

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) _____ <u>Наталія ГРЕГІРЧАК</u> (підпис) (ім'я та прізвище) «__» ____ червня ____ 2024р.	«До захисту допущено» Завідувач кафедри _____ <u>Віктор СТАБНІКОВ</u> (підпис) (ім'я та прізвище) «__» ____ червня ____ 2024 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: «Одержання протеази культивуванням *Bacillus licheniformis*» _____

Виконала: здобувачка_4_ курсу, групи_2_

_____ <u>МЕЗІНОВА Ірина Рінатівна</u> (прізвище, ім'я, по батькові повністю)	_____ (підпис)
---	-------------------

Керівник _____ <u>КАРЛАШ Юрій Васильович</u> (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 _____ <u>Вікторія СТОЙКО</u> (ім'я та прізвище)	_____ (підпис)
--	-------------------

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю _____

Кафедра _біотехнології і мікробіології_____

Освітній ступінь бакалавр _____

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія» _____

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

__біотехнології і мікробіології__

____Віктор СТАБНИКОВ__

«1» __березня__ 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

_____МЕЗІНОВОЇ Ірини Рінатівни_____

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи __«Одержання протеази культивуванням *Bacillus licheniformis*»_
керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, доцент, к.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «29» 03 2024 року №238-кв

2. Строк подання здобувачем роботи ____ 28 травня 2024 року _____

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Bacillus licheniformis*; цільовий продукт: протеаза; геометричний об'єм ферментера: 1,25 м³; коефіцієнт заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу протеази - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу протеази - 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 1.03.2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>01.03.24-04.03.24</i>	Виконано
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>04.03.24-08.03.24</i>	Виконано
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>8.03.24-10.03.24</i>	Виконано
4.	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	<i>10.03.24-12.03.24</i>	Виконано
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>12.03.24-15.03.24</i>	Виконано
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>15.03.24-17.03.24</i>	Виконано
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>17.03.24-20.03.24</i>	Виконано
8.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>20.03.24-25.03.24</i>	Виконано
	<i>Охорона довкілля</i>	<i>25.03.24-25.05.24</i>	Виконано
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>25.05.24-28.05.24</i>	Виконано
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>25.05.24-28.05.24</i>	Виконано

Здобувач

_____ (підпис)

___Ірина МЕЗІНОВА___ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

___Юрій КАРЛАШ___ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена процесам виготовлення ферменту протеази – цільового продукту *Bacillus licheniformis*.

Цей фермент використовують в миючих засобах, в харчовій промисловості, в модернізації шкіри і тканин, як каталізатори в органічному синтезі тощо. У даному проєкті пропонується до використання, як компонент миючого засобу для дитячого одягу.

Згідно розрахунків, для забезпечення лужною протеазою як компонента засобу для прання дитячої одяжі необхідно 246 кг/рік.

Технологія виробництва протеази включає допоміжні роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування 1 н розчину H_2SO_4 для підкислення меляси та приготування розчину меляси, підготовка та стерилізація піногасника, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 15, 160 л та 1,00 м³) та біосинтез у ферментері об'ємом 1,25 м³. Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методики мікробіологічного контролю стерильності поживного середовища, посівного матеріалу, визначено показники росту і синтезу цільового продукту.

Кваліфікаційна робота викладена на 76 сторінках, містить 14 таблиць, 6 рисунків, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (50 найменувань), технологічної (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: протеаза, *Bacillus licheniformis* LBA 46, миючі засоби, біосинтез.

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ							
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.	Мезінова І.Р.				РЕФЕРАТ				Літ.	Арк.	Аркуші	
Керівник	Карлаш. Ю.В.										4	76
Реценз.									Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В.П.											
					4							

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the production processes of the protease enzyme – a product of *Bacillus licheniformis*.

This enzyme is used in detergents, in the food industry, in the modernization of skin and fabrics, as catalysts in organic synthesis, etc. In this project, it is proposed to be used as a component of a detergent for children's clothes.

According to calculations, 246 kg/year is needed to provide alkaline protease as a component of detergent for children's clothes.

Protease production technology includes auxiliary works (preparation of sterile aeration air, preparation of H₂SO₄ solution for acidification of molasses and preparation of molasses solution, preparation and sterilization of defoamer, preparation and sterilization of nutrient media) and technological process (four stages of seed cultivation: in flasks on rockers, in inoculators with a volume of 15, 160 l and 1.00 m³) and biosynthesis in a fermenter with a volume of 1.25 m³. A map of the step-by-step control of pre-fermentation processes and production biosynthesis was developed, and the methods of microbiological control of the sterility of the nutrient medium, seed material were specified, and the indicators of growth and synthesis of the target product were determined.

The diploma project is laid out on 76 pages, contains 14 tables, 6 figures, consists of an introduction, nine chapters, a list of used literature (50 titles), technological (A1 format, 1 sheet) and hardware (A1 format, 1 sheet) schemes.

Key words: protease, *Bacillus licheniformis*, detergents, biosynthesis.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	11
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	15
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	16
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	17
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	18
3.1. Потреба у цільовому продукті	18
3.2. Розрахунок потужності виробництва	18
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	19
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	21
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	27
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	27
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	29
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	30
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	30
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	31
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	32

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	35
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	37
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	40
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	51
8.2. Мікробіологічний контроль	51
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	51
8.3.1. Концентрація біомаси та відновлюючого цукру	51
8.3.2. Концентрація цільового продукту	52
8.4. Показники якості готового продукту	52
8.1. Карта постадійного контролю	54
РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля	68
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	68
9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	69
9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	69
9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	70
9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів	70
9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів	71

ВСТУП

Протеази (пептидази) - ферменти, які гідролізують пептидні зв'язки в білках. Екзопептидази розщеплюють кінцевий амінокислотний залишок в кінці поліпептиду; Ендопептидази розщеплюють внутрішні пептидні зв'язки[1].

Протеази всюди поширені в біосистемах, де вони відіграють різноманітну роль у біохімічних, фізіологічних та регуляторних аспектах клітин і організмів. Протеази представляють найбільший сегмент промислового ферментного ринку, де вони використовуються в миючих засобах, в харчовій промисловості, в модернізації шкіри і тканин, як каталізатори в органічному синтезі і як терапевтичні засоби тощо[2].

Актуальність роботи. Одною із галузей, у якій активно використовують ферменти, у тому числі протеази, є вироблення миючих засобів. Ферменти покращують відмивання забруднень різного походження від жирових до білкових. Саме із білковими забрудненнями допомагає боротись протеаза, тим самим роблячи миючі засоби більш ефективними та економічними[3,4]. Саме тому розробка біотехнології одержання ферменту є актуальною задачею.

Метою роботи є біотехнології отримання фермента протеази – цільового продукту штамом *Bacillus licheniformis*.

Новизною даної роботи є використання як біологічного агента бактеріального штаму *Bacillus licheniformis* LBA 46 з метою отримання ферменту протеаза, який пропонується додавати до миючих засобів, для більш ефективного очищення.

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розроб.		Мезінова І.Р.					
Керівник		Карлаш. Ю.В.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Лім.	Арк.	Аркушів
						8	79
					Кафедра БТМ		
					8		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Протеази (протеолітичні ферменти) являють собою клас ферментів, які відіграють важливу роль у фізіологічних процесах, що зумовлено їх високою активністю до різних білкових субстратів. Протеази залучені до таких біологічних процесів, як зсідання крові, контроль смерті клітини, диференціація тканин. Вони каталізують ряд процесів при пухлинних захворюваннях та під час інфекцій, які викликані мікроорганізмами і вірусами. Протеази беруть участь у катаболізмі білків, у синтезі гормонів і фармакологічно активних пептидів із попередників білків.

Вони проводять високоспецифічну і селективну модифікацію білків, наприклад, активацію ферментів шляхом обмеженого протеолізу і участь у транспорті секреторних білків через мембрани.

Існують такі типи протеаз: Серинові протеази, цистеїнові протеази, аспарагінові протеази, металопротеази.

Специфічність протеаз, зокрема, регулюється типом амінокислотного залишку в їх каталітичному сайті.

По сайту розщеплення ділять на дві групи: ендопептидази та екзопептидази[5].

Ендопептидази розщеплюють пептидні зв'язки всередині та на відстані від кінців поліпептидного ланцюга.

Екзопептидази каталізують гідроліз пептидних зв'язків поблизу N- або C-кінцевих кінців субстрату[6].

Молекулярна маса протеази ГЗх з *Bacillus licheniformis* LBA 46 становить 40 кДа. Молекулярна формула - $C_{11}H_9N_3O_2Na$. Очищена протеаза показала

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ			
Розроб.		Мезінова І.Р.						
Керівник.		Карлаш Ю.В.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
					Літ.	Арк.	Аркушів	
							9	79
					Кафедра БТМ			
					9			

оптимальну активність при 50 і 60 °C та оптимальну активність при рН 8,5. Протеаза вироблялась в експоненціальній фазі росту, досягаючи максимальної активності (~3000 ОД/мл) після 48 годин ферментації, у культуральному середовищі з побічних продуктів агропромислового виробництва[7].

Фізичні властивості: порошок кремового кольору, розчинний у воді[8].

Активність сухого ферменту - 50 000 Од/г.

Використовують цей фермент в косметології, офтальмології, для лікування шлункових захворювань, в складі миючих засобів.

Найчастіше у миючих засобах знаходить своє широке застосування саме лужна протеаза.

Ензими використовуються для підвищення ефективності очищення миючих засобів вже понад 50 років і зараз є загальноприйнятими інгредієнтами порошкових і рідких побутових миючих засобів, засобів для виведення плям і преспоттерів для прання, автоматичних засобів для миття посуду, а також промислових і інституційних засобів для чищення.

Перше мило, до складу якого входили ферменти, було виготовлено в 1913 році Отто Ремом, який помітив, що екстракт підшлункової залози здатний розкласти білки і може бути використаний для оптимізації процесу прання білизни. Однак лише в 1960 році ферменти стали доступними і їх можна було регулярно додавати в миючі засоби.

Ензими в даний час є невід'ємним компонентом миючих засобів, і їх використання забезпечує споживачам добре доведені переваги, як в самому процесі прання, так і з точки зору навколишнього середовища в цілому. Ці переваги включають можливість роботи при низьких температурах, економію води та енергії, а також усунення потреби в більш агресивних хімічних речовинах, які, як було доведено, негативно впливають на навколишнє середовище. Крім того, ферменти біологічно розкладаються і не залишають

шкідливих слідів. В даний час найбільш поширеними ферментами, що містяться в миючих засобах, є протеази.

Протеази є найбільш поширеними детергентними ферментами і містяться у всіх основних марках європейських, американських і японських миючих засобів, незважаючи на значні відмінності в режимах очищення в цих країнах[3,4].

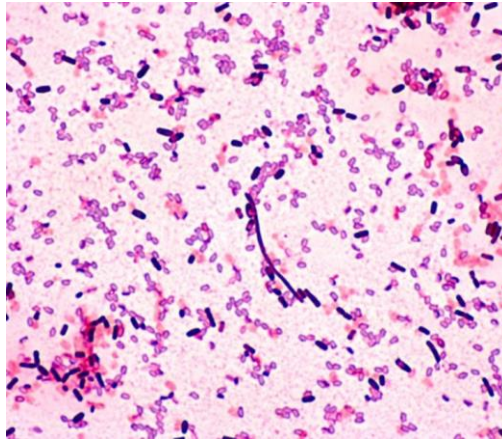


Рис.1. Мікроскопія *Bacillus licheniformis*[50]

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Протеолітичні ферменти відіграють ключову роль в процесах регуляції та обміну речовин на різних рівнях існування організмів.

Традиційно промисловістю використовуються протеази, ізольовані з представників родів *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*), а також штамів грибів *Mucor*, *Aspergillus*, *Endothea*.

Галофільні бактерії, які були охарактеризовані як перспективні продуценти позаклітинних протеаз, переважають інших завдяки високій стійкості до осадження та денатурації внаслідок підвищеної іонної сили середовища[5].

При виборі біологічного агента для характеристики продуцентів, було обрано такі штами:

Bacillus subtilis G15/10 [9] – продукує протеазу, виділеного з гарячого джерела в Аль-Лейті область, Саудівська Аравія. Інокують у середовище для росту, що містить (г/л): глюкозу - 10,0; дріжджовий екстракт - 10,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,0; KH_2PO_4 - 5,0; і $Fe_4SO \cdot 7H_2O$ - 1,0. Оптимальна температура культивування 50°C і рН 7,0 протягом 48 год. Активність ферменту - 83,9 Од/мл.

Bacillus licheniformis LBA 46 [7] – продуцент лужної протеази, має здатність виділяти позаклітинні білки. Мікроорганізм вирощували, на середовищі, яке містить: 32 г/л патоки цукрової тростини; 6 г/л кукурудзяного екстракту; 2 г/л дріжджового екстракту і 20 г/л сухої сироватки, доведеного до рН 7 та інкубували при 30 °C протягом 72 год. Активність ферменту – 3 000 Од/мл.

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Мезінова І.Р.			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА			Літ.	Арк.	Аркуші	
Керівник		Карлаш Ю.В.								12	76
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									
					12						

Bacillus subtilis SHS-04 [10] - бактерія, виділена з ґрунту бійні. Оптимальна температура культивування при 37°C, 24 години, pH 8,0. Середовище містило (г/л): пептону - 7,5; глюкози – 5; NaCl - 0,5 і MgSO₄*7H₂O - 0,1. Активність ферменту - 450 Од/мл. (табл. 2.1.)

Таблиця 2.1

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Активність ферменту, Од/мл	Джерело
<i>Bacillus subtilis</i> G15/10	Глюкоза - 10,0; дріжджовий екстракт - 10,0; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 1,0; KH ₂ PO ₄ - 5,0; Fe ₄ SO·7H ₂ O - 1,0.	48 год pH 7,0 50°C	83,9	[9] American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 16 (7): 1227-1236, 2016 ISSN 1818-6769 © IDOSI Publications, 2016
<i>Bacillus licheniformis</i> LBA 46	патока цукрової тростини (меляса) – 32; кукурудзяний екстракт – 6; дріжджовий екстракт - 2; суха молочна сироватка – 20.	72 год pH 7,0 30°C	3 000	[7] Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 36, No. 02, pp. 615 - 625, April - June, 2019
<i>Bacillus subtilis</i> SHS-04	пептон - 7,5; глюкоза - 5; NaCl - 0,5; MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,1.	24 год pH 8,0 37°C	450	[10] Department of Biochemistry, School of Sciences, Federal University of Technology, Akure, Nigeria. Vol.1, No.4, 112-120 (2013)

Bacillus subtilis G15/10. За 48 години культивування результат є такий: 83,9 од/мл, що являється найнижчим результатом активності порівняно з іншими

штамами - *Bacillus licheniformis* LBA 46 – активність – 3 000 од/мл, період його культивування 72 години, а також *Bacillus subtilis* SHS-04 – 450 од/мл за 24 години.

Отже, майже за однакових умов культивування активність у штамів різна.

Поки не можливо повноцінно порівняти біологічні агенти для синтезу обраного ферменту. Тому далі розраховуємо вартість поживних середовищ для культивування обраних мікроорганізмів (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Визначення вартості поживних середовищ для синтезу протеази

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації*
<i>Bacillus subtilis</i> G15/10	Глюкоза - 10,0;	45,60	0,456	1
	Дріжджовий екстракт - 10,0;	1 800	18	2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - 1,0;	22,80	0,0228	3
	KH ₂ PO ₄ - 5,0;	261	1,305	4
	FeSO ₄ ·7H ₂ O - 1,0.	55,20	0,0552	5
	Вартість 1 л середовища ≈ 19,83			
<i>Bacillus licheniformis</i> LBA 46	Патока цукрової тростини (меляса) - 32;	191,88	6,14	6
	Кукурудзяний екстракт – 6;	150	0,9	7
	Дріжджовий екстракт - 2;	1800	3,6	2
	Суха молочна сироватка – 20;	115	2,3	8
	Вартість 1 л середовища ≈ 12,94			
<i>Bacillus subtilis</i> SHS-04	Пептон - 7,5;	1320	9,9	9
	Глюкоза - 5;	45,60	0,228	1
	NaCl - 0,5;	200	0,1	10
	MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,1.	22,80	0,00228	3
	Вартість 1 л середовища ≈ 10,23			

Примітка (ціни наведено станом на липень 2023 року): 1. [Глюкоза купити оптом в Україні, ціна декстрози | Система Оптимум \(systopt.com.ua\)](#); 2. [Екстракт дріжджів оптом и в розницу в](#)

[Днепропетровске с доставкой по Украине \(kreon-d.com.ua\)](http://kreon-d.com.ua) 3. [Сульфат магнію MgS 7-водний купити оптом в Україні, ціна | Система Оптимум \(systopt.com.ua\)](http://systopt.com.ua); 4. [Калий фосфорнокислый 2- замещенный в интернет-магазина профессионального оборудования и принадлежностей \(labormarket.com.ua\)](http://labormarket.com.ua); 5. [залізо \(II\) сірчаноокисле ч \(hlr.ua\)](http://hlr.ua); 6. [Патока тростниковая, меласса, 1 кг: продажа, цена в Киеве. Подсластители, сахарозаменители от "EdoChoc, Поделись Любовью!" - 1857177472 \(edochoс.com.ua\)](http://edochoс.com.ua); 7. [Купити CSL кукурудзяний екстракт, 1 л., ціна 150 ₴ - Prom.ua \(ID# 1467862582\)](http://prom.ua); 8. [Сироватка молочна суха 1 кг/5 кг/25 кг | Центр Пекарів АРІАНТА \(arianta.com.ua\)](http://arianta.com.ua); [Сироватка молочна суха Фасування 1кг \(foodmarket.com.ua\)](http://foodmarket.com.ua) 9. [Пептон ферментативний. Купити пептон ферментативний ціна, доставка, опт Львів, Чернівці, Київ, Харків, Дніпро | Система Оптимум \(systopt.com.ua\)](http://systopt.com.ua); 10. [Натрій хлористий Klebrig 1кг фарм IMCoPharma Австрія: продаж, ціна у Рівному. Органічні солі від "ТМ Клебріг - Гіпермаркет хімреактивів" - 1179928906.](http://tm-klebrig.com.ua)

За одержаними розрахунками найдешевше середовище для культивування належить *Bacillus subtilis* SHS-04. Ціна на 1 л становить 10,23 грн. Друге за вартістю середовище використовує *Bacillus licheniformis* LBA 46, різниця між попереднім продуцентом становить 2,71 грн. Найдорожче середовище використовує *Bacillus subtilis* G15/10, а його вартість складає 19,83 грн.

Ці дані можна використати для прорахунку умовної вартості ферменту, що дасть можливість повноцінно порівняти та обрати кінцевого продуцента. Також, ще одним важливим показником синтезу є кількість утвореного ферменту за годину, оскільки саме цей параметр показує швидкість синтезу цільового продукту.

Відповідні розрахунки продемонстровано в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Визначення умовної вартості та швидкості синтезу протеази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Ферментативна активність, Од/мл	Умовна вартість Од Ак ензиму, грн/10 ² Од	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного РГ за годину, г/год
<i>Bacillus subtilis</i> G15/10	19,83	83,9	23,6	48	1,747
<i>Bacillus licheniformis</i> LBA 46	12,94	3 000	0,43	72	41,66
<i>Bacillus subtilis</i> SHS-04	10,23	450	2,27	24	18,75

Отже, переважає *Bacillus licheniformis* LBA 46, так як активність утвореного ензиму в 1 мл середовища – найвища і умовна вартість 100 одиниць активності ензиму є найнижчою.

Даний штам характеризується найбільшою ферментативною активністю.

А найгіршим продуцентом для одержання ензиму виявився *Bacillus subtilis* G15/10. У даного штаму більше недоліків, чим переваг – кількість одержаного продукту та ферментативна активність є найнижчими, умовна вартість одиниці активності ензиму є також найвищою.

Перевагою *Bacillus subtilis* SHS-04 є низька вартість 1 л середовища. Умовна вартість одиниці активності ензиму не є найнижчою.

Тож, за кінцевим порівнянням обираємо штам *Bacillus licheniformis* LBA 46.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок поживного середовища для вирощування *Bacillus licheniformis* LBA 46 – продуцента протеази.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецю живлення

Потреби для синтезу протеази. Як джерело вуглецю використовується патока цукрової тростини (меляса).

Кількість вуглецю, що міститься в 5г протеази: 27 300 кДа[11] (молекулярна маса протеази), ($C_{11}H_9N_3O_2Na$). У 27 300 г протеази міститься 132 г Карбону ($11 \cdot 12$). А в 5г протеази – $(132 \cdot 5) / 27\,300 = 0,024$ г Карбону.

Вміст Карбону у мелясі – 40 %, значить у 100 г меляси міститься 40 г Карбону, а 0,024 г міститься у: $(0,024 \cdot 100) / 40 = 0,06$ г.

Оскільки 40 % субстрату буде окиснюватися до CO_2 для одержання енергії, вміст меляси буде – $(0,06 \cdot 0,4) + 0,06 = 0,084$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси.

У протеазі – 50% Карбону, отже вміст у 5г – $(5 \cdot 0,5) = 2,5$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(2,5 \cdot 100) / 40 = 6,25$ г.

У перерахунку на мелясу одержимо – 12,5 г. Враховуючи 40% втрат субстрату, для одержання 5г біомаси, потрібно внести $(12,5 \cdot 0,4) + 12,5 = 17,5$ г/л.

Отже, загальний вміст меляси у середовищі, який необхідний для синтезу біомаси (5 г/л) = $0,084 + 17,5 = 17,584$ г.

Розрахунок вмісту в середовищі азоту

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що вміст Нітрогену – 10 %. Таким чином, у 5г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,5.

У поживному середовищі як джерело азоту буде виступати дріжджовий екстракт, адже він багатий на різні поживні компоненти, такі як білки та амінокислоти. Але, оскільки, точний склад не наведений і який з компонентів буде виступати джерелом азоту невідомо, розрахунки проводити немає можливості.

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

Морфолого-культуральні ознаки

Bacillus licheniformis – це прямі палички з закругленими кінцями. Розташовуються поодинокі та у парах, можливе утворення ланцюжків. Розмір клітин 0,5-1,5 мкм. При фарбуванні за Грамом (кристалічним фіолетовим та подальшою обробкою розчином Люголя, спиртом та фуксином) отримують позитивну реакцію, тобто грампозитивну, утворюють сферичні ендоспори. Розмноження здійснюється поділом.

Клітини рухливі, при рості на МПА утворюють колонії брудно-білого кольору. Не виділяють пігменти в поживне середовище. На МПА при 31°C, 48 год утворюють обмальовані колонії брудно-білого кольору. Старі колонії починають жовтіють[11].



Рис. 2. Ріст *B. Licheniformis* на агарі[12,13]

Фізіолого-біохімічні ознаки

B. licheniformis – аероб, хемоорганогетеротроф.

Діапазон температур: оптимальні умови росту 31-34 ° С. Також росте в межах рН від 6,9 до 7,3, оптимальне значення 7.

Асимілюють та споживають моно- і дисахариди такі як глюкоза, маноза, галактоза, сахароза, мальтоза та інші, деякі полісахариди, може споживати пептон, і інші продукти білкової природи.

Утворює кислоти з глюкози, каталазопозитивний, може мобілізувати фосфор з оротофосфату кальцію, має підвищену здатність до утворення індолу та гіберилінів[11].

2.3 Таксономічний статус

Згідно з другим виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій *Bacillus licheniformis* відносяться до:

Царство - *Bacteria*

Відділ - *Firmicutes*

Клас - *Bacill*

Ряд - *Bacillalul*

Порядок - *Bacillales*

Родина - *Bacillaceae*

Рід - *Bacillus*

Вид - *Licheniformis*[14].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба в цільовому продукті – ферменті протеазі у миючому засобі для дитячої одежі, у капсулах дозованих по 25 мл, Start, Tide, Ariel та Uti-Puti.

Згідно статистичних даних дитячого населення (від 0-4 років) в Україні на 2022 рік нараховується 1 566 776 осіб. ([Населення України \(ukrcensus.gov.ua\)](http://ukrcensus.gov.ua))

На прання одежі використовується по одній капсулі 25 мл на день. Тобто для забезпечення миючим засобом дитячого населення України необхідно

$1\,566\,776 \cdot 25 = 39\,169\,400$ мл або $39\,169,4$ л в день. В рік $39\,169,4 \cdot 365 = 14\,296\,831$ л або $14\,296,9$ м³ на рік миючого засобу.

Річна потреба ферменту протеази для забезпечення миючим засобом дітей України віком від 0-4 років (за даними 2022)

Таблиця 3.1

Цільовий споживач	Кількість цільового споживача на 2022 рік, осіб	Використання	Необхідна кількість засобу на рік, м ³	Кількість капсул на рік, шт.
Діти від 0-4	1 566 776	Щоденно	14 296,9	571 873 240

3.2. Розрахунок потужності виробництва протеази як компонента миючого засобу для дитячої білизни

Вважаємо, що наведені компанії були давно засновані та вже тривалий час існують на ринку та зважаючи на рівень довіри до нових продуктів, що досить низький, виробництво буде забезпечувати 26 % цільового споживача приблизно 407 361 дітей України віком від 0-4 років.

$1\,566\,776 \cdot 0,26 = 407\,361$ особа

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ		
Розроб.		Мезінова І.Р.					
Перевір.		Карлаш Ю.В.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						20	76
					20		
					Кафедра БТМ		

У літературі не вказується протеолітична активність у готовому миючому засобі, тому будемо спиратися на дані вказаної масової частки протеази у миючому засобі та лабораторних даних, де сказано, що вже при 131.96 ± 1.75 од/мл починає відбуватися гідроліз білкових забруднень[15].

Так як масова частка протеази у миючому засобі може бути 1% до 4 %, то візьмемо середнє число, $(1\%+4\%)/2 = 2,5\%$ необхідна масова частка протеази у миючому засобі.

Розрахуємо необхідну кількість активності протеази на рік, у капсулах по 25 мл і масовою часткою ферменту 2,5% беручи до уваги, що в день споживач витрачає одну капсулу:

$$A_{\Sigma} = 25 \text{ мл} * 0,025 * 133 \text{ Од/мл} * 365 \text{ днів} * 407 \text{ 361} = 1,23 * 10^{10} \text{ Од/рік}$$

Представимо фермент у вигляді сухої маси та із стандартною активністю 50 000 Од/г ([Ензим | Технічні ферменти | Протеаза \(enzim.ua\)](#)). Тоді кількість лужної протеази в умовних кг буде складати:

$$A_{\text{цку}} = A_{\text{ст}} * 1000 = 5 * 10^4 * 1000 = 5 * 10^7 \text{ Од/кг}$$

Кількість ферменту на рік:

$$G_{\text{гп}} = A_{\Sigma} / A_{\text{ст}} = 12,3 * 10^9 \text{ Од} / 5 * 10^4 \text{ Од/г} = 246 \text{ ум. кг/рік.}$$

Отже, для забезпечення лужною протеазою як компонента засобу для прання дитячої одежі необхідно 246 кг/рік.

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

Отже, для того, щоб забезпечити дітей миючими засобами, які містять лужну протеазу як компонент бактерією *Bacillus licheniformis* LBA 46 потрібно одержати 246 кг/рік протеази з стандартною активністю 50 000 Од/г.

Беремо кількість робочих трудоднів (Трд) 85, в інший час до кінця року підприємство може переорієнтуватись на випуск подібної продукції, але із залученням інших біологічних агентів. Тоді кількість продукту на добу (Vд) складає:

Кількість циклів (партій) за рік

$$N_{\text{цк}} = 24 \cdot T_{\text{рд}} / T_{\text{ц}} = 24 \cdot 85 / 82 = 25 \text{ циклів}$$

де $T_{\text{цв}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (72 год) і час, що необхідний для підготовки ферментера до здійснення ферментаційних процесів (10 год).

Отже, підготовка ферментера до роботи складається з таких процесів: миття та огляде (2 год), здійснення перевірки на герметичність (2 год), стерилізації (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засіву інокулятом (0,5 год) та вивантаження культуральної рідини (1 год).

Розраховуємо кількість ум.кг ферменту/цикл

$$G_{\text{цку}} = G_{\text{гп}} / N_{\text{цк}} = 246 / 25 = 9,8 \text{ ум.кг/цикл}$$

Далі розраховуємо кількість одиниць активності ферменту, які знаходяться в 1 умовному кг, Од фм / ум. Кг препарату

$$A_{\text{цку}} = A_{\text{ст}} \cdot 1000 = 5 \cdot 10^4 \cdot 1000 = 5 \times 10^7 \text{ Од/кг}$$

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

$$A_{\text{крт}} = A_{\text{кр}} \cdot 10^6 (1 - E_a) / P_{\text{кр}} = 3000 \cdot 10^6 (1 - 0,5) / 5 = 3 \times 10^8 \text{ Од/тов.кг}$$

Де, $A_{\text{кр}}$ – це активність препарату в КР, од/мл КР[5], 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, умовно беремо 5 г/л)

Визначаємо кількість товарного ферменту за цикл, тов.кг/цикл

$$G_{\text{цкт}} = A_{\text{цку}} \cdot G_{\text{цку}} / A_{\text{крт}} = 5 \cdot 10^7 \cdot 9,8 / 3 \cdot 10^8 = 1,63 \text{ тов.кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, який зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат ферменту при виділенні $E_{св}$, m^3

$$V_{кр} = K1 \cdot G_{цкт} \cdot CP_{гп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,3 \cdot 1,63 \cdot 0,9/5 \cdot (1 - 0,5) = 0,76 \text{ м}^3$$

$E_{св}$ – сумарні втрати при виділенні готового продукту, $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K1=1,1 - 1,5$). Беремо, $K1 = 1,3$.

Визначаємо робочий об'єм ферментера, $V_{ф}$, m^3 , $E_{ф} = 0,05$

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 0,76 / (1 - 0,05) = 0,8 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера, m^3

$$V_{пф} = V_{ф} / K_{ф} = 0,8 / 0,6 = 1,33 \text{ м}^3$$

де $K_{з} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Згідно таблиці, яка містить габарити ферментерів найближчий геометричний об'єм ферментера складає $V_{ф} = 1,25 \text{ м}^3$.

Уточнимо коефіцієнт заповнення:

$$K_{уф} = V_{ф} / V_{гф} = 0,8 / 1,25 = 0,64$$

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

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу протеази *Bacillus licheniformis* LBA 46

За один виробничий цикл можна отримати $V_{цк} = 0,8 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з урахуванням, що при одержанні культуральної рідини втрати ($E_{ф}$) в результаті крапливиносу через колектор становлять приблизно 10-15%. Тому, кількість поживного середовища та інокуляту перед виробничим біосинтезом буде складати:

$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 0,8 / (1 - 0,05) = 0,8 \text{ м}^3$, що становить робочий об'єм ферментера.

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

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зп}} = 800 / 0,6 = 1\,330 \text{ л}$$

Щоб отримати таку кількість культуральної рідини беремо стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 1,25 \text{ м}^3$ і перераховуємо попередньо заданий коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зп1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 800 / 1\,250 = 0,64$$

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

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

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 800 / (1 + 0,1) = 700 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу ($V_{\text{пм1}}$) буде складати:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 800 - 700 = 100 \text{ л.}$$

Для одержання 100 л посівного матеріалу в інокуляторі врахувують втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф}}$), що становить близько 10-15%. Кількість поживного середовища ($V_{\text{пс2}}$) і посівного матеріалу ($V_{\text{пм2}}$) складають:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 700 / (1 - 0,05) = 700 \text{ л}$$

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 700 / (1 + 0,1) = 600 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 700 - 600 = 100 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту $V_{роб.2} = 700$ можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з таким геометричним об'ємом:

$$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап2} = 700/600 = 1\,167 \text{ л.}$$

Вибираємо стандартний посівний апарат з геометричним об'ємом $V_{сф2} = 1,00 \text{ м}^3$. Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{з2} = V_{роб.2} / V_{сф2} = 700/1,00 = 0,7$$

Для одержання 100 л посівного матеріалу в інокуляторі потрібно враховувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), що становить близько 10-15%. Кількість поживного середовища ($V_{пс4}$) і посівного матеріалу ($V_{пм4}$) складатиме:

$$V_{роб.3} = V_{цк} / (1 - E_{ф}) = 100/(1-0,05) = 105 \text{ л}$$

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ф}) = 105/(1+0,1) = 95 \text{ л}$$

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 105 - 95 = 10 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 105$ л одержують під час культивування продуцента в інокуляторі з геометричним об'ємом

$$V_{па3} = V_{роб.3} / K_{зап.3} = 105/0,6 = 175 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 160$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{сф3} = 105/160 = 0,65$$

Кількість посівного матеріалу для засіву невеликого ферментера $V_{пм4} = 10$ л можна одержати під час культивування штаму-продуцента у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{па4} = V_{роб.4} / K_{зап4} = 10/0,6 = 16,6 \text{ л.}$$

Беремо посівний апарат із стандартним геометричним об'ємом $V_{сф4} = 0,015 \text{ м}^3$. Уточнюємо прийнятий коефіцієнт заповнення:

$$K_{32} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сф4}} = 10/15 = 0,6$$

Для одержання 10 л посівного матеріалу в інокуляторі врахують втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{\text{ф}}$),

що становить близько 10-15%. Кількість поживного середовища ($V_{\text{пс4}}$) і посівного матеріалу ($V_{\text{пм4}}$) буде складати:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{цк}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 10 / (1 - 0,05) = 11 \text{ л}$$

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 11 / (1 + 0,1) = 10 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 11 - 10 = 1 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах на качалці $V_{\text{пм4}} = 1 \text{ л}$. Втратами при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{\text{роб5}} = V_{\text{пм4}} = 1 \text{ л.}$$

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступний об'єм поживного середовища $V_{\text{пс5}}$ та кількість посівного матеріалу $V_{\text{пм5}}$, що дорівнює 10% від об'єму поживного середовища

$$V_{\text{пс5}} = V_{\text{роб5}} / (1 + X_{\text{пм5}}) = 1 / (1 + 0,1) = 0,9 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм5}} = V_{\text{роб5}} - V_{\text{пс5}} = 1 - 0,9 = 0,1 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм5}} = 1 \text{ л}$ (1000 мл) можна отримати шляхом культивування штаму-продуцента в колбах на качалці. Для цього використовують колби Ерленмеєра з $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,2$.

Кількість колб для отримання посівного матеріалу складає:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_3) = 1000 / (750 * 0,2) = 6,6 = 7 \text{ колб.}$$

Отже, для одержання інокуляту необхідно 7 качалочних колб.

Так, за результатами розрахунків для біосинтезу протеази *Bacillus Licheniformis* LBA 46 необхідно встановити наступні апарати: один ферментер об'ємом 1,25 м³, один інокулятор об'ємом 1,00 м³, один інокулятор об'ємом 160 л та один інокулятор на 15 л.

Таблиця 3.2

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення, частка	Робочий об'єм ферментера, л	Об'єм посівного матеріалу (10%), л	Об'єм підготовки поживного середовища, л
1 250	0,6	800	100	700
1 000	0,7	700	100	600
160	0,6	105	10	95
15	0,6	11	1	10
0,750*7 колб	0,2	1	0,1	0,9

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Bacillus licheniformis як джерело вуглецю може використовувати глюкозу. Згідно літературних даних за умов росту на глюкозі у *Bacillus licheniformis* функціонує шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса, тобто гліколіз[16].

Глюкоза за допомогою глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.69) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за допомогою глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктози 6-фосфат у β -D-фруктозу -1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозу 1,6-фосфат спричиняє її перетворення на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат.

До подальшого катаболізму глюкози долучається гліцеральдегід 3-фосфат, який перетворюється під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) на гліцерат 1,3-фосфат, що під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під впливом енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40)[17].

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Розроб.	Мезінова І.Р.						
Керівник	Карлаш Ю.В.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Аркуші
						28	76 28

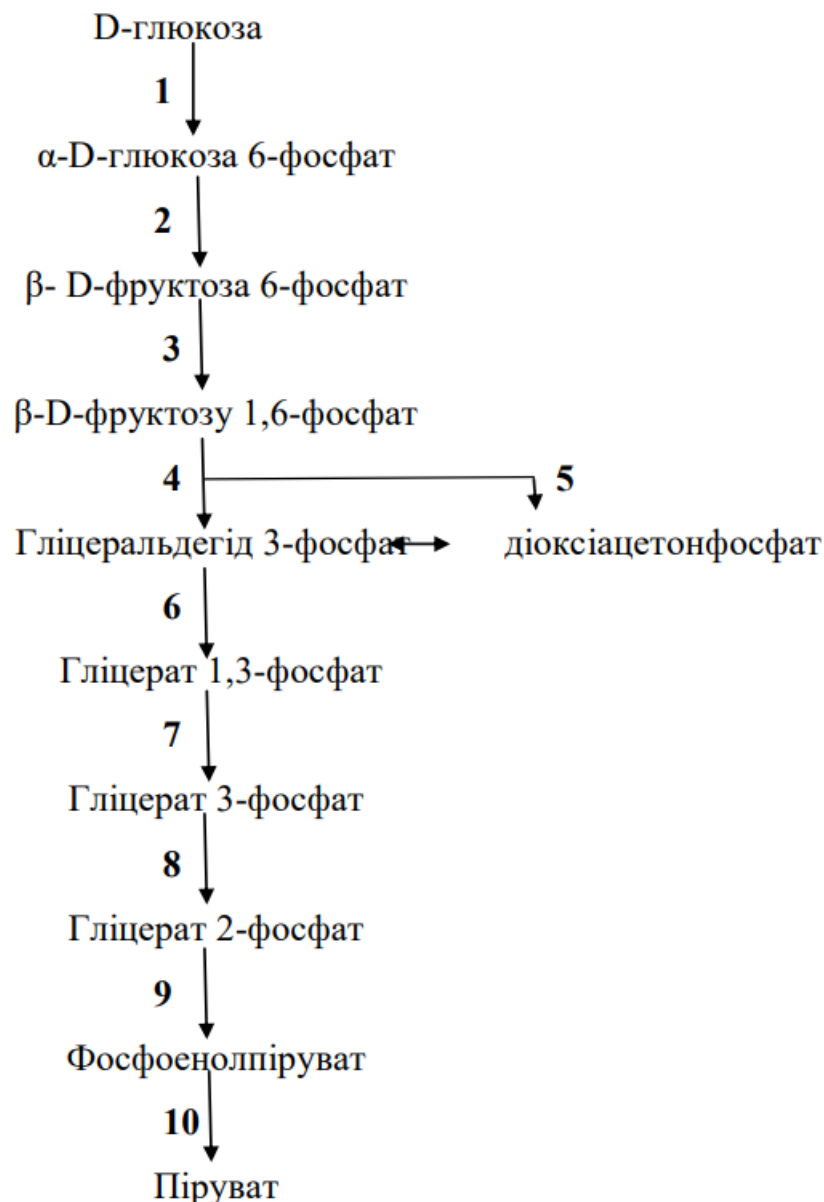


Рис 3. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.69); 2 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – фосфоглюкокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 5 – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 6 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Попередники біосинтезу амінокислот	
Попередник	Амінокислота
Піруват	Аланін, валін, лейцин
Оксалоацетат	Аспартат, аспарагін, метіонін, лізин, треонін, ізолейцин
2-Оксоглутарат	Глутамат, глутамін, аргінін, пролін
3-Фосфогліцерат	Серин, гліцин, цистеїн
Фосфоенопіруват, еритрозо-4-фосфат	Фенілаланін, тирозин, триптофан
5-Фосфорибозил-1-пірофосфат + АТФ	Гістидин

Рис. 4. Попередники синтезу амінокислот[18]

Більшість мікроорганізмів синтезують всі 20 амінокислот.

Утворення глутаміну з глутамату каталізується глутамінсинтетазою. За допомогою глутаматсинтетази аміногрупа глутаміну може переноситись на 2-оксоглутарат з утворенням глутамату.

Необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників.

Вихідні сполуки для амінокислот це – піруват, оксалоацетат і фосфоенолпіруват. Оксалоацетат є початковою точкою для синтезу 6 амінокислот, 2-оксалоглутарат - попередником синтезу 4, а піруват – трьох амінокислот.

Аланін та аспартат синтезуються з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням, використовуючи глутамат як донор аміногрупи. Аспаргін синтезується глутамінсинтетазою. Відновлення аспартату дає напівальдегід аспаргінової кислоти – попередник лізину, треоніну та метіоніну. Треонін дезамінується до утворення 2- оксобутирату, який в результаті послідовної дії 4 попередніх ферментів перетворюється на ізолейцин. Під дією 4 ферментів піруват перетворюється на валін; проміжний продукт синтезу валіну є попередником в утворенні лейцину. Серин, гліцин та цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, пролін – аргінін – із глутамату. Біосинтез ароматичних амінокислот з утворенням 1) триптофану через антранілат, 2) утворення тирозину і феніл аланіну через префенат[19].

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для культивування *Bacillus licheniformis* LBA 46 необхідні аеробні умови, так як продуцент являється факультативним аеробом. Для забезпечення цих умов використовують перемішуючий пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів[7].

Культивування будемо проводити глибинним способом, тому що саме цей спосіб значно скорочує площі при виробництві, поліпшує гігієну праці, виключає тяжку ручну роботу, спрощує механізацію виробництва і т.д., а також створює можливість переходу на безперервний спосіб культивування.

Глибинне культивування – це головний спосіб, який використовують у мікробіологічних виробництвах. Воно має ряд значних переваг: менш трудомістке, потребує менше площ, має меншу ймовірність інфікування, його легше автоматизувати, контролювати й отримувати більший вихід продукції.

3. Також виробництво протеаз може здійснюватись періодичним способом культивування.

Отже, культивування продуцента протеази *Bacillus licheniformis* LBA 46 здійснюється глибинним способом протягом 72 годин, в аеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу[7].

Оснащення ферментера і його конструкція загалом залежить від умов культивування біологічного агента.

У промислових масштабах мікроорганізми культивуються в реакторах у найкращих умовах виробництва.

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Мезінова І.Р.			РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАН- НЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧ- НОЇ СХЕМИ			Літ.	Арк.	Аркушів	
Керівник		Карлаш Ю.В.								31	76
Реценз.								31			
Н. Контр.								Кафедра БТМ			
Затверд.		Стабніков В.П.									

Змішування в реакторі є важливим під час виробництва протеаз, що передається шляхом аерації та перемішування, культивування проходить при обертанні зі швидкістю 300 об/хв[7].

Отже, для проведення відповідного біосинтезу важливо насамперед постачання повітря клітинам, у зв'язку з особливостями даного штаму.

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Для культивування *Bacillus licheniformis* LBA 46 необхідні аеробні умови, так як продуцент являється факультативним аеробом. Підготовка повітря проводиться для очищення від джерел контамінації та стабілізації термодинамічних показників та механічних часток.

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 чи іонізуючого випромінювання є більш надійним та ефективним, але для промислових масштабів - недопустимий, оскільки у виробничих умовах витрачають великі об'єми повітря. В промислових умовах використовується в основному метод фільтрування крізь шари пористих, волокнистих або насипних матеріалів[20].

Тому для одержання повітря в лабораторії та боксах, де працюють з інокулятом та посівною культурою, використовують УФ-лампи, так як вони не потребують великої кількості повітря.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізується фільтрами грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальними фільтрами (фільтрів високої ефективності). Індивідуальні фільтри встановлюють перед кожним ферментером. Головні ферментери заповнюють набивним волокном, встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі

стиснутого аераційного повітря. На таких фільтрах видаляється близько 98% мікроорганізмів-контамінантів. На наступному рівні-індивідуальні фільтри, заповнені тонкими мембранами чи волокнами, що забезпечують видалення решти 2% контамінантів, що залишилися.

Фільтрувальні волокна повинні ефективно функціонувати за малих перепадів тиску до і після фільтрування і висока пилоємність.

В якості головного фільтра використовують базальтне волокно. Головною перевагою цього волокна є висока паростійкість. При багаторазовому впливі гострої пари під тиском 0,2 МПа волокно не знижує міцності протягом 1 року роботи. Властивості базальтового волокна при нагріванні до 1100 °С не змінюються. Також базальтне волокно не піддається горінню й гниттю. За експериментальними даними, оптимальний діаметр волокна для фільтрів грубого очищення повітря становить 12-14 мкм. А недоліком базальтового волокна є наявність у ньому голок з базальтових підплавів та інших різних механічних включень.

В якості індивідуального фільтру використовують фільтри з фторопласту у вигляді ФЕП- фільтрувального елемента патронного типу. Їх перевага - це швидка заміна та багаторазовість[21].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Мета підготовки виробничих приміщень є забезпечення чистоти і асептичності процесу, а саме зведення до мінімуму мікробних та механічних забруднень. Процес підготовки включає в себе проведення щоденного (вологе прибирання, обробка підлоги) та генерального прибирання (комплексне миття обладнання та виробничих приміщень)[20].

Для того, щоб обрати мийний або дезінфікуючий засіб, враховують його вартість та витрати на оброблення потрібної площі виробничого приміщення. Середня витрати мийного чи дез. засобу становить 100 мл на 1м² (згідно з

методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502)[22].

Крім того, миючі та дезінфікуючі засоби повинні бути доступними та безпечними, добре мити та дезінфікувати. Та як більшість обладнання виготовлено із нержавіючої сталі, то миючі засоби не повинні входити з ним в реакцію. Також миючі та дезінфікуючі засоби повинні повністю змочувати всі поверхні із різних конструкційних матеріалів, забезпечувати пом'якшення води, повне усунення механічного, білкового та жирового забруднень за допомогою їх диспергування та емульгування, а також бути ефективними, безпечними і недорогими, тому було обрано та проаналізовано такі миючі та дезінфікуючі засоби: каустична сода, кальцинована сода, «DivosanForte» та «PROFI CHLOR».

Кальцинована сода - зневоднений вуглекислий натрій (Na_2CO_3). Засіб належить до миючих. Це білий дрібнокристалічний порошок, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату. Гарячі $55 \pm 5^\circ\text{C}$ розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів приблизно до $45 \pm 5^\circ\text{C}$ мийна здатність падає. Розчини кальцинованої соди можуть кородувати об'єкти, що виготовлені з алюмінію. Цей засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки згідно ГОСТ 12.1.007). У концентрованих розчинах та нативному вигляді подразнює шкіру, а також слизову оболонку очей.

Рекомендують використовувати 0,5 % розчини кальцинованої соди з температурою приблизно $45 \pm 5^\circ\text{C}$ для ручного миття обладнання та інвентарю, а 1-2 % розчини з температурою приблизно $55 \pm 5^\circ\text{C}$ для циркуляційного миття обладнання та комунікацій[22].

Каустична сода (NaOH) - безбарвна кристалічна речовина. Гігроскопічна. Належить до миючих засобів. Добре розчинна у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі 1-2 % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, а також розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури

розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, що виготовлені з алюмінію. Цей засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру одразу викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Рекомендують використовувати 0,5 % розчини каустичної соди з температурою приблизно 45 ± 5 °C для ручного миття обладнання та інвентарю, а також 1-2 % розчини з температурою 55 ± 5 °C для циркуляційного миття обладнання та комунікацій[22].

«DivosanForte» - високоефективний дезінфікуючий засіб на основі надоцтової кислоти, застосовується в харчовій, молочній промисловості і т.д. DivosanForte - стабілізований 15% розчин надоцтової кислоти, що не піниться і легко змивається. Рекомендується використовувати у концентрації 0,15%. Ефективний при видаленні різних типів мікроорганізмів, бактерій, дріжджів, грибків та вірусів. Спеціально розроблений як дезінфектант заключного миття, що застосовують в системах автоматичного CIP миття. Добре видаляє плями і має ефект, що деодорує. DivosanForte рекомендований для автоматичної подачі за допомогою відповідного обладнання для автоматичного миття. Використовують для дезінфекції обладнання[23].

«PROFI CHLOR» - засіб для проведення поточної та заключної дезінфекції, генеральних прибирань, а також для дезінфекції твердих поверхонь приміщень, приладів, устаткування, санітарно-технічного обладнання, стін, підлоги, вікон та дверей. Як правило, використовують у концентрації 0,1 %.

Склад, 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. Також використовують для дезінфекції обладнання[24].

У ферментаційному відділенні встановлені інокулятор, посівний апарат та виробничий ферментер. Загальна площа приміщення, де встановлено дане облад-

нання становить 10 м × 9 м. Враховуючи, що поверхня стін даного приміщення теж підлягає миттю та дезінфекції на висоту приблизно 7 м, загальна площа обробки складе

$$\sum F = (10 \text{ м} \times 9 \text{ м}) + (10 \text{ м} + 10 \text{ м} + 9 \text{ м} + 9 \text{ м}) \times 7 \text{ м} = 356 \text{ м}^2$$

Таблиця 5.1

Узагальнена характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва протеази

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л Робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчину, Е _{дз} , Грн/м ²
Кальцинована сода	Обладнання, інвентар, комунікація	0,5	70	0,35	0,1	12,46
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікація	0,5	89	0,44	0,1	15,66
DivosanForte	Обладнання, інвентар, комунікація	0,15	262,45	2,1	0,1	74,76
PROFI CHLOR	Поверхні, стіни, вікна, двері, підлога, обладнання	0,1	300	0,3	0,1	10,68

На підставі заповненої таблиці характеристик миючих та дезінфікуючих засобів вибираємо найбільш ефективні.

Критерієм вибору є мінімальна вартість обробки 1м² поверхні -

$$E_{\phi} = \sum F \times D_{\text{дз}} \times B_{\text{дз}}$$

Отже, мінімальна вартість обробки 1м² поверхні

Засобом DivosanForte: $E_{\phi} = 356 * 0,1 * 262,45 = 9\,343,22$ грн;

і засобом PROFI CHLOR становить $E_f = 356 * 0,1 * 300 = 10\,680$ грн.

Підсумовуючи результати обчислення, найбільш ефективний миючий та/або дезінфікуючий засіб для поверхонь є DivosanForte.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу в качалочних колбах необхідно приготувати 900 мл поживного середовища, стерилізація відбуватиметься в автоклаві.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus licheniformis* LBA 46, створюємо таку композицію:

Композиція А: патока цукрової тростини (меляса), кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, суха молочна сироватка (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Рівень піни контролюється піногасником. Компоненти Композиції А об'єднують і стерилізують при температурі 112 °С, упродовж 30 хв, при тиску 0,05 МПа.

Для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 15 л

Для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 15 л необхідно приготувати 10 л поживного середовища, процес стерилізації проводитимемо в автоклаві.

Композиція А: патока цукрової тростини (меляса), кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, суха молочна сироватка (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Стерилізацію Композиції А проводять при температурі 112 °С, упродовж 30 хв і тиску 0,05 МПа.

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 160 л та 1,00 м³

Для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 160 л та 1000 л готують 95 та 600 л поживного середовища, стерилізацію проводять в реакторі.

Композиція А: патока цукрової тростини (меляса), кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт, суха молочна сироватка (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Стерилізацію Композиції А проводять при температурі 112 °С, упродовж 30 хв і тиску 0,05 МПа.

Для виробничого біосинтезу у ферментері 1,25 м³

Для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 250 л необхідно приготувати 700 л поживного середовища.

Композиція А: Патока цукрової тростини (меляса) – 32, кукурудзяний екстракт – 6, дріжджовий екстракт – 2, суха молочна сироватка – 20.

Усі компоненти ПС готують в окремому реакторі та стерилізують за допомогою гострої пари при температурі 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біо-синтезу протеази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для виділення механічного забруднення
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал-базальтове волокно фільтрування 0,1 м/с, E=90% [25]
К-3	Компресор	1	Компресор KSD-76A фірми Keshidi (Китай) 4 куб. м/хв, робочий тиск 7 МПа [26]
Т-4	Теплообмінник - охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач від фірми ОПЕКС (TRANTER) Теплова потужність: 10-400кВт [27]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер фірми «ТОВ Завод енергообладнання Лідер» (Україна), виготовлений із сталі, об'єм 2700 л, робочий тиск 10 атм [28]
Т-6	Теплообмінник - нагрівач	1	Теплообмінник ГФТА ТПСР-19 (Україна) товщина пластинок 0.5 мм -0.6 мм [29]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтруючий матеріал-фторопласт E=99,92, швидкість фільтрування 66 м³/с [30]
Р-8	Реактор-змішувач для освітлення меляси	1	Реактор-змішувач оснащений сорочкою перемішуючим пристроєм. Загальний об'єм 100 л, швидкість перемішування 360 об/хв [31]

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Мезінова І.Р.			РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКА- ЦІЯ ОБЛАДНАННЯ		Літ.	Арк.	Аркушів	
Керівник.		Карлаш Ю.В.							39	76
Т. Контр.							Кафедра БТМ 39			
Н. Контр.										
Зав. каф.		Стабніков В.П.								

ФІ-9 ФІ-10 ФІ-11 ФІ-12	Фільтр індивідуальної очистки	4	Фільтрполотно Петрянова ФПП-15-1,5, середній діаметр волокон 1,5 мкм, щільність поверхні 27 г/ м ² , опір повітряного потоку 1,5 Па [32]
ФР-13	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер Biostat Cplus, об'єм апарату 15 л [33]
Р-14	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації компонентів	1	Реактор –змішувач РС 70. Загальний об'єм 100 л [34]
ФР-15	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер Biostat D-DCU, об'єм апарату 160 л [35]
Р-16	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації компонентів	1	Реактор – змішувач РПМ 400. Загальний об'єм 600 л [36]
ОД-17 ОД-24 ОД-25 ОД-26	Об'ємно-ваговий дозатор	4	Ваговий дискретний дозатор-витратомір для сипких продуктів "Техноваги" для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1%. Продуктивність: від 0,01 до 5м куб./год [37]
Н-18 Н-19	Насос перистальтичний	2	Насос перистальтичний WG600S «ZhengzhouMingyiInstrumentEquipment Co., Ltd», продуктивність 0,4- 13 л / хв [38]
ФР-20	Ферментер (посівний апарат)	1	Ферментер від фірми «LPPGroup»(Швеція). Об'єм апарату 1,00 м ³ [39]
Р-21	Реактор-змішувач об'ємом 700 л	1	Об'єм апарату – 700 л; частота обертання лопатевої мішалки – 100 об/хв [40]
Р-22	Реактор-змішувач стерилізації для піногасника	1	Реактор-змішувач об'єм 10 л, швидкість перемішування 100 об/хв [41]
ФР-23	Ферментер	1	Ферментер від фірми «LPPGroup»(Швеція). Об'єм апарату 1,25 м ³ [42]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.1.1. Миття обладнання

Для миття внутрішніх поверхонь інокуляторів і ферментера застосовують 5 %-ий розчин каустичної соди, його закупують вже в концентрації, яка нам необхідна. Процес миття ведеться вручну персоналом з кваліфікацією протягом 1–2 годин. Температура розчину становить 70°C.

ДР 1.1.2. Технічний огляд обладнання та комунікацій

Проводиться візуальна перевірка всього обладнання, яке бере участь у даному технологічному процесі, підтягують різьбові фланцеві з'єднання на самому обладнанні і на трубопроводах.

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

Для дезінфекції обладнання використовуємо миючі засоби «DivosanForte» та «PROFI CHLOR», температура розчину становить 20°C, яким оброблюємо зовнішні поверхні апаратури, комунікацій, підлогу та стіни. Розчин готують у спеціальних тарах. Ополіскування зовнішніх і внутрішніх поверхонь обладнання та комунікацій проводиться очищеною водою протягом 5 хв.

ДР 1.1.4. Перевірка на герметичність обладнання

У обладнання подають стерильне повітря за тиску 0,15–0,2 МПа і стежать за наявністю чи відсутністю падіння тиску після 0,5–1 години. Якщо фіксується падіння тиску більше ніж 0,005 МПа, то апарат вважають не герметичним.

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХ- НОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Мезінова І.Р.							
Керівник.		Карлаш Ю.В.					41	76	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							
					41				

Для пошуку нещільностей потрібно обробити усі місця з'єднань мильним розчином і спостерігають за проявом мильних бульбашок. Якщо нещільності знаходять у фланцевих з'єднань і кришках ємкісного обладнання, проводять розбір та профілактичне ущільнення дефектних поверхонь, в якості ущільнювача можна використовувати пароніт, фторопласт або гуму. При необхідності проводять заміну пошкоджених елементів.

ДР 1.1.5. Стерилізація обладнання

Для стерилізації обладнання та комунікацій використовують насичену водяну пару температурою 130°C та тиску 0,2 МПа упродовж 1 години. Для забезпечення асептичності, після закінчення стерилізації, у інокулятори і ферментер подається стерильне повітря для підтримки надмірного тиску в межах від 0,003 до 0,005 МПа, така процедура проводиться для уникнення попадання сторонньої мікрофлори з навколишнього середовища.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (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 очистки 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°C в теплообміннику (Т-4). Далі у ресивері (Р-5) відбувається стабілізація вологості повітря. $W = 60 \%$.

ДР 2.5. Стабілізація термодинамічних показників

Далі, повітря підігрівають у теплообміннику (Т-6) для забезпечення надійної роботи фільтрів до температури 45-50°C. При цих температурах не відбувається конденсація пари на волокнах фільтра. $W = 50 \%$.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

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

ДР 2.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Кінцева стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальному фільтрі (ФІ-9,10,11,12). Як фільтрувальний матеріал використовують сополімерстирола. Ступінь очищення становить $E = 99,99 \%$. Далі стерильне аераційне повітря надходить на інші стадії виробничого процесу.

ДР 3. Освітлення меляси

ДР 3.1. Приготування 1 н розчину H_2SO_4 для підкислення меляси.

Для освітлення меляси необхідно її підкислити до рН 4-4,5. Потрібно приготувати 500 мл 1н розчину H_2SO_4 . У колбу об'ємом 1 л наливають 400 мл питної води і 100 мл 36%-го розчину H_2SO_4 та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 4. Підготовка та стерилізація піногасника

Для гасіння піни обираємо силікони, так як вони є досить ефективними.

ДР 4.1 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для інокулятора 15 л.

Для інокулятора об'ємом 15 л кількість піногасника буде становити 25 мл. Його будемо стерилізувати в автоклаві у колбі об'ємом 50 мл. Режим стерилізації 160 °C протягом 2 год.

ДР 4.2 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для інокулятора 160 л.

Для інокулятора об'ємом 160 л кількість піногасника буде становити 260 мл. Його стерилізують в автоклаві у колбі об'ємом 300 мл. Режим стерилізації 160 °C протягом 2 год.

ДР 4.3 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника інокулятора 1,00 м³.

Для посівного апарата об'ємом 1,00 м³ кількість піногасника буде становити 2 л. Стерилізують в автоклаві у колбі об'ємом 2,5 л. Режим стерилізації 160°C протягом 2 год.

ДР 4.4 Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для ферментера 1,25 м³

Для робочого ферментера 1,25 м³ кількість піногасника буде становити 2,5 л. Його стерилізують у реакторі об'ємом 10 л (Р-22) та подають у ферментер при появі піни. 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-17) вносять мелясу, додають 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-24) вносять 500 л 1 н сульфатної кислоти. Розчин витримують

протягом 24 години при температурі не нижче 25° С та перемішують при 150 об/хв протягом 10 хв.

ДР 6. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 6.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Табл. 7.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 900 мл середовища

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 900 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Патока цукрової тростини (меяса)	32	28,8	А	900
Кукурудзяний екстракт	6	5,4		
Дріжджовий екстракт	2	1,8		
Суша молочна сироватка	20	18		
Вода	900 мл			
Разом	60			900

ДР 6.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

Для культивування використовується колби об'ємом 0,75 л. На технічних вагах зважують поживне середовище і поміщають в колби та додають 900 мл питної води і перемішують до розчинення компонентів. Колбу закривають ватно-марлевым корком після чого закривають ватно-марлевими пробками, потім поміщають в автоклав. Стерилізація композиції А відбувається за температури 112 °С, 30 хв.

ДР 6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 15 л (ФР-13)

Для культивування в інокуляторі об'ємом 15 л, необхідно приготувати 10 л поживного середовища

Табл. 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 10 л середовища

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 10 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Патока цукрової тростини (меляса)	32	320	А	10
Кукурудзяний екстракт	6	60		
Дріжджовий екстракт	2	20		
Суша молочна сироватка	20	200		
Вода	10 л			
Разом	60			10

ДР 6.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують поживне середовище, поміщають в колбу і додають води та перемішують. Колбу закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 6.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 160 л (ФР-15)

Для культивування в інокуляторі об'ємом 160 л, необхідно приготувати 95 л поживного середовища

Табл. 7.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 95 л середовища

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 95 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Патока цукрової тростини (меляса)	32	3 040	А	95
Кукурудзяний екстракт	6	570		
Дріжджовий екстракт	2	190		
Суша молочна сироватка	20	1900		

Вода	85,5			
Конденсат (10% від кількості води)	9,5 л			
Разом	60			95

ДР. 6.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Всі компоненти поживного середовища поміщають в окремий реактор об'ємом 100 л (Р-14) і додають 85,5 л води, перемішують. Стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв. Після охолодження вміст передають до інокулятора.

ДР 6.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1,00 м³ (ФР-20)

Для культивування в посівному апараті об'ємом 1,00 м³, необхідно приготувати 0,6 м³ поживного середовища

Табл. 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,6 м³ середовища

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,6 м³ середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Патока цукрової тростини (меляса)	32	19 200	А	600
Кукурудзяний екстракт	6	3 600		
Дріжджовий екстракт	2	2000		
Суша молочна сироватка	20	20000		
Вода	540 л			
Конденсат (10% від кількості води)	60 л			
Разом	60			600

ДР 6.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно вагового дозатора (ОД-25) зважують всі компоненти поживного середовища та поміщають в окремий реактор об'ємом 600 л (Р-16) і додають 540 л води, перемішують. Стерилізують при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв. Після охолодження вміст передають до інокулятора.

ДР 6.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для в ферментері об'ємом 1,25 м³ (ФР-23)

Для культивування в інокуляторі об'ємом 1,25 м³, необхідно приготувати 0,7 м³ поживного середовища

Табл. 7.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,7 м³ середовища

Об'єм середовища, яке необхідно приготувати	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,7 м³ середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Патока цукрової тростини (меляса)	32	22 400	А	700
Кукурудзяний екстракт	6	4 200		
Дріжджовий екстракт	2	1 400		
Суша молочна сироватка	20	14 000		
Вода	630 л			
Конденсат (10%)	70 л			
Разом	60			700

ДР 6.5.1. Приготування композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора (ОД-26) вносять мелясу, кукурудзяний екстракт, дріжджовий екстракт і суху молочну сироватку та поміщають в окремий реактор об'ємом 700 л (Р-21) і додають 630 л води, перемішують (100 об/хв).

ДР 6.5.2. Стерилізація композиції А

Стерилізують розчин у реакторі (Р-21) при температурі 112 °С (тиск – 0,05 МПа) протягом 30 хв і подають в ферментер.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу

ТП 7.1. Підтримання колекційної культури.

Колекційна культура *Bacillus licheniformis* LBA 46 зберігається у пробірках на живильному агарі при 4 °С. Пересів роблять кожні 1-3 місяці. Всі роботи з культурою виконують в асептичних умовах.

ТП 7.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Зразки культуральних середовищ збирали в різний час і висівали в чашки Петрі, що містять поживний агар, за допомогою методу наливної чашки. Чашки Петрі інкубували при 30 °С протягом 24 годин.

ТП 7.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Мікроорганізм вирощували на живильному агарі нахиляють та інкубують при 30 °С протягом 18-24 годин.

ТП 7.4. Вирощування інокуляту в колбах качалках

Для культивування використовуються колби об'ємом 0,75 л. Поживне середовище поміщають в колби і закривають ватно-марлевими пробками, потім поміщають в автоклав. Колби Ерленмейєра, що містять суспензію клітин у поживному середовищі, інкубували при 30° С 200 об/хв протягом 36-40 годин.

ТП 7.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 15 л

В боксі в умовно асептичних умовах у балон для асептичної передачі зливають композицію А (від ДР 6.2.1), перемішують і передають у інокулятор. Через засівну стерильну колбу вносять посівний матеріал. Вмикають перемішуючий пристрій. Відбувається подача піногасника за сигналом датчика піни. Температура вирощування посівного матеріалу 30 °С, а тривалість – 24 год.

ТП 7.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі 160 л

В інокулятор об'ємом 160 л, знаходяться композиції А (від 6.3.1). Перекачують посівний матеріал через патрубок і після вмикають перемішуючий

пристрій. Інокулятор обладнаний автоматичною системою піногасіння до якої подається піногасник, також подається стерильне повітря. Температура вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі є 30 °С, а тривалість – 24 год. В апараті створюється надлишковий тиск подачею стерильного стисненого повітря.

ТП 7.7. Вирощування інокуляту в посівному апараті 1,00 м³

В боксі в умовно асептичних умовах у спеціальний балон для асептичної передачі зливають середовище (від 6.4.1), перемішують і отриманий розчин асептично за допомогою перистальтичного насосу (Н-18) передають у інокулятор. Вмикають перемішуючий пристрій. За допомогою насосу перекачують посівний матеріал. Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі є 30 °С, а тривалість – 24 год.

ТП 8. Виробничий біосинтез

ТП 8.1. Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

В ферментер об'ємом 1,25 м³ поступово надходить стерильне поживне середовище з реактора (Р-21). Після стерилізації усього розчину в ферментер за допомогою труби перетискування вносять посівний матеріал.

Інокулят представляв 10% культурального середовища. Піноутворення контролювали під час бродіння за допомогою піногасника SILFAR SE 4.

Швидкість потоку повітря підтримували на рівні 0,8 vvm. Значення рН контролюють за допомогою каліброваного потенціометра. Загальний час бродіння становив 72 години, швидкість перемішування – 300 об/хв, температура – 30 °С, зразки (15 мл) збирали кожні 12 годин і центрифугували при 11000 x g протягом 15 хвилин при 5 °С. Культивують до протеолітичної активності 3000 Од/мл. Отриману культуральну рідину передають далі насосом (Н-19) на отримання цільового продукту. Безклітинний супернатант використовували як ферментний екстракт для визначення активності протеази.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1 Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Пробу простерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі, як правило, 50 мл і здійснюють прямим висівом на агаризовані середовища. Контроль здійснюється шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища (чи стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням.

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єма проби стерильною піпеткою та нанесенням на поверхню СА – для виявлення грибів і дріжджів, МПА – для виявлення бактерій. Суспензію розподіляють рівномірно по поверхні середовища за допомогою бактеріологічної петлі або шпателя Дригальського. Всі прилади повинні бути стерильними. Чашки з посівами поміщають у термостат за температури 30...32 °С. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 години. На поверхні поживних середовищ визначають візуально відсутність ознак росту мікроорганізмів[43].

8.2. Мікробіологічний контроль посівного матеріалу

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини здійснюють двома методами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища і мікроскопіюванням.

Прямий висів на агаризоване середовище. Контроль здійснюється шляхом розсівання проби готового посівного матеріалу і культуральної рідини на чашки Петрі з агаризованим поживним середовищем до ізольованих колоній методом виснажувального штриха і подальшим мікроскопуванням мікроорганізмів з окремих колоній, які виросли на середовищі після інкубування[43].

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб.		Мезінова І.Р.					
Керівник.		Карлаш Ю.В.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Аркуші
						51	76
					51		

Мікроскопіювання проводять світловим мікроскопом.

Для мікроскопічного аналізу готують препарат роздавлена крапля. Після рівномірного нанесення, препарат накривають покривним склом і мікроскопіюють[43].

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Визначення концентрації ферменту

Фермент виділяється в супернатант. Його визначають методом Лоурі. Метод ґрунтується на реакції білків з реактивом Фоліна, яка дає синє забарвлення.

До 0,4 мл супернатанту додають 2 мл реакційної суміші (50 мл 2%-ого розчину Na_2CO_3 в 0,1 н розчині NaOH + 0,3%-ого розчину $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-му розчині двозаміщеного виннокислого натрію або калію). Суміш перемішують і через 10 хв. доливають 0,2 мл робочого розчину Фоліна. Інтенсивність забарвлення визначають на спектрофотометрі з довжиною хвилі 750 нм через 30 хв. Кількість білка знаходять за калібрувальною кривою[44].

8.3.2. Визначення протеолітичної активності (ПС)

Активність протеази визначали згідно з методом, описаним Чарні та Томареллі (метод ґрунтується на реакції між субстратом і ферментом за оптимальної температури/рН протягом певного часу. Інтенсивність забарвлення розчину, є функцією кількості розщепленого азоказеїну, оскільки всі білки, що залишилися, випадають в осад після додавання трихлороцтової кислоти) та модифікованим Кастро та Сато, використовуючи азоказеїн як субстрат. Реакційна суміш містила 0,5 мл 0,5% азоказеїну в 0,05 М натрій-фосфатному буфері, рН 7, і 0,5 мл ферментативного екстракту, які інкубували протягом 40 хв при 60 °С. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 10% трихлороцтової кислоти (ТСА). Реакційну суміш центрифугували при 17 000 x g протягом 15 хвилин при 15 °С. Аліквоту 1 мл отриманого супернатанту нейтралізували 1 мл 5 М КОН. Одну одиницю активності протеази визначали як кількість ферменту, яка викликала збільшення поглинання на 0,01 при 428 нм[5].

8.3.3. Визначення білка та відновлюючого цукру

Кількісне визначення білків проводили за методом Лоурі з деякими модифікаціями. Розрахунки базувалися на стандартній кривій бичачого сироваткового альбуміну (BSA) і виражалися в мг/мл.

Відновлюючі цукри кількісно визначали за допомогою динітросаліцилової кислоти DNS[5].

Для визначення спочатку готують калібрувальний графік. Відбирають стандартний розчин галактуранової кислоти в діапазоні від 0 до 3 мл у різні пробірки, доводять об'єм усіх пробірок до 3 мл концентрацією дистильованої води від 0 до 750 мг. Додають 1 мл динітросаліцилової кислоти в усі пробірки, перемішують і тримають пробірку протягом 5 хвилин у киплячій водяній бані. Потім, пробірки мають охолонути до кімнатної температури. На спектрофотометрі визначають екстинкцію на 540 мм проти дистильованої води[45].

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 каустичної соди, час, чистота	Термометр технічний, годинник, кондуктометр	Під час проведення операції обробки	t розчину = 70 °C; τ = 1–2 год

Продовження табл. 5.1

Кх, Кт 1.1.3 <i>Дезінфекція та ополіскування обладнання і комунікацій</i>	Обладнання та комунікації, концентрація і температура розчину перекису водню, час	Термометр технічний, годинник, кондуктометр	Під час проведення операції обробки	$\tau = 5 \text{ хв}; t = 20^\circ \text{C}$
Кт 1.1.4 <i>Перевірка на герметичність обладнання</i>	Герметичність обладнання, час, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	$\tau = 0,5\text{--}1 \text{ год}; P = 0,15\text{--}0,2 \text{ МПа}$
Кт 1.1.5 <i>Стерилізація обладнання</i>	Обладнання, тиск і час стерилізації	Технічний манометр і годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$\tau = 1 \text{ год}; P = 0,2 \text{ МПа}$
Кт 2.1 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часток</i>	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 90\% ; P = \text{на початку}$ $48 \text{ Па}, \text{ а в кінці } 250 \text{ Па}$

	тисків			
Кт 2.2 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря, температура, тиск	Технічний манометр і термометр	Після стиснення повітря	$P = 0,35 \text{ МПа}$; $t = 120\text{--}200^\circ\text{C}$
Кт 2.3 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охолоджене повітря, температура, повітря після видалення зайвої вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, після видалення зайвої вологи	$t = 25\text{--}30^\circ\text{C}$; $W = 60\%$
Кт 2.4 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагрівання повітря	$t = 50^\circ\text{C}$; $W = 50\%$
Кт 2.5 <i>Очищення повітря в головному фільтрі</i>	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	$E = 95\%$; P = на початку 152 Па, в кінці 450 Па
Кт 2.6 <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, в кінці 600 Па

Кх 3 <i>Приготування 1 н розчину H_2SO_4 для підкислення м'яси</i>	Розчин H_2SO_4 , концентрація кислоти	Кондуктометр	У процесі приготування розчину	C = 36 %
Кт, Км 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 <i>Підготовка та стерилізація синтетичного піногасника для інокулятора та ферментерів</i>	Силіконовий піногасник, час, температура, відсутність мікробіоти	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Під час стерилізації безперервно визначається температура, після стерилізації визначається відсутність мікробіоти	t = 160 °C, τ = 2 год, відсутність мікробіоти
Кт, Кх 5 <i>Підкислення розчину м'яси та освітлення</i>	pH розчину м'яси, концентрація кислоти, час, температура, частота обертів мішалки	pH-метр, кондуктометр, годинник, термометр, технічний тахометр	pH та концентрацію визначають в процесі приготування розчину, протягом всього часу контролюється температура, тиск та частота обертів	pH 4-4,5; C = 36% розчину H_2SO_4 ; τ = 24 год; t = 25°C; w = 150 об/хв; t = 10 хв

Кт, Км 6.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках</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	$P = 0,05 \text{ МПа}$; $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\tau = 30 \text{ хв}$; відсутність мікробіоти
Кт, Км 7.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 15</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	$P = 0,05 \text{ МПа}$; $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\tau = 30 \text{ хв}$; відсутність мікробіоти

л				
<i>Приготування і стерилізація композиції А</i>				
Кт, Км 8.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 160 л Композиція 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	$P = 0,05 \text{ МПа}$; $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\tau = 30 \text{ хв}$; відсутність мікробіоти
Кт, Км 9.1 <i>Приготування та стерилізація поживного середовища</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	$P = 0,05 \text{ МПа}$; $t = 112 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\tau = 30 \text{ хв}$; відсутність мікробіоти

для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1,00 м³ Композиція А			мікробіологічного контролю після стерилізації	
Кт, Км 10.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для в ферментері об'ємом 1,25 м³ Композиція А	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
Кт, Км 11.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Bacillus lichniformis</i> LBA 46, морфологічна однорідність,	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль та пересіви культури проводять через 1-3 місяці	t = 4 °С; τ = 2-3 місяці; відсутність сторонньої мікробіоти

	відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій			
Кт, Км 11.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Колекційна культура <i>Bacillus licheniformis</i> LBA 46, морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять через 8 год	t = 30 °C; τ = 24 год; відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 11.3 <i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i>	Колекційна культура <i>Bacillus licheniformis</i> LBA 46, морфологічна однорідність,	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 год	t = 30 °C; τ = 24 год; відсутність сторонньої мікробіоти

	відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій			
Кт, Км 11.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів качалки, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів та температура, через 8 годин проводять мікроскопіювання	t = 30 °C; τ = 40 год; w = 200 об/хв; відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 11.5 <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 15 л</i>	Посівний матеріал, Температура, час вирощування, частота обертів мішалки, морфологія,	Термометр технічний, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп	Протягом всього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота	t = 30 °C; τ = 24 год; w = 200 об/хв; рН = 7,0; відсутність сторонньої мікробіоти

	відсутність сторонньої мікробіоти		обертів, температура, рівень піни та рН, через 8 годин проводять мікроскопіювання	
Кт, Кх, Км 11.6 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 160 л</i>	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, кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	t = 30 °C; τ = 24 год; w = 200 об/хв; рН = 7,0; відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 11.7 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1,00 м³</i>	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 = 30 °C; τ = 24 год; w = 200 об/хв; рН = 7,0; відсутність сторонньої мікробіоти

	відсутність сторонньої мікробіоти	мікроскоп	обертів, температура, рівень піни та рН, кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	
Кт, Кх, Км 11.8 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 1,25 м³</i>	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 усього часу вирощування контролюється та автоматично підтримується частота обертів, температура, рівень піни та рН, кожні 8 годин проводять мікроскопіювання	t = 30 °С; τ = 72 год; w = 300 об/хв; рН = 7,0; відсутність сторонньої мікробіоти; А = 3000 Од/мл

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Таблиця 9.1

Тип відходів	Назва відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Стадія виробництва	Клас небезпеки
Газоподібні	Відпрацьоване повітря з посівного апарату	діоксид Карбону, клітини бактерій	виращування посівного матеріалу	IV
	Відпрацьоване повітря з ферментера		виробничий біосинтез	IV
Рідкі	0,5%-ий розчин кальцинованої соди	карбонат натрію	миття обладнання	III
	0,5%-ий розчин каустичної соди	натрій гідроксид	миття обладнання	II
	0,15%-ий розчин «DivosanForte»	надоцтова кислота	миття обладнання	III
	0,1%-ий розчин «PROFI CHLOR»	натрієва сіль дихлорізаціанурової кислоти, адипінова кислота, бікарбонат натрію, карбонат натрію, сульфат натрію	Дезінфекція поверхонь	IV
	Супернатант після центрифугування культуральної рідини	залишки складових поживного середовища, залишки біомаси	подальші стадії виробництва	IV

					НУХТ БТЕК 04.02.42 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ		
Розроб.	Мезінова І.Р.						
Керівник.	Карлаш Ю.В.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Лім.	Арк.	Аркушів
						65	76
							65

Тверді	Пластикові тара для мийних засобів	ПЕ- поліетилен	санітарна підготовка виробництва	IV
	Пакувальні матеріалами для компонентів поживного середовища	ПП – поліпропілен		IV

9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

До складу рідких відходів входять біогенні елементи, що залишились в культуральній рідині. Очищення стічних вод від біогенних елементів є важливим та актуальним завданням, так як ці речовини - причина неочікуваних явищ. Видаляти біогенні елементи із стічних вод потрібно тому, що велика кількість таких елементів викликають процес евтрофікації водойм.

Евтрофікація – процес зростання біологічної рослинності водойм, який відбувається через перенасичення поживними речовинами. Супроводжується надмірним розвитком водоростей: синьо-зелених, діатомових, зелених, а також переважанням небажаних видів дрібних організмів, таких як планктон, порушенням життєдіяльності риб. Продукти метаболізму водоростей дають неприємний запах воді і можуть викликати у людей і тварин різноманітні алергічні реакції та шлунково-кишкові захворювання. При розкладанні водорості виділяють у воду поліпептиди, аміак та проміжні продукти розпаду білка. В воді відзначається вміст фенолів (канцерогенів), що значно перевищують гранично допустиму концентрацію.

Також видалення біогенних елементів потрібно при створенні оборотних і замкнутих систем водопостачання у промислових підприємствах. Наявність

сполук, таких як азот викликає біологічне обростання трубопроводів та колекторів чи іншого каналізаційного обладнання. Очистку таких стічних вод можна здійснювати за допомогою використання модульних установок типу БТ, які працюють з використанням біотенка. Стічна вода, що подається від насосної станції, у послідовному напрямку проходить три зони.

У зоні 1 забезпечується попереднє механічне очищення, ущільнення і стабілізація осаду, який періодично відкачують.

У зоні 2, яка обладнана системою аерації дріднобульбашкової та блоками плоскісного завантаження, здійснюються процеси біологічного очищення в аеробно-анаеробних умовах.

У зоні 3 відбувається відділення активного мулу в режимі тонкошарового відшаровування і транспортування в першу зону. Очищенна вода відводиться через усереднювальний лоток і знезаражуються через УФ-установку[46].

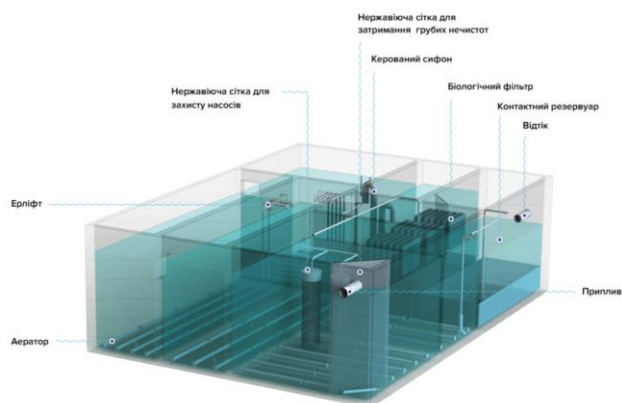


Рис.5. Очисна установка BIOTAL BT[49]

9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Твердими відходами на біотехнологічному підприємстві можуть бути:

- біомаса після виробничого біосинтезу;

Для переробки біомаси можуть застосовувати біомодифікацію – для поліпшення характеристик будівельних матеріалів при додаванні як сполучні

компоненти мікробну біомасу для підвищення міцності пластиків, гумо-технічних виробів, деревних матеріалів та інших відходів при їх вторинній переробці, а також компостування.

- пакувальні матеріали (пластикові пляшки, пакети, паперові коробки тощо).

Їх сортують в окремі контейнери з кришками для подальшої переробки та вторинному використанню[48].

9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Для знешкодження газоповітряних викидів пропонується використовувати за допомогою іонітового фільтру.

Газоочищення в цих апаратах проводиться шляхом проходження забруднюючого газу через шар іонітів високомолекулярних сполук, що мають просторову сітку з вуглеводних радикалів з фіксованими на ній катіоно- або аніонообмінними функціональними групами. При цьому відбувається комплекс сорбційних процесів. Іоніти періодично треба регенерувати промиванням водою або розчинами дешевих реагентів.

Найпоширенішими апаратами є іонітові фільтри, де полотно з іонітових волокон закріплено на вертикальних рамках, розділених порожніми каналами і розміщених у прямокутному корпусі, або (в установках безперервної дії) в секціях циліндричного ротору, що обертається навколо своєї вісі. При цьому частина полотен працює у режимі поглинання, а інша регенерації. Розроблено також апарати для поглинання домішок у псевдозрідженому шарі гранульованого іоніту з періодичною регенерацією лужними розчинами (рис.4).

Іонообмінні апарати здатні очищувати повітря від аерозолів, газів і парів з ефективністю до 98%[47].



Рис.6. Іонообмінний апарат з псевдозрідженим шаром іоніту[47]

9.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Кількість твердих відходів у вигляді пакувальних матеріалів невелика, тому зменшення їх кількості не доцільне.

Для миття обладнання обираємо систему СІР-мийки, яка значно скоротить витрати мийних розчинів та дозволить застосовувати розчини кальцинованої соди після проведення фільтрування повторно.

Для того, щоб зменшити кількість газоповітряних відходів, для сушіння протеази оберемо висушування у розпилювальній сушарці, через те, що тривалість висушування здійснюється швидко, в порівнянні з сублімаційним сушінням. Також для зменшення відпрацьованого повітря доцільно обирати сушильні установки з економною витратою повітря.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. M.R. Kanost, T.E. Clarke, in Comprehensive Molecular Insect Science, 2005.- Електронне джерело:

[Proteinase - an overview | ScienceDirect Topics](#)

2. O.P. Ward, in Comprehensive Biotechnology (Second Edition), 2011.- Електронне джерело:

[Proteinase - an overview | ScienceDirect Topics](#)

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. О.В. Мацелюх, А.С. Левішко, Л.Д. Варбанець/ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.- Мікробіол. журн., 2010, Т. 72, №4.

6. Ferenc Tóth/Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology.- Biomolecules 2013, 923-942.- Електронне джерело:

7. Brazilian Journal of Chemical Engineering/Jessika G./dos S. Aguilar Vol. 36, No. 02, pp. 615 - 625, April - June, 2019.

Електронне посилання: [dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180014](https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180014)

8. FENGCHEN GROUP CO., LTD.(Qingdao Fengchen Technology and Trade Co., Ltd.)/ Ферменти/Лужна протеаза.- Електронне посилання:

<http://ua.fengchengroup.net/enzymes-and-bio-products/enzymes/alkaline-protease-or-alkali-protease-powder.html>

9. American-Eurasian J. Agric. & Environ/Moussa Maaly Eid Salem. Sci., 16 (7): 1227-1236, 2016.- Електронне джерело:
DOI: 10.5829/idosi.aejaes.2016.16.7.10519
10. Department of Biochemistry, School of Sciences, Federal University of Technology, Akure, Nigeria/ Folasade M. Olajuyigbe/Vol.1, No.4, 112-120 (2013).- Електронне джерело:
<http://dx.doi.org/10.4236/aer.2013.14012>
11. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – ст: 102- 354
12. Oyuntogtokh.B, Byambasuren.M (2016) Mongolian Journal of Agricultural Sciences ¹⁷ (01): 31-35.
13. A. Sudha, P. Saravana Bhavan*,BACILLUS LICHENIFORMIS AS A PROBIOTIC BACTERIUM FOR CULTURE OF THE PRAWN MACROBRACHIUM ROSENBERGII/Department of Zoology, Bharathiar University, Coimbatore-641046, Tamil Nadu, India. DOI: 10.26479/2019.0504.05
14. Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer and William B. Whitman EDITORS, VOLUME THREE/BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes
15. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by Bacillus subtilis, Alcaligenes faecalis and Pseudomonas aeruginosa obtained from sea water samples - ScienceDirect
16. Yupeng Zhang/A New Mechanism of Carbon Metabolism and Acetic Acid Balance Regulated by CcpA.- 2023, 11(9), 2303.- Електронне джерело:

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11092303>

17. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [Електронний ресурс].- Електронне джерело:

https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00010

18. Біосинтез амінокислот [Електронний ресурс].- Електронне джерело:
https://studopedia.com.ua/1_8636_biosintez-amino-kislot.html

19. Citratecycle (TCAcycle).- Електронне джерело:

https://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?org_name=slx&mapno=00020&mapscale=&show_description=show

20. Карлаш Ю.В. Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: навчальний посібник для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Красінько В.О. - К: НУХТ, 2022.-373с.

21. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник.-К.: НУХТ, 2009.-336 с.

22. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001. – № 502.

23. Дівозан Форте (Divosan Forte) Lysoform/Промислова гігієна/DIVERSEY - ПРОФЕСІЙНІ МИЮЧІ ЗАСОБИ F&B/Дезінфікуючі засоби Diversey/Дівозан Форте (Divosan Forte).- Електронне джерело:

[Дівозан Форте \(Divosan Forte\): інструкція, опис | Лізоформ \(lysoform.ua\)](#)

24. Euromed/ Засіб дезінфікуючий «profi chlor».- Електронне джерело:

[Засіб дезінфікуючий «PROFI CHLOR» - купити за найкращою ціною в Києві від компанії "EuroMed24" - 1468316874](#)

25. Ukrstarline/Волокно базальтове.- Електронне джерело:

[Волокно базальтове 6970 - купити в UKRSTARLINE](#)

26. Airgroup/Гвинтовий компресор.- Електронне джерело:

[Гвинтовий компресор за ціною б/в | Гарантія 2 роки | тел: \(067\) 643-03-43 \(airgroup.com.ua\)](#)

27. ОПЕКС ЕНЕРГОСИСТЕМИ/Пластинчатый теплообмінник.-
Електронне джерело:

[▷ Пластинчатий теплообмінник THERMAKS PTA \(GC\)-12 【 OPEKS Energysystems 】](#)

28. ТИСК.UA/Ресивер вертикальний.- Електронне джерело:

[\[020936\] Ресивер Повітряний Лідер 10 бар 2700 к. с. PB2700.1200.01 для компресора | Компанія «ТИСК» \(tusk.ua\)](#)

29. Evolux/ Теплообмінник пластинчастий.- Електронне джерело:

[Теплообмінник пластинчастий ГФТА ТПС\(Р\) 19 купити в Києві, Україні – кращі ціни | EVOLUX ТПС\(Р\) 19](#)

30. Фільтруючі елементи ЕПМ.Ф.- Електронне джерело:

[Технофільтр | Мембранные фильтрующие элементы патронного типа ЭПМ.Ф \(technofilter.kiev.ua\)](#)

31. КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА/Реактор – змішувач лабораторный KFT 10.-
Електронне джерело:

[Реактор – гомогенизатор лабораторный KFT 10 \(V=10л\) \(kft2.com.ua\)](#)

32. ПП «БРОМ»/Фільтрполотно Петрянова ФПП-15-1,5.- Електронне джерело:

Фільтрполотно Петрянова ФПП-15-1,5 Фільтротканина, фільтруюче
полотно (brom.ua)

33. Sartorius/Biostat Cplus.- Електронне джерело:

Biostat B (sartorius-sd.com.ua)

34. КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА/Реактор –змішувач РС 70.- Електронне джерело:

Реактор для растворов объёмом 70л (kft2.com.ua)

35. Sartorius/Biostat D-DCU.- Електронне джерело:

Изготавливаемые под заказ биореакторы из нержавеющей стали (sartorius-sd.com.ua)

36. КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА/Реактор – змішувач РПМ 400.- Електронне джерело:

Реактор приготовитель РПМ 400 (kft2.com.ua)

37. Техноваги/ Ваговий дискретний дозатор-витратомір для сипких продуктів.- Електронне джерело:

Завод вагодозуючого обладнання "НВП "Техноваги" (technowagy.com.ua)

38. HimUkr/Насос перистальтичний.- Електронне джерело:

ПРОМЫШЛЕННЫЙ ПЕРИСТАЛЬТИЧЕСКИЙ НАСОС WG600S купить
(himukr.com.ua)

39. LPPgroup/Customized process-scale bioreactors / fermentors - I Series.- Електронне джерело:

Customized process-scale bioreactors / fermentors - I Series | LPP Group (lpp-group.com)

40. "ГК ЄВРОХІММАШ К.О." / Реактор-змішувач.- Електронне джерело:

[Апарати із змішуючим пристроєм \(euromash.kiev.ua\)](http://euromash.kiev.ua)

41. ХімМікс/ЛАБОРАТОРНИЙ РЕАКТОР 15 Л.- Електронне джерело:

[Лабораторний реактор 15 л: ціна, купити в Україні - ХімМікс \(khimmix.ua\)](http://khimmix.ua)

42. LPPgroup/Customized process-scale bioreactors / fermentors - I Series.-

Електронне джерело:

[Customized process-scale bioreactors / fermentors - I Series | LPP Group \(lpp-group.com\)](http://lpp-group.com)

43. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

44. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Лабор. практикум для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навчання /Уклад.: Л.М. Буценко, В.О.Красінько. – К.: НУХТ, 2011. – 82 с.

45. Estimation of Reducing Sugars by the Dinitro Salicylic Acid (DNS) Method. [Електронний ресурс]. Режим доступу:https://biocyclopedia.com/index/biotechnology_methods/biochemistry/estimation_of_reducing_sugars_by_the_dinitro_salicylic_acid_dns_method.php

46. Долина Л.Ф. Очистка стічних вод від біогенних елементів. – Дніпропетровськ.: Континент. 2011. - 198с.

47. Рижков С.С., Харитонов Ю.М., Благодатний В.В. Апарати для очищення повітря від забруднень. Методичні вказівки. Миколаїв: УДМТУ, 2002.-36 с.

48. Белінська А.П. Біоконверсія відходів: навчальний посібник для студентів денної та заочної форм навчання спеціальності 162 «Біотехнології та

біоінженерія» / А. П. Бєлінська, О. М. Близнюк, Н. Ю. Масалітіна, Л. С. Мироненко – Харків: НТУ «ХПІ», 2023. – 198 с.

49. BIOTAL/Одномодульні очисні установки залізобетонного виконання.- Електронне джерело:

<https://biotal.ua/produksiia/zalizobetonnoho-vykonannia/odnomodulni-zalizobetonnoho-vykona/>

50. Erasmus MC/*Bacillus Licheniformis*.- Електронне джерело:

<https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-positive-rods/cells-with-spores/facultative-anaerobic-1/lecithinase-negative/bacillus-licheniformis.html>