф}} = 3,4 / 0,6 = 5,6$$

де $K_{\text{зап}} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Згідно таблиці, що містить габарити ферментерів відповідно до ГОСТів (оскільки замовлення ферментера із унікальним розміром має вищу вартість) найближчий геометричний об'єм ферментера складає $V_{\text{ф}} = 6,3 \text{ м}^3$.

Уточнимо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{уф}} = V_{\text{ф}} / V_{\text{гф}} = 3,4 / 6,3 = 0,539$$

Перевірене значення $K_{\text{уф}}$ відповідає вибраному діапазону (комбінованого – 0,5 – 0,65)

3.5 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу протеази *Bacillus cereus* GVK21

За один виробничий цикл можливо отримати $V_{\text{цк}} = 3,4 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Необхідно врахувати, що при одержанні культуральної рідини втрати ($E_{\text{ф}}$) в результаті краплевиносу через колектор становть 10-15%. Так, кількість поживного середовища та інокуляту перед виробничим біосинтезом складатиме:

$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 3,4 / (1 - 0,1) = 3,7 \text{ м}^3$, що становить робочий об'єм ферментера.

Розрахуємо можливий геометричний об'єм ферментера для заданого об'єму культуральної рідини за коефіцієнта заповнення ($K_{\text{н}}$) – 0,6

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 3,7 / 0,6 = 6,3 \text{ м}^3.$$

Для отримання такої кількості культуральної рідини приймаємо стандартний ферментер – $V_{\text{сф}} = 6,3 \text{ м}^3$ і перераховуємо попередньо заданий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зп1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 3,7 / 6,3 = 0,59$$

Отримане значення не перевищує значно задане значення, а отже коефіцієнт заповнення було обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу (X_{ϕ}) для засіву ферментера складає 10 % від об'єму поживного середовища. Кількість поживного середовища ($V_{\text{пс1}}$) в обраному ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\phi}) = 3,7 / (1 + 0,1) = 3,36 \text{ м}^3.$$

Так, кількість посівного матеріалу ($V_{\text{пм1}}$) складатиме:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 3,7 - 3,36 = 0,34 \text{ м}^3.$$

Для одержання $0,34 \text{ м}^3$ посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ($V_{\text{пс2}}$) і посівного матеріалу ($V_{\text{пм2}}$) складатиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\phi}) = 0,34 / (1 - 0,1) = 0,38 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\phi}) = 0,38 / (1 + 0,1) = 0,34 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,38 - 0,34 = 0,04 \text{ м}^3$$

Об'єм інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,38 \text{ м}^3$ (380 л) можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап2}} = 0,38 / 0,5 = 0,76 \text{ м}^3.$$

Приймаємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом $V_{\text{сф2}} = 1 \text{ м}^3$. Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{з2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф2}} = 0,38 / 1 = 0,38.$$

Для одержання 40 л посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого

повітря (E_{ϕ}), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ($V_{\text{пс}4}$) і посівного матеріалу ($V_{\text{пм}4}$) складатиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\phi}) = 40 / (1 - 0,1) = 44,4 \text{ л}$$

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\phi}) = 44,4 / (1 + 0,1) = 40,4 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 44,4 - 40,4 = 4 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.3}}=44,4$ можна одержати під час культивування продуцента в інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{\text{па3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап.3}} = 44,4 / 0,5 = 88,8 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}}=100$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{31} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сф3}} = 44,4 / 100 = 0,44$$

Кількість посівного матеріалу для засіву невеликого ферментера $V_{\text{пм}4} = 4$ л можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{\text{па4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап4}} = 4 / 0,5 = 8 \text{ л.}$$

Приймаємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом $V_{\text{сф4}} = 0,01 \text{ м}^3$. Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{32} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сф4}} = 0,004 / 0,01 = 0,4.$$

Для одержання 4 л посівного матеріалу в інокуляторі необхідно врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), що становить 10-15%. Так, кількість поживного середовища ($V_{\text{пс}4}$) і посівного матеріалу ($V_{\text{пм}4}$) складатиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\phi}) = 4 / (1 - 0,1) = 4,4 \text{ л}$$

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\phi}) = 4,4 / (1 + 0,1) = 4 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 4,4 - 4 = 0,4 \text{ л.}$$

Об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм5}} = 0,4$ л (400 мл) можна отримати шляхом культивування штаму-продуцента в колбах на качалці. Для цього використовують колби Ерленмеєра з $V_{\text{колб}} = 750$ мл з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,2$.

Кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_3) = 400 / (750 \cdot 0,2) = 2,7 = 3 \text{ колби.}$$

Таким чином, для одержання інокуляту необхідно 3 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу натаміцину у ферментері об'ємом 8 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,5 буде проходити у п'ять етапів. Так, за результатами розрахунків для біосинтезу протеази *Bacillus cereus* GVK21 необхідно встановити наступні апарати: один ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$, один інокулятор об'ємом 1 м^3 , один інокулятор об'ємом 100 л та один

Об'єм ферментера, м^3	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, м^3	Об'єм посівного матеріалу (10%), м^3	Об'єм підготовки поживного середовища, м^3	інокулятор на 10,0 л.
6,3	0,5	3,7	0,34	3,36	Табл. 1.2
1	0,5	0,38	0,04	0,34	
0,1	0,5	0,04	0,0004	0,0404	
0,01	0,5	0,0040	0,0000	0,004	
		8	4		

Розділ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СТАДІЇ					Літера			Аркш	Аркшів
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата	Розділ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СТАДІЇ			34	37
Розробник	Задашита Е.Г.								
Керівник	Гидзенко О.В.								
Н. контр									
Консильт									
Зав. каф.	Стадніков							Кафедра БТМ	

4.1 Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для культивування *Bacillus cereus* GVK21 – продуцента протеази

Максимальний синтез протеази (912 од/мл за 48 год) досягається за умов росту *Bacillus cereus* GVK21 на середовищі такого складу (г/л): М'яса - 10; Пептон – 15,0; Дріжджовий екстракт - 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 KH_2PO_4 - 0,05.

Згідно розрахунків, наведених у розділі 1, виробничий біосинтез протеази здійснюється у ферментері об'ємом 8 м³, що містить 3,36 м³ середовища. Одержання інокуляту відбувається у 5 етапів (у колбах на качалій, інокуляторі та посівному апараті об'ємом 1 м³, 100 л, 10 л та 1 л відповідно).

Для нормального росту *B. cereus* GVK21 діапазон оптимального рН=9,0. Для того щоб простерилізувати разом солі магнію та фосфору необхідний рН=4,5-5 (для того щоб не відбулося реакції з утворенням нерозчинних солей) та з наступним доведенням рН до оптимального росту продуцента необхідно підготувати титрувальні розчини.

Для корегування рН готують титрувальний розчин 6% HCl , а також 6 % розчин NaOH для якого буде потрібен реактор-змішувач об'ємом 10 л.

Розчин NaOH стерилізують при 131 °С протягом 40 хв. Він додається на стадії після стерилізації магнієвих та фосфорних солей для доведення рН від 4,0 – 4,5 до 9,0, що є оптимальним для продуцента.

Розчин 6 % HCl готується з концентрованої 36 % кислоти HCl і не стерилізується.

Піногасник. Так як в поживному середовищі ми маємо пептон та дріжджовий екстракт під час культивування може почати утворюватися дуже багато зайвої піни, що може викликати проблеми. Для зниження піноутворення використовують механічні та хімічні піногасники. В якості механічного піногасника виступає мішалка, однак цей спосіб знищення піни є малоефективним, тому для підвищення ефекту варто застосовувати також хімічні піногасники. Хімічні піногасники можуть бути жировими та синтетичними. Зараз жирові піногасники все частіше замінюються на синтетичні. Оскільки жири можуть споживатися мікроорганізмами та змінювати рН середовища, обираємо синтетичні піногасники.

До синтетичних піногасників відносяться силікони, пропіноли, контрамін та поліформаль [30].

Тому потрібно використати піногасники. В якості піногасника будемо використовуватись SILFAR SE 4 (<https://siloxane.com.ua/a149405-penogasiteli-dlya-fermentnyh.html>).

Як заявлено виробником він не заважає росту мікроорганізмів та не впливає на кінчений продукт.

4.1.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

*B. cereus*GVK21 є аеробом, тому для його культивування і отримання цільового продукту є обов'язковою підготовка стерильного аераційного повітря. Підготовка повітря проводиться для очищення від механічних часток, джерел контамінації та стабілізації термодинамічних показників.

Для стерилізації повітря з належними характеристиками використовують два методи: знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання, наприклад, за допомогою УФ-опромінювання, та вилучення її методом фільтрування через пористі матеріали.

Метод нагрівання або іонізуючого випромінювання є більш надійним та ефективним, але для промислових масштабів є неприйнятним, оскільки у виробничих умовах витрачають занадто великі об'єми повітря. В промислових умовах використовують в основному метод фільтрування крізь шари насипного, пористого або волокнистого матеріалу [29].

Тому для одержання повітря в боксах та лабораторії, де працюють з посівною культурою та інокулятом, можна використовувати УФ-лампи (опромінення ультрафіолетовими променями), так як не потребують великої кількості повітря.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності). Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед кожним ферментером. Головні ферментери заповнюються набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється близько 98% мікроорганізмів-контамінантів. На наступному рівні-індивідуальні фільтри, заповнені надтонкими мембранами або волокнами, що забезпечує видалення решти 2% контамінантів.

Для фільтрувальних волокон висувається основна вимога це висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтрування

В якості головного фільтра можна використати базальтове волокно. Основною перевагою базальтового волокна є висока паростійкість (більша ніж скляного волокна). При багаторазовому впливі гострої пари під тиском 0,2 МПа волокно не знижує своєї міцності протягом 1 року роботи фільтра. Властивості базальтового волокна при нагріванні до 1100 °С не змінюються. Базальтове волокно не піддається гниттю й горінню. Експериментально

показано, що оптимальний діаметр волокна для фільтрів грубого очищення повітря становить 12-14 мкм. Недоліком базальтового волокна є наявність у ньому кілких голок з базальтових підплавів і інших механічних включень.

В якості індивідуального фільтру буде використовуватись фільтри з фторопласту у вигляді ФЕП- фільтрувального елемента патронного типу. Їх перевагою є швидка заміна та багаторазовість [30].

4.1.3 Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для підготовки обладнання і комунікацій обирають спосіб зовнішньої та внутрішньої мийки. Розрізняють наступні способи мийки: ручна; мийка замочування (ванни для замочування з'ємних деталей); струмнна мийка під високим тиском; пінна мийка із застосуванням гелів; циркуляційна СІР-мийка (CleaningInPlace)- безробітна мийка (часто автоматизована) для ємностей і трубопроводів за допомогою пристроїв високого та низького тиску.

Виробництво протеази здійснюється у продовж 85 днів. Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер (6,3 м³), інокулятори (1 м³, 100 л, 10 л) збірники та інше обладнання становитиме 45 м²

Ферментер об'ємом 6.3 м³ має діаметр приблизно 4 м, інокулятор 1 м³ - 1 м, інокулятор 100 л -0,58 м, інокулятор 10 л-0,2 м. Треба врахувати, що ще потрібен простір для обслуговування апаратів візьмемо приблизно 3 м. Тобто оптимальним площа виробничого приміщення повинна складати $(4+1+0,58+0,2)+(3\times4)=17,78\approx18\text{ м}^2$

Висота стін-12,1 м. Загальна площа стін $(4\times12,1)+(4,5\times12,1) \times2=205,7\text{ м}^2$. Площа підлоги 18 м². Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати.

Об'єкт	Площа	Кількість	Загальна
миття та/або	(об'єм)	процесів миття	площа (об'єм)

дезінфекції	оброблюваного об'єкта, м ² (л)	та/або дезінфекцій за весь період виробництва	миття та/або дезінфекції об'єкта за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнан ня, інвентар, комунікація	9110	35	318 850 л
Підлога	18	170	1 530
Стіни, двері, вікна	205,7	170	1851,3

Щоб обрати миючий та дезінфікуючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблення потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² витрачається 100 мл робочого розчину миючого чи дезінфікуючого засобу (згідно з методичного рекомендаціями для підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Поточна прибирання буде відбуватись кожен день по два рази (на початку та в кінці робочого дня). Генеральне прибирання буде відбуватись перед початком нового виробничого процесу тобто через кожні 48 годин.

Миючі та дезінфікуючі засоби

Кальцинована сода являє собою зневоднений вуглекислий натрій (Na₂ CO₃). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють

мийні властивості. Гарячі (55 + - 5) градусів Цельсію розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до (45 + - 5) градусів Цельсію їх мийна здатність різко падає. Розчини кальцинованої соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру і слизову оболонку очей.

Рекомендується використовувати 0,5 % розчини кальцинованої соди температурою (45 + - 5) градусів Цельсію для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також (1-2) % розчини температурою (55 + - 5) градусів Цельсію для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій.

Розчини кальцинованої соди не призначені для миття обладнання, комунікацій та інвентарю, які виготовлені з алюмінію.

Каустична сода (їдкий натр, NaOH) являє собою безбарвну кристалічну речовину. Гігроскопічна. Добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1-2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в складських неопалюваних приміщеннях. Рекомендується використовувати 0,5 % розчини каустичної соди температурою (45 + - 5) градусів Цельсію для ручного миття технологічного обладнання та

інвентарю, а також (1-2) % розчини температурою (55 + - 5) градусів Цельсію для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій. Розчини каустичної соди не призначені для миття обладнання, комунікацій та інвентарю, які виготовлені з алюмінію.

«**DivosanForte**» є високоефективним дезінфікуючим засобом на основі надцтової кислоти, застосовується в харчовій, молочній промисловості та на виробництві безалкогольних напоїв.

DivosanForte являє собою стабілізований 15% розчин надцтової кислоти, що не піниться і легко змивається. Високо ефективний при видаленні будь-яких типів мікроорганізмів, включаючи бактерії, дріжджі, грибок та віруси.

DivosanForte спеціально розроблений як дезінфектант заключного миття, що застосовується в системах автоматичного CIP миття. Прекрасно видаляє плями і має ефект, що деодорує.

DivosanForte рекомендований для автоматичної подачі за допомогою відповідного обладнання для автоматичного миття.

«**PROFI CHLOR**», призначений для проведення поточної та заключної дезінфекції, генеральних прибирань, дезінфекції твердих поверхонь приміщень, приладів, устаткування, санітарно-технічного обладнання.

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин: Натрієва сіль дихлорізаціанурової кислоти не < 85,5 % з масовою часткою активного хлору 54,0-58,0 %. Допоміжні речовини: адипінова кислота, бікарбонат натрію, карбонат натрію, сульфат натрію.

4.1.4 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus cereus* GVK21, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: м'яса, дріжджовий автолізат та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

М'яса, пептон та дріжджовий екстракт (компонент А) є термолабільним і потребує м'якого режиму стерилізації.

Окремо готують запасних три розчини мікроелементів об'ємом 100 мл (з розрахунку на використання в трьох стадіях підготовки посівного матеріалу тобто для колб на качалках та для посівних апаратів 10 л і 100 л). Розчин мікроелементів стерилізують в автоклаві при 131°С упродовж 40 хв.

Так як м'яса має дуже специфічний колір, а продукт буде використовуватись для засобів для прання, м'ясу попередньо освітлюють.

Для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 10 л, 100 л

Композиція А: м'яса, дріжджовий автолізат та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

Стерилізований розчин мікроелементів додається окремо до поживного середовища.

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 1 м³

Стерилізації поживного середовища, необхідного для цієї стадії, здійснюється у ректорі-змішувачі на 500 л що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: меляса, дріжджовий автолізат та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв, рН 4,0-4,5).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А, для того щоб не відбувалась взаємодія солей магнію та фосфору, солі розчиняють в окремому реакторі в якому рН доводять до 4,0-4,5, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація.

Для виробничого біосинтезу

Стерилізація 6,30 м³ поживного середовища, необхідних для цієї стадії, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: меляса, дріжджовий автолізат та пептон (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

Композиція Б: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв, рН 4,0-4,5).

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробника)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевією сіткою для виділення механічного забруднення
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал-базальтове волокно фільтрування 0,1 м/с, Е=90% [31]
К-3	Компресор	1	Компресор KSD-76А фірми Keshidi (Китай) 4 куб. м/хв, робочий тиск 7 МПа[32]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач від фірми БерхордИнжиниринг, ООО (Україна) продуктивність 24 м³/год [33]

Р-5		Ресивер		1		Ресивер фірми «ТОВ Завод енергообладнання Лідер» (Україна)					
						НЧХТ БТЕК: 04.0117-КР 53					
						виготовлений із сталі, об'єм 8800 л,					
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата							
Розробник		Задашта Е.Г			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ						
Керівник		Гидзенко О.В									
Н. контр											
Консульт											
Зав. каф.		Стадніков									
					Літера		Аркш		Аркшів		
							43		90		
									45		
									Кафедра БТМ		

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ
ОБЛАДНАННЯ

Літера	Аркш	Аркшів
	43	90
		45

Кафедра БТМ

			робочий тиск 10 атм [34]
Т-6	Теплообмінник -нагрівач	1	Теплообмінник ГФТА ТПСР-19 (Україна) товщина пластинок 0.5 мм -0.6 мм [35]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтруючий матеріал-фторопласт Е=99,92, швидкість фільтрування 42 м ³ /с [36]
Р-8	Реактор- змішувач для освітлення м'яси	1	Реактор-змішувач оснащений сорочкою перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 100 л, швидкість перемішування 360 об/хв [37]
Р-9	Реактор- змішувач для приготування та стерилізації м'яси, дріжджового екстракту та пептону	1	Реактор-змішувач оснащений сорочкою перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 10 л, швидкість перемішування 100 об/хв [38]
ФІ-10 ФІ-11 ФІ-12 ФІ-13	Фільтр індивідуальної очистки	4	Фільтр РФМ-3,0, компанія ГеоСорб (Росія), фільтруючий матеріал – сополімерстирола , Е = 99,99 % , середній діаметр волокон 2 мкм, щільність поверхні 45 г/ м ² , опір повітряного потоку 12 Па [39].
ФР-14	Ферментер (інокулятор)	1	Лабораторний ферментер Pro-Labz двома культуральними судинами

			(Росія). Об'єм апарату 10 л [40]
Р-15	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації м'яси, дріжджового екстракту та пептону	1	Реактор-змішувач оснащений сорочкою перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 50 л, швидкість перемішування 100 об/хв [41]
ФР-16	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер РФ-100 фірми «Промовит». Об'єм апарату 100 л [42]
Р-17	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації м'яси, дріжджового екстракту та пептону	1	Реактор-змішувач оснащений сорочкою перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 500 л, швидкість перемішування 100 об/хв [43]
ОД-18	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для сипких продуктів НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. Продуктивність: від 0,01 до 5 м куб./год [44]

Н-19	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний WG600S фірми «ZhengzhouMingyiInstrumentEquipment Co., Ltd» (Китай), продуктивність 0,4-13 л / хв [45]
ФР-20	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер «БИОТЕХНО» (Росія). Об'єм апарату 1 м ³ [46]
Р-21	Реактор- змішувач об'ємом 4000 л	1	Об'єм апарату – 4000 л; матеріал – нержавіюча сталь AISI 304; частота обертання лопатевої мішалки – 100 об/хв, Єврохиммаш [47]
Р-22	Реактор- змішувач для приготування лугу	1	Реактор-змішувач оснащений сорочкою перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 15 л, швидкість перемішування 100 об/хв [48]
Р-23	Реактор- змішувач стерилізації для піногасника	1	Реактор-змішувач об'єм 20 л, швидкість перемішування 100 об/хв [49]
ФР-24	Ферментер	1	Ферментер від фірми «LPPGroup»(Швеція). Об'єм апарату 6,30 м ³ [50]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Технологічна схема біосинтезу протеази включає в себе допоміжні роботи (підготовка повітря, підготовка, санітарну підготовку і стерилізація поживних середовищ) та безпосередньо сам технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і виробничий біосинтез).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.1.1. Миття обладнання

Для миття внутрішньої поверхні інокуляторів і ферментера використовуємо 5 %-ий розчин каустичної соди, який закупасться вже в необхідній концентрації. Процес миття ведеться вручну кваліфікованим персоналом протягом 1–2 годин. Температура розчину становить 70°C.

ДР 1.1.2. Технічний огляд обладнання та комунікацій

Проводимо візуальну перевірку усього обладнання, що бере участь у даному технологічному процесі, підтягуємо усі різьбові фланцеві з'єднання як на самому обладнанні, так і на трубопроводах.

ДР 1.1.3. Дезінфекція та ополіскування обладнання, комунікацій, підлоги та стін.

Для дезінфекції обладнання використовуємо «DivosanForte» та «PROFI CHLOR», температурою 20°C, яким оброблюємо зовнішні поверхні усіх апаратуру, комунікацію, підлогу та стіни. Розчин готується у спеціальних тарах. Ополіскування зовнішніх і внутрішніх поверхонь обладнання та комунікацій проводимо очищеною водою протягом 5 хв.

					НУХТ БТЕК 04.01.17 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№	Підпис	Дата			
Розробник	Задашита Е.Г				РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літера	Аркш
Керівник	Гідзенко О.В						48
Н. контр							969
Консульт						Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Стадніков						

ДР 1.1.4. Перевірка на герметичність обладнання

У обладнання подаємо стерильне повітря за тиску 0,15–0,2 МПа і стежимо на наявність чи відсутність падіння тиску після 0,5–1 години. Якщо спостерігається падіння тиску більше чим 0,005 МПа, то апарат вважається не герметичним. Для пошуку нещільностей оброблюємо усі місця з'єднань мильним розчином і спостерігаємо за появою мильних бульбашок. При знаходженні нещільності у фланцевих з'єднань і кришок ємкісного обладнання, проводимо розбір та профілактичне ущільнення дефектних поверхонь, в якості ущільнювача використовуємо пароніт, фторопласт або гуму. При необхідності проводимо заміну пошкоджених елементів.

ДР 1.1.5. Стерилізація обладнання

Для стерилізації усього обладнання та комунікацій використовуємо насичену водяну пару температурою 130°C за тиску 0,2 МПа упродовж 1 години. Для забезпечення асептичності, після закінчення стерилізації, у інокулятори і ферментер подається стерильне повітря для підтримки надмірного тиску у межах від 0,003 до 0,005 МПа, дана процедура необхідна, щоб уникнути попадання сторонньої мікрофлори з навколишнього середовища

ДР 2.1. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Для визначення місця забору атмосферного повітря необхідно враховувати можливі джерела забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди).

Оскільки висота промислової будівлі становить 9,2 м то забір повітря буде здійснюватися на висоті 12,2 м за допомогою повітрозбірника (ПЗ-1).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря від пилу та часточок

На цій стадії з повітря видаляється основна маса великих механічних часточок та пилу. Для цього використовують фільтри грубої очистки (Ф-2). Ступінь очищення 90 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

За допомогою компресора (К-3) повітря стискають до 0,35–0,5 МПа, при цьому повітря нагрівається до 120–250 °С.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Щоб запобігти випаданню вологи в крапле-вловлювачі, повітря «переохолоджують» до 25°С в теплообміннику (Т-4). Далі у ресивері (Р-5) відбувається стабілізація вологості повітря $W = 60 \%$.

ДР 2.5. Стабілізація термодинамічних показників

Надалі, повітря підігрівають у теплообміннику (Т-6) для забезпечення надійної роботи фільтрів до температури 45-50°С. При таких температурах не відбувається конденсація пари на волокнах фільтра.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі (Ф-7), як фільтрувальний матеріал використовують гофровану гідрофобну фторопластову мембрану. Ступінь очистки такого повітря становить $E = 95 \%$.

ДР 2.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Кінцева стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальному фільтрі (ФІ-10,11,12,13). Як фільтрувальний матеріал використовують сополімерстирола. Ступінь очищення становить $E=99,99 \%$.

Далі стерильне аераційне повітря надходить на інші стадії виробничого процесу.

ДР 3 Приготування титрувального агента.

ДР 2.1 Для того, щоб мати можливість стерилізувати магнієві, кальцієві і фосфорні солі разом, необхідно довести рН до 4,0 – 4,5. Для цього використовують 0,6 % розчин HCl.

ДР 3.1.1 Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 1 м³.

Потрібно приготувати 50 мл розчину 6% розчину HCl у колбу об'ємом 100 мл наливають 40 мл питної води і 10 мл 36%-го розчину HCl та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 3.1.2 Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в ферментері об'ємом 6,30 м³.

Потрібно приготувати 50 мл розчину 6% розчину HCl у колбу об'ємом 100 мл наливають 40 мл питної води і 10 мл 36%-го розчину HCl та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 3.2.1 Приготування 6%-го розчину NaOH для підлуження середовища вирощування в інокуляторі об'ємом 10 л.

Потрібно приготувати 25 мл розчину 6%-го розчину NaOH для підлуження поживного середовища на стадії приготування ПС в інокуляторі об'ємом 10 л

Для цього в колбу об'ємом 50 мл наливають 23,5 мл питної води і за допомогою шпателя, додають 1,5 г NaOH. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Розчин стерелізують при температурі 131 °C протягом 40 хв, P= 0,15 МПа

ДР 3.2.2 Приготування 6%-го розчину NaOH для підлуження середовища вирощування в інокуляторі об'ємом 100 л.

Для приготування 160 мл 6%-го розчину NaOH цього в колбу об'ємом 200 мл наливають 150,4 мл питної води і за допомогою шпателя, додають 9,6

г NaOH. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Розчин стерелізують при температурі 131 °C протягом 40 хв, P= 0,15 МПа

ДР 3.2.3 Приготування 6%-го розчину NaOH для підлучення середовища вирощування в інокуляторі об'ємом 1 м³.

Для приготування 1,6 л 6%-го розчину NaOH цього в колбу об'ємом 2 л наливають 1,504 л питної води і за допомогою шпателя, додають 96 г NaOH. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Розчин стерелізують при температурі 131 °C протягом 40 хв, P= 0,15 МПа

ДР 3.2.4 Приготування 6%-го розчину NaOH для підлучення середовища вирощування в інокуляторі об'ємом 8 м³.

Потрібно приготувати 12 л розчину 6% розчину NaOH у реакторі об'ємом 15 л (Р-22) через об'ємно-ваговий (ОД-18) дозатор подають наливають 12 л питної води і 800 г NaOH та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Розчин стерелізують при температурі 131 °C протягом 40 хв, P= 0,15 МПа.

ДР 3.3 Для освітлення м'яси необхідно її підкислити до рН 4-4,5

ДР 3.3.1 Приготування 1 н розчину H₂SO₄ для підкислення м'яси.

Потрібно приготувати 500 мл розчину 1н розчину H₂SO₄ у колбу об'ємом 1 л наливають 400 мл питної води і 100 мл 36%-го розчину H₂SO₄ та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 4. Підготовка та стерилізація піногасника.

Для піногасіння ми обираємо силікони, оскільки вони є досить ефективними. Піногасник подається при появі піни на кожній стадії культивування в концентрації 0,5% [43].

ДР 4.1 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для інокулятора 10 л.

Для інокулятора об'ємом 10 л кількість піногасника буде становити 20 мл. Його стерилізують в автоклаві у колбі об'ємом 50 мл. Режим стерилізації 160 °C протягом 2 год. За потреби подають до ТП 6.5.

ДР 4.2 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника інокулятора 100 л.

Для інокулятора об'ємом 100 л кількість піногасника буде становити 200 мл. Його стерилізують в автоклаві у колбі об'ємом 250 мл. Режим стерилізації 160 °C протягом 2 год. За потреби подають до ТП 6.6.

ДР 4.2 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника інокулятора 1 м³.

Для інокулятора об'ємом 1 м³ кількість піногасника буде становити 2 л. Його стерилізують в автоклаві у колбі об'ємом 2,5 л. Режим стерилізації 160 °C протягом 2 год. За потреби подають до ТП 6.7.

ДР 4.3 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для ферментера

Для робочого ферментара 8 м³ кількість піногасника буде становити 16 л. Його стерилізують у реакторі об'ємом 20 л (Р-23) та подають у ферментер при появі піни (до ТП 7.1). Режим стерилізації 160 °C протягом 2 год.

ДР 5. Освітлення меляси

ДР 5.1. Приготування розчину меляси

У реактор (Р-8) об'ємом 100 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОД-18) вносять 37,444 кг меляси, додають 38 л питної води та вмикають перемішуючий пристрій.

ДР 5.2. Підкислення розчину меляси та освітлення меляси

Для підкислення меляси у реактор (Р-8) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОД-18) вносять 500 мл 1 н сульфатної кислоти. Даний

розчин витримують протягом 24 години при температурі не нижче 25° С, і перемішують при 150 об/хв протягом 10 хв.

ДР 6. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 6.1 Приготування розчину мікроелементів

У зв'язку із малою концентрацією мікроелементів їх готуємо окремо для культивування в колбах на качалках, інокуляторів об'ємом 10 л (ФР-14) та 100 л (ФР-16) у вигляді концентрованого розчину. Зважуємо на аналітичних вагах компоненти згідно *табл. 4.1*. Засипаємо їх у колбу на 200 мл, питну воду у кількості $100 - 3,136 = 96,864$ мл. Підкислюємо до 4,5-5 рН та ретельно перемішуємо до розчинення. Додаємо розчин мікроелементів до поживних середовищ у кількості згідно *табл. 6.1*

Об'єм середовища , л	MnSO ₄ ·4H ₂ O, г	KH ₂ PO ₄	Заг. Маса, г	Об'єм, мл
40,4	0,808	2,02	2,828	92
4	0,08	0,2	0,28	8
0,4	0,008	0,02	0,028	0,1
Разом	0,896	2,24	3,136	100

Таблиця 6.1

ДР 6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Вміст компонентів для приготування 400 мл середовища наведено в *табл. 6.2*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 400 мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 1 400 мл середовища, г	Вода, мл	Композиц ія	Об'єм, мл
Меляса	10	4	373,8	А	373,8
Пептон	15	6			
Дріжджовий автолізат	5,0	2			

Таблиця 6.2

ДР 6.2.1 Приготування і стерилізують композиції А

У відтарований на технічних терезах лабораторний стаканчик об'ємом 750 мл додають 23,14 г меляси, додають 2,9 г пептону, 0,17 г дріжджового екстракту та додають 373,8 мл теплої питної води і перемішують до розчинення компонентів після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 112 °С,(0,05 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 6.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л (ФР-14)

Для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л, необхідно приготувати 4 л поживного середовища.*табл. 6.3*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 4 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 4 л середовища, г	Вода, л	Конденсат(10%)	Композиція	Об'єм, л
Меляса	10	40	3,492	0,388	А	3,880
Пептон	15	60				
Дріжджовий автолізат	5,0	20				

Таблиця 6.3

ДР 6.3.1 Приготування і стерилізують композиції А

На технічних вагах зважують 40 г меляси, 60 г пептону, 20 г дріжджового екстракту. Наважку переносять в реактор-змішувач об'ємом 10 л (Р-10) і додають 3,492 л води, перемішують. Стерилізують в при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 хв ($P=0,05\text{ МПа}$). Після цього передають в інокулятор.

ДР 5.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л (ФР-16)

Для культивування в інокуляторі об'ємом 100 л, необхідно приготувати 40,4 л поживного середовища *табл.6.4*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 40 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 40 л середовища, г	Вода, л	Конденсат (10%)	Композиція	Об'єм, л
Меляса	10	400	34,92	3,88	А	38,8
Пептон	15	600				

Дріжджовий автолізат	5,0	200				
----------------------	-----	-----	--	--	--	--

Таблиця 6.4

ДР 6.4.1 Приготування і стерилізують композиції А

На технічних вагах зважують 400 г меляси, 600 г пептону, 200 г дріжджового екстракту. Наважку переносять в реактор об'ємом 10 л (Р-9) і додають 34,92 л води, перемішують. Стерилізують в при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 хв ($P=0,05\text{ МПа}$). Після цього передають в інокулятор.

ДР 6.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м^3 (ФР-20)

Для культивування в інокуляторі об'ємом 1 м^3 , необхідно приготувати $0,34\text{ м}^3$ поживного середовища *табл. 4.5*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування $0,34\text{ м}^3$ середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у $0,34\text{ м}^3$ середовища, г	Вода, л	Конденсат (10%)	Композиція	Об'єм, л
Меляса	10	3400	350,37	38,93	А	389,3
Пептон	15	5100				
Дріжджовий автолізат	5,0	1700				
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	6,8	0,5	-	Б	0,5
KH_2PO_4	0,05	17				

Таблиця 6.5

ДР 6.5.1 Приготування і стерилізують композиції А

На технічних вагах зважують 3400 г меляси, 5100 г пептону, 1700 г дріжджового екстракту. Наважку переносять в реактор об'ємом 500 л (Р-17) і додають 350,37 л води, перемішують. Стерилізують в при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 хв ($P=0,05\text{ МПа}$). Після цього за допомогою передають в інокулятор.

ДР 6.5.2 Приготування і стерилізують композиції Б

У відтарований на технічних терезах лабораторний стаканчик об'ємом 1 л додають 6,8 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 17 г KH_2PO_4 і 476,8 мл теплої питної води, до отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.2) до рН 4,5 знову перемішують і закривають колбу ватно-марлевим корком. Приготований розчин мінералів стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 6.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для в ферментері об'ємом 8 м^3 (ФР-24)

Для культивування в інокуляторі об'ємом $6,30\text{ м}^3$, необхідно приготувати $3,36\text{ м}^3$ поживного середовища *табл. 4.6*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування $3,36\text{ м}^3$ середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у $3,36\text{ м}^3$ середовища, г	Вода, л	Конденсат (10%)	Композиція	Об'єм, л
Меляса	10	33 600	2 932,38	325,82	А	3 258,2
Пептон	15	50 400				
Дріжджовий автолізат	5,0	16 800				

MgSO ₄ *7H ₂ O	0,02	67,2	1	-	Б	1
KH ₂ PO ₄	0,05	168				

Таблиця 6.6

ДР 6.6.1 Приготування і стерилізують композиції А

Через ваговий дозатор подають 33 600 г меляси, 50 400 г пептону, 16 800 г дріжджового екстракту. Наважку переносять в реактор об'ємом 4 м³ (Р-21) і додають 2 932,38 л води, перемішують. Стерилізують в при $t = 112^{\circ}\text{C}$ 30 хв ($P=0,05$ МПа). Після цього передають в ферментер.

ДР 6.6.2 Приготування і стерилізують композиції Б

У відтарований на технічних терезах лабораторний стаканчик об'ємом 1,5 л додають 62,7 г MgSO₄ × 7H₂O, 168 г KH₂PO₄ і 769,3 мл теплої питної води, до отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.2) до рН 4,5 знову перемішують і закривають колбу ватно–марлевым корком. Приготований розчин мінералів стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1. Підтримання колекційної культури.

Отриману колекційну культуру *Bacillus cereus* GVK21 у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (МПА – м'ясо–пептонний агар) у темряві, при температурі $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1...2 рази на місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 7.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА для одержання ізолюваних колоній. Культивують в термостаті при $t = 40 \pm 1$ °C (36 год).

ТП 7.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізолювані колонії з чашки Петрі (від ТП 6.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при $t = 40 \pm 1$ °C (24 год).

ТП 7.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В умовно асептичних умовах у колбу об'ємом 750 мл з стерильною композицією А (від ДР 6.2.1) зливають простерилізовані розчини солей (від ДР 5.1), перемішують і розливають по 160 мл у качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus cereus* GVK 21 (від ТП 7.3) 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 (140 об/хв) при $t = 40 \pm 1$ °C (24 год).

ТП 7.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л

В боксі в умовно асептичних умовах у спеціальний балон для асептичної передачі зливають розчин меляси, пептону і дріжджового екстракт (від ДР 6.2.1.), перемішують і отриманий розчин асептично самопливом передають у інокулятор де вже знаходиться розчин солей (від ДР 6.1) Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від

ДР 3.2.1.) рН середовища за показником датчика рН до 9,0. Через засівну стерильну колбу вносять 3 л посівного матеріалу від ТП 6.4. За сигналом датчика піни відбувається подача піногасника (від ДР 5.1). Культивують до концентрації ферменту протеази 912 од/мл при $t = 40 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і постійною аерацією (значення $pO_2 = 20\text{--}30$ % від насиченого повітря) впродовж 48 год.

ТП 7.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

В боксі в умовно асептичних умовах у спеціальний балон для асептичної передачі зливають розчин меляси, пептону і дріжджового екстракт (від ДР 5.3.1.), перемішують і отриманий розчин асептично за допомогою перистальтичного насосу (Н-19) передають у інокулятор де вже знаходиться розчин солей (від ДР 6.1) Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.2.2.) рН середовища за показником датчика рН до 9,0. За допомогою насосу перекачують посівний матеріал від ТП 5.5. Культивують до концентрації ферменту протеази 912 од/мл при $t = 40 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і постійною аерацією (значення $pO_2 = 20\text{--}30$ % від насиченого повітря) впродовж 16 год.

ТП 7.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

В боксі в умовно асептичних умовах у спеціальний балон для асептичної передачі зливають розчин меляси, пептону і дріжджового екстракт (від ДР 6.4.1.), перемішують і отриманий розчин асептично за допомогою перистальтичного насосу (Н-19) передають у інокулятор де вже знаходиться розчин солей (від ДР 6.4.2). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 3.2.3.) рН середовища за показником датчика рН до 9,0. За допомогою насосу перекачують посівний матеріал від ТП 3.6. Культивують до концентрації ферменту протеази 912 од/мл при $t = 40 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і постійною аерацією (значення $pO_2 = 20\text{--}30$ % від насиченого повітря) впродовж 16 год.

ТП 7. Виробниче культивування в ферментері об'ємом 8 м³

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 8 м³ перекачують простерилізоване поживне середовище (від ДР 6.5.1.). За допомогою стерильної засівної колби додають розчин солей (від ДР 6.5.2.). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6 %-м розчином NaOH (від ДР 3.2.4.) рН середовища за показником датчика рН до 9,0. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора інокулянт від ТП 5.7. Культивують до протеолітичної активності 912 од/мл, відповідно, при $t = 40 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і постійною аерацією (значення $pO_2 = 20\text{--}30$ % від насиченого повітря) впродовж 48 год.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Упродовж всього процесу культивування в інокуляторах і ферментері періодично (кожні 8 годин) відбирають проби культуральної рідини для аналізу.

7.1 Мікробіологічний контроль здійснюють для контролю стерильності поживних середовищ для вирощування інокуляту і середовищ для біосинтезу цільового продукту, а також для виявлення сторонньої мікробіоти у посівному матеріалі і культуральній рідині під час біосинтезу. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби поживного середовища, готового посівного матеріалу і культуральної рідини на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим мікроскопуванням колоній, які вирости на середовищі після інкубування.

Підготовка чашок Петрі

Для почату чашки Петрі стерилізують в сухожаровій шафі потім по ним розливають по 20-30 мл розплавленої на киплячій водяній бані агаризовані середовища: СА (сусло-агар) і МПА (м'ясо-пептонний агар). Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб при температурі 30 °С кришками донизу.

Приготування розведень

Серію розведень посівного матеріалу і культуральної рідини готують для отримання ізольованих колоній на поверхні агаризованого середовища. Відібрану пробу досліджуваної суспензії об'ємом 1 мл стерильною піпеткою вносять у пробірку, яка містить 9 мл стерильної водопровідної води, ретельно перемішують. З отриманого розведення відбирають 1 мл і переносять у наступну пробірку з 10 мл стерильної водопровідної води.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.17 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Забашта Е.Г</i>				<i>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БІОСИНТЕЗУ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</i>		
<i>Керівник</i>	<i>Гидзенко О.В</i>						
<i>Н. контр</i>							
<i>Консильт</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стабніков</i>						
						<i>Літера</i>	<i>Аркиш</i>
							63
							90
							64
						<i>Кафедра БТМ</i>	

Аналогічно проводять наступні розведення. Кількість розведень залежить від припустимої кількості мікроорганізмів у досліджуваній суспензії. Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл суспензії стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателью Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат за температури 32-34 °C протягом 3-5 діб для СА і 2-3 діб для МПА. [51]

Мікроскопування і аналіз колоній.

Після інкубації візуально оцінюють колонії, які вирости, підраховують їх кількість. На чашках з посівами інокуляту і культуральної рідини повинні бути виявлені лише колонії виробничого штаму *Bacillus cereas* GVK21 і повна відсутність сторонньої мікробіоти. *Bacillus cereas* GVK21 великі паличкоподібні клітини розміром 1 x 3-4 мікрон, ендоспори розташовані центрально, не перевищують розміру клітини. Кожна клітина має кілька джгутиків, розміщені перетрихіально [52].

7.1 Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1 Визначення протеолітичної активності (ПС) (модифікований метод Ансона)

Основою визначення протеолітичної активності є вимірювання кількості тирозину, який утворився в результаті ферментативного гідролізу білка, з реактивом Фоліна.

Після дії дослідного ферментного препарату на розчин казеїну білок, що не розклався, осаджують 5%-ю трихлороцтовою кислотою (ТХО) і у фільтраті за допомогою колориметричної реакції з реактивом Фоліна визначають кількість гідролізованого білка, який не осаджується ТХО.

Беруть кількість розщепленого білка, пропорційну кількості тирозину, що міститься у фільтраті.

Одержані значення оптичної густини переводять у мікромолі тирозину за стандартною кривою, побудованою за чистим тирозином. За одиницю ПС взято таку кількість ферменту, яка каталізує перехід у неосаджуваний ТХО стан кількість білка, яка містить 1 мікромоль тирозину, за 1 хв при температурі 30 °С.

Протеолітичну активність препаратів виражають числом одиниць в 1 г препарату, а розчинів ферментів числом одиниць в 1 мл розчину.

Потім необхідно побудувати калібрувальну криву по тирозину і обчислити за нею тирозиновий еквівалент, тобто ту оптичну густину, яку дає 1 мкМ тирозину в 1 мл. Тирозиновий еквівалент використовується для обчислення протеолітичної активності.

Для визначення протеолітичної активності у дві пробірки наливають по 2 мл розчину казеїну і вміщують в ультратермостат з температурою 30 °С. Приблизно через 10 хв, після нагрівання розчину, у кожен з них додають по 2 мл розчину ферменту, струшують і поміщують в ультратермостат для гідролізу на 10 хв. Через 10 хв у обидві пробірки додають по 4 мл 5% ТХО, щоб перервати ферментативну реакцію і осадити білки та високомолекулярні продукти гідролізу. Суміш швидко перемішують і для забезпечення повного осадження витримують при температурі 30 °С ще 20 хв. Потім фільтрують через паперовий фільтр на маленьких воронках у сухі пробірки. Із прозорих фільтратів відбирають у пробірки по 1 мл, додають по 5 мл 0,5 М розчину Na_2CO_3 , перемішують і при безперервному перемішуванні швидко додають по 1 мл робочого розчину реактиву Фоліна. Дають реакційній суміші постояти 20 хв. Розчини набувають блакитного забарвлення, інтенсивність якого визначають на фотоелектроколориметрі.

Контроль готують, додаючи реагенти у зворотному порядку: до 2 мл ферментного розчину того самого розведення, що і в досліді, додають 4 мл ТХО, витримують в ультратермостаті 10хв, а потім вносять 2 мл субстрату.

Через 20 хв витримування в термостаті розчин фільтрують, відбирають у суху пробірку 1 мл фільтрату, а потім при перемішуванні вносять 5 мл 0,5 М Na_2CO_3 та 1 мл робочого розчину реактиву Фоліна. Контрольна проба повинна мати слабе блакитне забарвлення.

Колориметрування здійснюють на ФЕК з червоним світлофільтром (довжина хвилі 670 нм) в кюветах завтовшки 10 мм. Спочатку визначають поглинання контролю проти води D_k , а потім поглинання дослідного розчину проти води D_0 . Дійсне поглинання розчину становить $D_0 - D_k$. Для забезпечення достовірності аналізу поглинання розчину має бути в межах 0,3...0,6. У розрахунках використовують середнє значення, одержане із двох паралельних визначень.

Для визначення протеолітичної активності культуральної рідини, од / мл, користуються формулою,

$$PC = \frac{D \cdot 4}{n \cdot TE \cdot 10} \cdot P,$$

де $D = D_0 - D_k$ – оптична густина; 4 – об'єм реакційної суміші, мл; n – кількість розчину, взятого на аналіз, мл; P – розведення досліджуваного розчину; TE – оптична густина розчину тирозину, який містить 1 мкМ тирозину в 1 мл. [31]



рис.5.1

Спектрофотометр UNICO SpectroQuest 2800

(<https://ua.all.biz/spektrofotometr-unico-spectroquest-2800-g1995687>)

7.1.2 Визначення концентрації джерела вуглецю та азоту.

Вуглець. Джерелом вуглецю в середовищі для вирощування *Bacillus cereus* являється меляса так як меляса приблизно на 50% складається з сахарози то визначати будемо саме її. Для визначення кількості сахарози будемо використовувати метод визначення з антроновим реактивом.

Метод заснований на розщепленні складних вуглеводів до моносахаридів в сильноокислому середовищі з подальшою їх дегідратацією і освітленням гідроксиметилфурфуролом, що утворює при реакції з антроном комплексне з'єднання синювато-зеленого кольору. Інтенсивність утворення забарвлення прямо пропорційна вмісту цукрів в реакційній середовищі.

Пропорційна залежність інтенсивності забарвлення від вмісту цукрів у випробуваному розчині дотримується в області концентрацій моносахаридів 0,02 - 0,10 мг / мл.

Методика. У пробірку поміщають 3,0 мл розчину випробуваного препарату, охолоджують в водяній бані з льодом до 0 ° С, обережно при охолодженні доливають 6,0 мл 0, 2% антронового реактиву, перемішують і негайно нагрівають на киплячій водяній бані протягом 5 хвилин, охолоджують і вимірюють оптичну щільність досліджуваного і стандартного розчинів на спектрофотометрі в максимумі поглинання при довжині хвилі 625 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм відносно розчину порівняння.

Приготування розчину порівняння. В охолоджену на бані з льодом пробірку з 3,0 мл води доливають 6,0 мл 0,2% антронового реактиву. Далі проводять аналіз аналогічно розчину випробуваного препарату. [51]

Азот. Джерелом азоту в середовищі для вирощування *Bacillus cereus* являється пептон. Для визначення кількості пептону ми будимо використовувати метод формольного титрування (метод Серенсен).

Принцип методу: аміногрупи амінокислот блокуються формальдегідом, а вільні карбоксильні групи титрують лугом

За кількістю витраченої лугу обчислюють кількість амінного азоту, беручи до уваги, що 1 см³ 0,2 н. розчину NaOH відповідає 2,8 мг азоту.[53,54]

Карта постадійного контролю біосинтезу протеази

5.5. Карта постадійного контролю

Таблиця 5.1

Карта постадійного контролю біосинтезу протеази

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх, Кт 1.1.1 <i>Миття обладнання</i>	Обладнання, температура і концентрація розчину устичної соди, час, чистота	Термометр технічний, годинник, кондуктометр	Під час проведення операції обробки	$t_{\text{розчину}} = 70^{\circ}\text{C}$; $\tau = 1-2$ год
Кх, Кт 1.1.3 <i>Дезінфекція та ополіскування обладнання і комунікацій</i>	Обладнання та комунікації, концентрація і температура	Термометр технічний, годинник, кондуктометр	Під час проведення операції обробки	$\tau = 5$ хв, $t = 20^{\circ}\text{C}$

	розчинуперекисуводню , час			
Кт 1.1.4 <i>Перевірка на герметичністьобладнання</i>	Герметичністьобладнання, час, тиск	Манометр технічний, годинник	Тисквизначаєтьсябезперервнопід час перевірки на герметичність	$\tau = 0,5-1$ год; $P = 0,15-0,2$ МПа
Кт 1.1.5 <i>Стерилізаціяобладнання</i>	Обладнання, тиск і час стерилізації	Технічний манометр і годинник	Тисквизначаєтьсябезперервнопід час стерилізації	$\tau = 1$ год; $P = 0,2$ МПа
Кт2.1 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часток</i>	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 80 \%$; $P =$ на початку 48 Па, а в кінці 250 Па
Кт2.2 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Технічний манометр і термометр	Після стиснення повітря	$P = 0,35$ МПа; $t = 120-200^{\circ}\text{C}$
Кт2.3 <i>Охолодження повітря</i>	Охолоджене повітря, температура, повітря	Термометр технічний, психрометричний	Після охолодження повітря, після	$t = 25-30^{\circ}\text{C}$; $W = 60 \%$

<i>та видалення вологи</i>	після видалення зайвої вологи	метод	видалення зайвої вологи	
Кт2.4 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагрівання повітря	$t = 50^{\circ}\text{C}$; $W = 50 \%$
Кт2.5	Очищене повітря, ступінь	Манометр, перевірка	Після очистки повітря у	$E = 95 \%$; $P =$ на початку 152
<i>Очищення повітря в головному фільтрі</i>	очищення, перепад тисків	ступеня очищення згідно паспорту фільтра	фільтрі тонкого очищення	Па, а в кінці 450 Па
Кт2.6 <i>Очищення повітря в індивідуальних фільтрах</i>	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	$E = 99,995 \%$, $P =$ на початку 140 Па, а в кінці 600 Па
Кх3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 <i>Приготування 6 %-го розчину HCl для приготування солей</i>	Розчин HCl, концентрація кислоти	Кондуктометр	У процесі приготування розчину	$C = 6 \%$

для інокулятора об'ємом 100 л та ферментерів об'ємом 1 м ³ та 6,3 м ³				
Км, Кх, Кт3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 Приготування 6 %-го розчину NaOH для інокуляторів об'ємом 10, 100, 1 м ³ і ферментера об'ємом 8 м ³	Розчин NaOH, концентрація лугу, тиск і час стерилізації, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, кондуктометр	Концентрацію лугу визначають перед стерилізацією, тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	P = 0,075 МПа, τ = 15 хв, С = 6 %, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для інокулятора та	Силіконовий піногасник, час, температура, відсутність мікробіоти	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Під час стерилізації безперервно визначається температура, після стерилізації визначається	t = 160 °С, τ = 2 год, відсутність мікробіоти

<i>ферментерів</i>			відсутність мікробіоти	
Кт, Км 5.1 <i>Приготування і стерилізація запасного розчину мікроелементів для колб на качалках та інокуляторів об'ємом 10 л 100 л</i>	Розчин солі температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти, $\text{pH}_{\text{передстр.}} = 4,5 \dots 5$
Кт, Км 5.2.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках</i> <i>Приготування і стерилізація</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти

композиції А				
Кт, Км 5.3.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л.</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	Р Р = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного	Р Р = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

<i>інокуляторі об'ємом 100 л.</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>			контролю після стерилізації	
КТ, Км 5.5.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³.</i> <i>Приготування і стерилізація</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації, стерильність	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	Р = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

<i>композиції А</i>				
КТ, Км 5.5.2 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³.</i> <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б, температура, тиск і час стерилізації, стерильність, рН	Технічний манометр і термометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації, рН визначається перед стерилізацією і після	$P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти, $\text{pH}_{\text{передстр.}} = 4,5 \dots 5$
КТ, Км 5.6.1 <i>Приготування та стерилізація</i>	Композиція А, температура, тиск і час стерилізації,	Технічний манометр і термометр, годинник, мікробіологічний	Температура і тиск визначається безперервно під час	$P = 0,05 \text{ МПа}$, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, відсутність

<i>поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 8 м³.</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	стерильність	контроль	стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації	мікробіоти
КТ, Км 5.6.2 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6.3 м³.</i>	Композиція Б, температура, тиск і час стерилізації, стерильність, рН	Технічний манометр і термометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск визначається безперервно під час стерилізації, відбір проби для мікробіологічного контролю після стерилізації, рН визначається перед	Р = 0,15 МПа, t = 131⁰С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти, рН_{передстр.} = 4,5...5

Приготування і стерилізація композиції Б			стерилізацією і після	
Кт, Км 6.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Bacillus cereus</i> GVK 21 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та пересіви культури проводять через 2-3 місяці	$t = 2-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 2-3$ місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2 Одержання робочої культури на агаризованому	Колекційна культура <i>Bacillus cereus</i> GVK 21 Морфологічна однорідність,	Термометр, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять через кожні 8 год	$t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 2$ доби, відсутність сторонньої мікробіоти

середовищі	відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій			
Кт, Км 6.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі	Колекційна культура <i>Bacillus cereus</i> GVK 21 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять через кожні 8 год	$t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 2$ доби, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів качалки, відсутність сторонньої	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний	Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота	$t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $w = 150$ об/хв, відсутність сторонньої

	мікробіоти	контроль	обертів та температура, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки, морфологія, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп	Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів, температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	$t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48\text{ год}$, $w = 150\text{ об/хв}$, $\text{pH} = 9,0$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 100 л	Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки, морфологія,	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення	Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота	$t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48\text{ год}$, $w = 150\text{ об/хв}$,

	відсутність сторонньої мікробіоти	мікроскоп	обертів, температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	pH = 9,0 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.7 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1 м ³	Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки, морфологія, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп	Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів, температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	t = 40 °С, τ= 48 год, w = 150 об/хв, pH = 9,0 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.8 Вирощування культури	Посівний матеріал, Температура, час	Термометр технічний, годинник, технічний	Протягом всього часу вирощування	t = 40 °С,

в інокуляторі об'ємом 8 м ³	вирощування, частота обертів мішалки, морфологія, відсутність сторонньої мікробіоти	тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп	контролюється та автоматично підтримується частота обертів, температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	τ= 48 год, w = 150 об/хв, рН = 9,0 відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 7.1 Виробниче культивування	Культуральна рідина, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки, морфологія, відсутність сторонньої мікробіоти, активність ферменту, концентрація ферменту	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп	Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів температура, рівень піни та рН, через кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	t = 40 °С, τ= 48 год, w = 150 об/хв, рН = 9,0, відсутність сторонньої мікробіоти А = 912 Од/мл

ЛІТЕРАТУРА

1. Yilmaz R. Modern biotechnology breakthroughs to food and agricultural research in developing countries. *GM Crops Food*. 2019;10(1):12-16. doi: 10.1080/21645698.2019.1600969. Epub 2019 May 6. PMID: 31055997; PMCID: PMC6592639.
2. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broad view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int*. 2013;2013:329121. doi: 10.1155/2013/329121. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24106701; PMCID: PMC3784079.
3. Neurath H, Walsh KA. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Nov;73(11):3825-32. doi: 10.1073/pnas.73.11.3825. PMID: 1069267; PMCID: PMC431226.
4. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Sep;5(9):785-99. doi: 10.1038/nrd2092. PMID: 16955069
5. Великорецкая Ирина Александровна. Создание новых комплексных ферментных препаратов грибных протеаз на основе штамма *Penicillium Canescens* для эффективной конверсии белоксодержащего растительного сырья. Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук. Москва. 2019
6. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*. 2008 Nov 7;283(45):30433-7. doi: 10.1074/jbc.R800035200. Epub 2008 Jul 23. PMID: 18650443; PMCID: PMC2576539.

7. О.В. Мацелюх, А.С. Левішко, Л.Д. Варбанець. Протеалітичні ферменти мікроорганізмів. Огляди літератури. ISSN 0201-8462. Мікробіол. журн., 2010, Т. 72, № 4
8. А.Х. Сафарова. Условия биосинтеза кислых протеаз у *Aspergillus Flavus* *Advances in Biology & Earth Sciences* Vol.5, No.2, 2020, pp.160-166.
9. Mótyán JA, Tóth F, Tózsér J. Research application of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*. 2013 Nov 8;3(4):923-42. doi: 10.3390/biom3040923. PMID: 24970197; PMCID: PMC4030975.
10. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review December 2011, Page undefined M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero, M.P. Montero. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
11. Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits open access *Journal of Functional Foods*, Volume 5, Issue 1, 2013, pp. 62-70 Mina Memarpoor-Yazdi, Hanie Mahaki, Hadi Zare-Zardini
12. Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A and Ashraf M (2019) Microbial Proteases Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110
13. P. Palanivel, L. Ashokkumar and R. Balagurunathan. Production, purification and fibrinolytic characterization of alkaline protease from extremophilic soil fungi. *Int J Pharm Bio Sci* 2013 Apr; 4(2): (B) 101 – 110.
14. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tide.com/en-us>
15. Romsomsa, Nisa & Chim-Anagae, Patoomporn & Jangchud, Anuvat. (2010). Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Sci Asia*. 36. 10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.118.

16. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Sep;62(3):597-635. PMID: 9729602; PMCID: PMC98927.

17. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs.* 2015 Mar 2;13(3):1133-74. doi: 10.3390/md13031133. PMID: 25738328; PMCID: PMC4377977.

18. Давиденко О.О. Перспективи розвитку інноваційних біотехнологій. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://dspace.mnau.edu.ua>

19. Васильченко А.С.1, Яруллина Д.Р.2, Никиян А.Н.1, Тесля А.В. Морфофункциональные характеристики бактерий *Bacillus Cereus* на разных этапах жизненного цикла : Автореф. дис. канд. биол. наук. Оренбург, 2012 год. 5 ст

20. Мамедова Л.В., Лебедев Л.Р., Влияние условий культивирования *Bacillus subtilis* на продукцию протеолитических ферментов Автореф. Бердск 2016 г.

21. Rathnasamy SK, Durai A, Vigneshkumar AA, Purushothaman C, Rajendran DS, Chandramouliswaran K. One-pot simultaneous production and sustainable purification of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* using natural deep eutectic solvents. *Sci Rep.* 2020 Aug 7;10(1):13356. doi: 10.1038/s41598-020-70414-2. PMID: 32770127; PMCID: PMC7414877.

22. Vijayaraghavan P, Lazarus S, Vincent SG. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. *Saudi J Biol Sci.* 2014 Jan;21(1):27-34. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.04.010. Epub 2013 May 6. PMID: 24596497; PMCID: PMC3937459.

23. Патент Российской Федерации на изобретение №0002575799 Применения штамма бактерий *Bacillus Cereus* гиск № 279 в качестве продуцента ингибитора цитокина ФНО- α/ Бухарин Олег Валерьевич, Перунова Наталья Борисовна, Чайникова Ирина Николаевна, Иванова Елена Валерьевна,

Челпаченко Ольга Ефимовна, Андрищенко Сергей Валерьевич, Бондаренко Таисия Александровна. Опублик. 20.02.2016

24. Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В.
25. Sarika Kedar Marathe Manisha Arun Vashistht Aishwarya Prashanth Nikha t Parveen Shailayee Chakraborty Sindhu S. Nair Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from seawater samples .
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.001>
26. Jordan Chapman, Ahmed E. Ismail and Cerasela Zoica Dinu, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. Catalysts 2018, 8, 238; doi:10.3390/catal8060238
27. Sarika Kedar Marathe Manisha Arun Vashistht Aishwarya Prashanth Nikha t Parveen Shailayee Chakraborty Sindhu S. Nair, Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from seawater samples,
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.001>
28. Къеффи Андре, Брукер Алан Томас, Уилкинсон Крейг Адам, Фуллер Линси Сара, Гулд Пол Ентони, Композиция моющего средства 2019107223, 03.10.2017
29. Карлаш Ю.В. Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019.-252с.
30. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник.-К.: НУХТ, 2009.-336 с.
31. Базальтовое волокно и его применение. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.alexir.ru/blog/bazaltovoe-volokno-i-ego-primenenie/>

32. [Электронный ресурс] Режим доступа: https://airgroup.com.ua/p1193561538-vintovoj-kompressor-m3min.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQiAtJeNBhCVARIsANJUJ2EaTZUaEGjNyyFwXc8KsSsRqrUrT-IFyXM7UpzD5MONAujkNYRxHA0aAtb_EALw_wcB
33. Винтовой компрессор 10 м³/мин 7 бар [Электронный ресурс] Режим доступа: https://berhord-ua.all.biz/plastinchatyj-teploobmennik-g17889955?utm_currency=UAH&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=shopping_ua_personal&utm_content=66068
34. Ресивер вертикальный 3800 Л, ЛДЕР [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://xkz.com.ua/p1075044648-resiver-vertikalnij-3800.html>
35. Теплообменник пластинчатый ГФТА ТПСР-19 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://heatart.com.ua/razbornye-teploobmenniki/509/>
36. Фильтрующие элементы ЭПМ.Ф [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://technofilter.kiev.ua/services/produksiya/patronnye-filtruyushchie-elementy/--filtruyushchie-elementy-epm.f>
37. Реактор - смеситель РС 100 [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.kft2.com.ua/rea100.html>
38. ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕАКТОР 15 Л [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://reahimpribor.ru/catalog/reaktory-dlya-himicheskogo-sinteza/duplicate-of-reaktor-himicheskij-na-10-l.-s-zashhitnoj-obolochkoj-model-jgr-10l.html>
39. Геосорб-М [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.mtk-sorbent.ru/filtruyushchij-material-fpp-15-1-5-tkan-petryanova/filtry-aerozolnye-promyshlennye/aerozolnye-filtry-tipa-fv-005-fv-01-i-fv-04-detail>
40. Лабораторный ферментер Pro-Lab 3-12 л с двумя культуральными сосудами [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-proizvodstva-sredstv-zashchity-rabochim-obemom-100-l/>

41. Установки приготовления эмульсий и суспензий серии УПЭС для производственных цехов [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.prombiofit.com/Equipment/upes.html?gclid=Cj0KCQiA47GNBhDrARIsAKfZ2rAFcF9hHswCINjiKkFQAm5tmPZmGIV3Bi3RyuSUFa0YYv0S0u3LgRoaAhvREALw_wcB

42. Pilotclave — опытно-промышленный и промышленный реактор высокого давления [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.buchiglas.ru/ru/produkcija/reaktory-rabotajushchie-pod-davleniem-avtoklavy-s-peremeshivaniem/laboratornyi-pilotnyi-masshtab-025-500-litrov/pilotclave.html>

43. Размер емкостей [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://komandor2000.ua/c173-razmer_emkostey/

44. Промысловый перистальтический насос WG600S [Электронный ресурс] Режим доступа: https://prom.ua/ua/p1352490261-promyshlennyj-peristalticheskij-nasos.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpa_50_B2B&gclid=Cj0KCQiA15yNBhDTARIsAGnwe0UNsr3UUc0dd9odXRN8BxBNUOc_zbUhb4YPJVbyca7c3tWMnQzPfwIaArKYEALw_wcB

45. Весовой дискретный дозатор-расходомер для сыпучих (бункерные весы) [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://technowagy.com.ua/ru/products/vesovoj-diskretnyj-dozator-rashodomer-dlya-sypuchih-3/>

46. Ферментеры и биореакторы [Электронный ресурс] Режим доступа: https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/?gclid=Cj0KCQiA15yNBhDTARIsAGnwe0URQ38FpR-yLDBGlZYrC7tbVUaPXUQno3nQKU4kD-Hx76oszYo9NQaAvC6EALw_wcB

47. ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕАКТОР 15 Л [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l>

48. Customized process-scale bioreactors / fermentors - I Series [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.lpp-group.com/products/reactors/bioreactors-fermentors/pilot-plant/customized-process>
49. Перцев І.М. Силікони [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/525/silikoni>
50. ОФС.1.2.3.0019.15 Определение сахаров спектрофотометрическим методом [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0019-15-opredelenie-saharov-spektrofotometrisheskim-metodom/>
51. Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. – Ульяновск: НИИЦМиБУЛГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98 с.: Ил. 49. ISBN: 978-5-905970-10-8
52. Епишкина Ю.М., Баурина А.В., Баурин Д.В., Шакир И.В., Панфилов В.И. Использование гидролизатов белка подсолнечника в качестве источника органического азота в питательных средах. - УДК 602.3:579.8
53. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 106 с.
54. Межгосударственный стандарт. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200023426>