



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 «Біотехнологія»

(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

**З А В Д А Н Н Я**

**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Дзуман Дар'я Валентинівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи : Одержання пектинази культивуванням *Bacillus subtilis*

керівник роботи Пенчук Юрій Миколайович, к.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кс

2. Строк подання здобувачем роботи \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до роботи \_\_\_\_\_

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

5. Перелік графічного матеріалу \_\_\_\_\_

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.04.21-04.04.21	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	05.04.21-11.04.21	
3	Техніко-економічне обґрунтування	12.04.21-18.04.21	
4	Біосинтез цільового продукту	19.04.21-22.04.21	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	23.04.21-27.05.21	
6	Специфікація обладнання	28.04.21-31.04.21	
7	Опис технологічної схем	01.05.21-08.05.21	
8	Контроль виробництва	09.05.21-13.05.21	
9	Автоматизація ділянки виробництва	14.05.21-18.05.21	
10	Охорона довкілля	19.05.21-23.05.21	
11	Оформлення пояснювальної записки	24.05.21-28.05.21	
12	Виконання графічної частини проекту	01.05.21-25.05.21	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

Дзуман Д.В.  
(прізвище та ініціали)

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

Пенчук Ю.М.  
(прізвище та ініціали)

## РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячено розробці технології одержання пектинази при використанні в якості продуцента штаму *Bacillus subtilis* EFRL 01. В проекті розроблено технологічну та апаратурну схему біосинтезу пектинази продуцентом *Bacillus subtilis*, який за 90 годин синтезує фермент з активністю 2 700 Од/мл та 2 г/л біомаси. В розділі 3 (Техніко-економічне обґрунтування) було розглянуто створення консервних соків з використанням ферменту для інтенсифікації технологій їх виготовлення. За рахунок цього, методи застосування пектинази дають змогу створити безвідходні та екологічні виробництва соків в Україні.

Розробка та реалізація технології дає змогу здешевити ціну та екологічність кінцевого продукту. За кінцевими розрахунками, потужність виробництва ферменту пектинази становить 184 кг на рік для торгової марки «Біола». Технологічний процес складається з допоміжних стадій - приготування миючих та дезінфікуючих засобів: Divosan Forte VT6 та Дезоксін, підготовки аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ для 4 стадій підготовки посівного матеріалу та біосинтезу, та основних робіт (вирощування інокуляту: в колбах на качалці, у малому інокуляторі з геометричним об'ємом 12 л, інокуляторах 120 л та 1,2 м<sup>3</sup>, а також виробничий біосинтез у ферментері з номінальним об'ємом 12,5 м<sup>3</sup>).

Дипломний проект містить 143 сторінки друкованого тексту, містить 8 таблиць, 4 рисунки і складається з вступу, одинадцяти розділів, списку використаної літератури (85 джерела) та графічної частини (3 креслення формату А1).

**Ключові слова:** *Bacillus subtilis* EFRL 01, пектиназа, фермент, біомаса, активність, консервні соки.

## **ЗМІСТ**

### **ВСТУП**

### **РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту**

### **РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента**

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

**2.2. Розрахунок складу поживного середовища**

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

**2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

### **РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування**

**3.1. Потреба у цільовому продукті**

**3.2. Розрахунок потужності виробництва**

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

**3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**

### **РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту**

**4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента**

**4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

### **РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми**

**5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу**

**5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера**

**5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

**5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

**5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

**5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового**

**продукту**

**5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту**

**5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях**

**РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання**

**РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.**

**РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва**

**8.1. Карта постадійного контролю**

**8.2. Мікробіологічний контроль**

**8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

**8.3.1. Концентрація біомаси**

**8.3.2. Концентрація цільового продукту**

**8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту**

**РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва**

**РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля**

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

**10.1.1. Орієнтовний розрахунок об'ємів рідких відходів**

**10.1.2. Орієнтовний розрахунок об'ємів твердих відходів**

**10.1.3. Орієнтовний розрахунок об'ємів газоподібних відходів**

**10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва**

**10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів**

**10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів**

**10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів**

**10.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів**

**ЛІТЕРАТУРА**

## ВСТУП

Яблучний сік, як інші фруктові і овочеві соки є дієтичним продуктом, виробництво якого з кожним роком зростає. Сьогодні при виробництві соків з плодово-ягідної сировини важливим показником є соковіддача. Найчастіше на рівень соковіддачі впливають пектинові речовини сировини, які утворюють гелеподібну масу і утримують сік, перешкоджаючи його відділенню. Особливо складно отримати соки без м'якоті з сировини з високим вмістом пектину (слива, агрус, яблука, айва тощо) [1].

До складу колоїдних речовин, що обумовлюють каламутність соків, входять пектинові речовини, крохмаль, поліфенольні сполуки, білки та деякі інші. Пектинові речовини, що діють як колоїди для зважених часток, затримують їх випадання в осад і збільшують в'язкість соків. Тому при ферментативному освітленні соків можливе застосування пектолітичних ферментів, які діють на пектин.

У промисловості очищають соки різними способами [2]:

1. За допомогою авамарина, желатина, що передбачає обробку соку авамарином, желатином, які не забезпечують якісного освітлення фруктового соку.
2. Освітлення коагулянтном. Цей спосіб не забезпечує належного освітлення, оскільки використовуються коагулянти, які спонукають до коагуляції ряду компонентів, що становлять харчову цінність фруктових соків;
3. Фільтрування, сепарування, нагрівання. Недоліком такого способу є недосягнення належного ступеня прояснення фруктового соку.
4. Введення кристалічної затравки для попередження помутнінь продукту у процесі зберігання. Недоліком є неможливість видалення колоїдів. Не вирішується питання про подальше використання коагулянтів разом з осадженими частинками соків. Крім того, ці коагулянти коштовні, їх дозування суворо регламентується, так як неконтрольоване використання даних препаратів сприяє зниженню показника екологічної безпеки готового продукту [3].

					НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.					<b>Вступ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.								
Реценз.						Кафедра БТМ <sup>7</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.								

Також може використовуватись самоосвітлення соків. При самоосвітленні в сік не вводять сторонніх речовин, в зв'язку з чим він зберігає природні смакові якості. Недоліком цього методу є потреба в значних ємностях тари та складів для зберігання соку, необхідність консервації напівфабрикату. При самоосвітленні випадає невеликий осад, що ускладнює фільтрування. За обсягом випадає осад такий же, як і при інших методах освітлення. Наприклад, при самоосвітленні, крім дії ферментів, відбуваються хімічні реакції між дубильними та білковими речовинами соку, що призводять до седиментації. Тривалість процесу самоосвітлення залежить від хімічного складу соку. Він може тривати від декількох тижнів до декількох місяців. Іноді самоосвітлення взагалі не настає і сік освітлюють іншими методами.

При обробці глиною адсорбція зважених в соку часток супроводжується іонообмінними реакціями і перерозподілом зарядів колоїдних частинок соку.

Розщеплення ферментами пектинів дозволяє зруйнувати колоїдні системи, що зумовлюють стійкі, яких важко помутніння, завдяки цьому Пектиназа ефективно застосовується для освітлення соків і виноматеріалів. Для освітлення соків пектолітичні ферменти застосовують як самостійні освітлювачі або в суміші з іншими видами ферментів або освітлюючих речовин.

На сьогоднішній день промислові препарати пектиназ виробляють тільки з грибів. У той же час значне місце серед можливих продуцентів пектолітичних ферментів займають бактерії і серед них бактерії роду *Bacillus* [1, 2, 12]. Згідно з наявними літературними даними, хоча і досить суперечливим, бактерії *B. subtilis* мають виражену здатність синтезувати пектолітичних ферментів. Ці бактерії здатні продукувати обидва типи пектиназ: пектінестерази та полігалактурази.

**Актуальність.** На сьогоднішній день велика кількість пектолітичних ферментів закуповується за кордоном. На разі в нашій країні не реалізовані технології, які передбачають виробництво таких ферментів. Розробка та реалізація даної технології дозволить створити конкурентоспроможний продукт вітчизняного виробника, який буде характеризуватися належною якістю та зможе забезпечити внутрішній ринок [4].

**Новизною проекту** є використання продуцента *Bacillus subtilis* EFRL 01, який на середовищі складу, (г/л): глюкоза - 10, пептон - 5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 5,  $KH_2PO_4$  - 5,  $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,01 за 90 годин культивування дозволяє одержати 2700 Од/мл в культуральній рідині [4]. Така продуктивність є вищою, в порівнянні з *Aspergillus niger* NRC1ami, що за такий же час синтезує 109 Од/мл на середовищі складу, (г/л): пектин - 32,2,  $(NH_4)_2SO_4$  - 4,33,  $KH_2PO_4$  - 1,36,  $MgSO_4 \cdot 5H_2O$  - 0,05, KCl - 0,05 та  $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,1 [5].

## РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

**Пектиназа** (екзополігалактуронази, пектолаза) (ЕС 3.2.1.15) відноситься до групи ферментів, що каталізують деградацію пектину. Ці речовини зазвичай містяться в рослинах не у вільному вигляді, а у вигляді складного комплексу, відомого під назвою протопектину [3]. Типовими продуцентами пектинази є бактерії роду *Bacillus* (зокрема, *Bacillus subtilis* C4 та *Bacillus sp.* P-4-N). Крім типових продуцентів, до синтезу цього ферменту здатні мікроскопічні гриби, особливо різні види роду *Aspergillus* (*A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. terreus* та ін.). Серед бактерій знайдені активні продуценти пектиназ, що відносяться до роду *Clostridium* ; серед дріжджів культура – *Saccharomyces fragilis* [4].

Середня молекулярна маса екзополігалактуронази варіює в діапазоні (Да): 35000–79000 (продуцент *Bacillus subtilis* C4 [5]), 60000 – 70000 (продуцент *Bacillus sp.* P-4-N [6]), 34000 – 106000 (продуцент *Aspergillus niger* RBF96) [5].

Пектиназа характеризується високою ферментативною активністю в широкому діапазоні рН та температури. Так, пектиназа синтезована з *Bacillus sp.* P-4-N залишається стабільною в діапазоні рН 3,0 – 10,0, (оптимум – 9,0), з ізоелектричною точкою від 4,0 до 9,0. Фермент залишається стабільним при рН – 9 і при температурі 40 – 50 °С, упродовж 60 хв. А вже при підвищенні температури до 60 °С, упродовж 60 хв, при рН – 9 фермент втрачає 80% своєї активності.

Інгібіторами ферменту виступають такі катіони:  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  [6].

Полігалактуроназа (ПГ) здійснює гідролітичні розщеплення  $\alpha$ -1,4-глікозидних зв'язків в пектинових речовинах. ПГ є багатоконпонентною системою і проявляє велику специфічність до субстрату [6].

Виробником пектинази є завод ферментних препаратів ЕНЗИМ (м. Ладижин, Україна. Даний препарат представлений в двох препаративних формах ( рідка форма в пластмасовій каністрі – 1,5,20 л та тверда форма в пакеті Zip–Lock – 1кг) [8].

					НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Дзуман Д.В.				<b>РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Пенчук Ю.М.							
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							
						Кафедра БТМ 10		



а)

б)

в)

Рис. 1.1. Пектиназа в двох препаративних формах:

а) рідка форма в пластмасовій каністрі;

б) сухий порошок в пакеті Zip–Lock;

в) сухий порошок в банці [6].

Пектинові речовини утворюють гелеподібну масу і утримують сік, перешкоджаючи його відділенню. Особливо складно отримати соки без м'якоті з сировини з високим вмістом пектину (сливи, агрус, чорна смородина, айва тощо).

**Пектиназа** - ефективно застосовується для збільшення соковіддачі і поліпшення фільтрації при віджиманні, а також для освітлення соків і виноматеріалу [7].

Активність препарату в готовому препараті – 30 Од/г.

### ***Основні області застосування ферменту***

- Виробництво соків, фруктових пюре і желе.
- Виноробство і виробництво лікоро-горілчаних виробів.
- Виробництво кави та кавових концентратів.
- Отримання пектину з низьким вмістом метокси.

Пектолітичні ферменти широко використовуються в різних областях, таких як обробка волокон рослин, зброджування чаю та кави, очищення промислових стічних вод тощо [3]. У харчовій промисловості процес гідролізу пектинових речовин має велике значення для переробки плодів, ягід і овочів. Використання

пектолітичних ферментів дозволяє різко підвищити соковіддачу (на 5-25%) при виробництві освітлених соків, особливо з тих плодів і ягід, які не мають власних пектолаз і містять підвищені кількості пектину (слива, алича, абрикос, персик, груша та ін. ). При виготовленні фруктових напоїв з м'якоттю ферменти дозволяють зняти небажаний желеподібний ефект [8]. Також пектиназу використовують для біологічного знежирення текстилю та біологічного розпушування паперової промисловості, як ферментні коктейлі для виробництва кормів для тварин [6].

#### ***Особливості застосування [7]:***

- Дозування залежить від сировини і технологічного процесу. Середньозважена дозування 5-10 г на 100 л соку.

- Щоб збільшити соковіддачу препарат вноситься в віджатию макуха і відстоюється перед остаточним віджиманням.

- Робочий температурний діапазон: 20-60° С. Оптимальний діапазон дії 35-45 ° С.

- Робочий рН 3,0-5,0. Оптимальний діапазон дії рН 4,0-4,5.

Пектиназу слід додавати до початку ферментації, так як ферменти погано працюють в присутності алкоголю.

#### **На 5 кг фруктів.**

Потрібно розчинити 5 г Пектинази в 100 мл теплої води, додати до подрібненим фруктам, фрукти перемішати і гарненько почавити. Залишити отриману масу мінімум на 6-12 годин, потім відокремити сік через прес і підготувати для подальшої ферментації.

#### **На 5 л соку з м'якоттю.**

Додати 5 г Пектинази безпосередньо до м'якоті, залишити на дві години при 50-55 ° С, потім можна готувати сусло для основного бродіння.

Якщо фрукти або сік попередньо нагрівалися або кип'ятилися, то дозування Пектинази збільшується вдвічі (10 г Пектинази на 5 кг фруктів або 5 л соку з м'якоттю після їх остудженому).

Зберігати в холодильнику в свіжому вигляді, використовувати в плинні 6

місяців, після терміну придатності замінити, так як старі ферменти не працюють.

**Увага!** Необхідно обережно працювати з препаратом, не рекомендується вдихати пил, що виділяється при внесенні ферменту, уникати потрапляння препарату на шкіру, очі. При попаданні промити ушкоджену ділянку водою.

#### ***Умови зберігання***

Зберігати при температурі від  $-25^{\circ}\text{C}$  до  $+20^{\circ}\text{C}$  в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці.

## РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

### 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища

#### для його культивування

Велика кількість бактеріальних штамів, в основному *Bacillus subtilis*, *Bacillus* spp., дріжджі (*Yarrowia lipolytica* та *Saccharomyces cerevisiae*), і багато ниткоподібних грибів, таких як *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*, *Trichoderma viridiae*, *T. virens*, *Penicillium griseoroseum* є потенційними виробниками пектинази [1].

У таблиці 2.1 наведено порівняння мікроорганізмів, які продукують пектиназу.

Незважаючи на те, що штам *Bacillus* spp. Y1 вирощувався на відходах виробництва, що є дешевим і доступним субстратом, активність фермента у порівнянні зі штамом *Bacillus subtilis* EFRL 01 є дуже низькою (80 Од/мл) [4, 10].

Щодо такого продуцента пектинази як *Aspergillus niger* NRC1ami, згідно літературних даних ферментне виробництво бактеріальних штамів завжди переважає над виробництвом грибних штамів через легкість проходження ферментативних процесів та підвищення кількості продукту [9].

Порівнюючи такі штами як *Bacillus* sp. ZJ1407 (110 Од/мл) та *Aspergillus niger* NRC1ami (109 Од/мл), можна сказати, що їх ферментативна активність майже не відрізняється. Проте час культивування штаму *Bacillus* sp. ZJ1407 менший на 30 год від часу культивування штаму *Aspergillus niger* NRC1ami, що надає йому переваг.

З усього вище сказаного можна дійти висновку, що *Bacillus* sp. ZJ1407 є кращим продуцентом пектинази [10].

Якщо у *Bacillus subtilis* EFRL 01 активність ферменту якого становить 2700 Од/мл, а у *Bacillus* sp. ZJ1407 активність ферменту - 110 Од/мл, навіть, якщо ми збільшимо його час культивування, то не зможемо отримати таку ж саму активність ферменту як у *Bacillus subtilis* EFRL 01 [6].

НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Дзуман Д.В.						
Перевір.	Пенчук Ю.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Пирог Т.П.						
<b>РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</b>					Літ.	Арк.	Акрушів
					Кафедра БТМ 14		

Отже, порівнявши декілька продуцентів пектинази можна дійти висновку, що найбільш доцільно буде обрати як біологічного агента *Bacillus subtilis* EFRL 01, оскільки йому притаманна найвища ферментативна активність (2700 Од/мл) [4].

*Bacillus subtilis* EFRL 01 був виділений із зразків ґрунту, зібраних в Інституті хімії Університету Сінд, Джамшоро, Пакистан [4].

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

## Порівняльна характеристика продуцентів пектинази

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Активність ферменту, од/мл	Умови культивування	Література
<i>Bacillus subtilis</i> EFRL 01	Глюкоза – 10; Пептон – 5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 5; $KH_2PO_4$ – 5 $Fe_2SO_4 \times 7H_2O$ – 0,01	2700	pH 7,0, 90 год, 37°C	Qureshi A.S.. Production of pectinase by <i>Bacillus subtilis</i> EFRL 01 in a date syrup medium. <i>Academic Journals</i> .2012, 11(62).DOI: 10.5897/AJB11.4236
<i>Bacillus sp.</i> Y1	Крохмаль – 3,8; Висівки пшениці – 4,2; Сахароза – 2,5; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,37; $MgSO_4$ – 0,3	80	pH 8,2, 60 год, 34°C	F Guo., Li X., Zhao J., Li G., Gao P., X.Han., Optimizing Culture Conditions by Statistical Approach to Enhance Production of Pectinase from <i>Bacillus sp.</i> Y1. <i>BioMed Research International</i> .2019, 10 pages. doi.org/10.1155/2019/8146948
<i>Bacillus sp.</i> ZJ1407	Лактоза – 44,8; Триптон – 30,9; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,35; $MnSO_4 \times H_2O$ – 0,2; $MgSO_4$ – 0,4; $NaCl$ – 3,5	110	pH 5, 48 год, 37°C	Yu P., Xu C., Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from <i>Bacillus sp.</i> ZJ1407. <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> . 2017, 31 pages. doi:org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.012
<i>Aspergillus niger</i> NRC1ami	Пектин – 32,22; $(NH_4)_2SO_4$ – 4,33; $KH_2PO_4$ – 1,36; $MgSO_4 \times 5H_2O$ – 0,05; $KCl$ – 0,05; $Fe_2SO_4 \times 5H_2O$ – 0,10	109	pH 5,5, 90 год, 30°C	Enshasy H., Elsayed E., Suhaimi N., Malek R., Esawy M., Bioprocess optimization for pectinase production using <i>Aspergillus niger</i> in a submerged cultivation system. <i>El Enshasy et al. BMC Biotechnology</i> .2018,13 pages. doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування  
продуцентів пектинази**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus subtilis</i> EFRL 01	Глюкоза – 10	20	0,2	2
	Пептон – 5	200	1	6
	$MgSO_4 \times 7H_2O$ – 5	13	0,065	4
	$KH_2PO_4$ – 5	120	0,6	1
	$Fe_2SO_4 \times 7H_2O$ – 0,01	3	0,00003	5
Вартість 1 л середовища – 1,86 грн				
<i>Bacillus sp.</i> Y1	Крохмаль – 3,8	30	0,114	13
	Висівки пшениці – 4,2	70	0,294	12
	Сахароза – 2,5	80	0,2	8
	$(NH_4)_2SO_4$ – 0,37	17	0,0062	7
	$MgSO_4$ – 0,3	13	0,0039	4
Вартість 1 л середовища – 0,61 грн				
<i>Bacillus sp.</i> ZJ1407	Лактоза – 44,8	80	3,584	3
	Триптон – 30,9	4 980	153,882	2
	$(NH_4)_2SO_4$ – 1,35	17	0,022	3
	$MnSO_4 \times H_2O$ – 0,2	21,90	0,004	11
	$MgSO_4$ – 0,4	13	0,0052	4
	$NaCl$ – 3,5	46	0,161	14
Вартість 1 л середовища – 157,65 грн				
<i>Aspergillus niger</i> NRC1ami	Пектин – 32,22	590	19,0098	9
	$(NH_4)_2SO_4$ – 4,33	17	0,073	3
	$KH_2PO_4$ – 1,36	120	0,1632	1
	$MgSO_4 \times 5H_2O$ – 0,05	13	0,00065	4
	$KCl$ – 0,05	100	0,005	10
	$Fe_2SO_4 \times 5H_2O$ – 0,10	3	0,0003	5
Вартість 1 л середовища – 19,25 грн				

- [https://selitra.biz/p194784476-digidroortofosfat-kaliya.html?gclid=CjwKCAjwtdFBhBAEiwAKOIy5y\\_ltXL3Gd7HwORJytrnOOSb2UI3b7XpPvGjlpYL-U3sXQCEQtKZ4xoCXcQQAvD\\_BwE](https://selitra.biz/p194784476-digidroortofosfat-kaliya.html?gclid=CjwKCAjwtdFBhBAEiwAKOIy5y_ltXL3Gd7HwORJytrnOOSb2UI3b7XpPvGjlpYL-U3sXQCEQtKZ4xoCXcQQAvD_BwE)
- [https://all-him.com.ua/p/2165274-glyukoza/?gclid=CjwKCAjwtdFBhBAEiwAKOIy5wYRIOSW0tok1q6esXs2RReMjNr4CNXnKQIbg-Roo5QexIcdtOjnMRoC10MQAvD\\_BwE](https://all-him.com.ua/p/2165274-glyukoza/?gclid=CjwKCAjwtdFBhBAEiwAKOIy5wYRIOSW0tok1q6esXs2RReMjNr4CNXnKQIbg-Roo5QexIcdtOjnMRoC10MQAvD_BwE)
- <https://flagma.ua/uk/laktoza-so250715-1.html>
- <https://fermercenter.com/sulfat-magniia-25kg->
- <https://kiev.flagma.ua/uk/sulfat-zheleza-so426485-1.html>
- <https://prom.ua/p1310539257-pepton-schelochnoj-025.html?>
- <https://flagma.ua/uk/sulfat-ammoniya-so231240-1.html?price=0>

8. <https://www.systopt.com.ua/item-saharoza>
9. [https://pischevik.in.ua/pektin-jablochnyj-tm-andre-pectin-kitaj-ves-1-kg?gclid=cjwkcawtdefbhbaeiwakoiy5\\_nao5qxxlajwqkjnarkdxrcud0ehbckkxflwtwknbok9szkluabrocsekqavd\\_bwe](https://pischevik.in.ua/pektin-jablochnyj-tm-andre-pectin-kitaj-ves-1-kg?gclid=cjwkcawtdefbhbaeiwakoiy5_nao5qxxlajwqkjnarkdxrcud0ehbckkxflwtwknbok9szkluabrocsekqavd_bwe)
10. [https://imetalua.com/potassium\\_chloride/](https://imetalua.com/potassium_chloride/)
11. <https://prom.ua/p1276893643-marganets-ternokislyj-fasovka.html?&primelead=My4z>
12. <https://chernovcy.flagma.ua/uk/visivki-pshenichni-otrubi-pshenichnye-o5153813.html>
13. <https://prom.ua/p1002638122-krahmal-kartofelnyj.html?&primelead=MC42NA>
14. <https://www.helicon.ru/catalog/reagenty/obshchelaboratornye-reaktivy/natriy-khlorid/?q=H-1418-1.0>

**\*Примітка 1** Ціни на компоненти поживних середовищ взяті з українських промислових інтернет магазинів, станом на 2021 рік.

За даними наведеними у табл. 2.2 можна зробити висновок, що середовище для культивування *Bacillus subtilis* EFRL 01 не є найдешевшим. Порівняно з іншими продуцентами кильтивування саме *Bacillus subtilis* EFRL 01 має найбільший вихід цільового продукту і його економічно вигідно використовувати на виробництві, незважаючи на найдешевше середовище культивування *Bacillus sp.* Y1, однак вихід цільового продукту найнижчий. Але для того, щоб остаточно обрати біологічний агент на третьому етапі розрахували умовну вартість одиниці активності пектинази та врахували тривалість культивування всіх продуцентів (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

#### Умовна вартість одиниці активності пектинази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Ферментатив на активність, од/мл	Умовна вартість одиниці активності, грн./од	Тривалість культивування, год	Активність ферменту, одержана за год, од/год
<i>Bacillus subtilis</i> EFRL 01	1,86	2700	0,00068	90	30
<i>Bacillus sp.</i> Y1	0,61	80	0,0076	60	1,33
<i>Bacillus sp.</i> ZJ1407	167,65	110	1,52	48	2,29
<i>Aspergillus niger</i> NRC1ami	19,25	109	0,176	90	1,21

Узагальнивши усі дані, можна зробити висновок, що доцільніше використовувати для одержання ферменту пектинази *Bacillus subtilis* EFRL 01, так як умовна вартість одиниці активності пектинази є найменшою серед

усіх продуцентів, а ферментативна активності між продуцентами є значною.

Вартість середовища для культивування *Bacillus sp.* Y1 є найдешевшим серед усіх, але не дивлячись на це ферментативна активність значно менша за всі інші продуценти, тому це ще раз доводить, що для біосинтезу пектинази доцільніше використовувати *Bacillus subtilis* EFRL 01, оскільки умовна вартість одиниці активності ферменту найнижча серед усіх продуцентів та активність ферменту одержаного за годину є найвищою.

## 2.2. Розрахунок складу поживного середовища

### *Bacillus subtilis* EFRL 01

Поживне середовище, г/л:

- Глюкоза – 10;
- Пептон – 5;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 5;
- $KH_2PO_4$  – 5;
- $Fe_2SO_4$  – 0,01

Пектиназа – 2700 од/мл

Біомаса – 2 г/л (беремо умовно, оскільки в патенті не дається вихід біомаси, а лише концентрація цільового продукту)

Оскільки точної формули пектинази немає було прийняте рішення розраховувати кількість вуглецю та азоту за амінокислотою аланін.

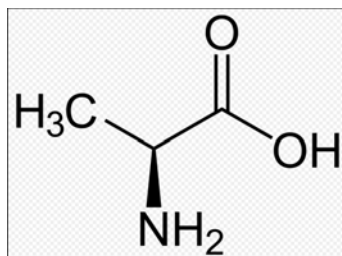


Рис. 2.1. Хімічна формула аланіну

Відповідно ми матимемо брутто формулу (молекулярну формулу:  $C_3H_7NO_2$

$$Mr(C_3H_7NO_2) = (12 \times 3) + (1 \times 7) + 7 + (16 \times 2) = 61$$

### 1. Глюкоза - $C_6H_{12}O_6$

За пропорцією визначаємо яка кількість карбону міститься в 10 г ГЛЮКОЗИ

$$10 \text{ г} - 180 \text{ г/моль}$$

$$X - 12 \times 6 \text{ г/моль}$$

$$X = 4 \text{ г карбону в 10 г глюкози}$$

За аналогією визначаємо скільки карбону міститься в аланіні

$$1 \text{ г} - 61 \text{ г/моль}$$

$$X - 12 \times 3 \text{ г/моль}$$

$$X = 0,6 \text{ г карбону міститься в 1 грамах Аланіну}$$

**Для синтезу 2 г біомаси та 1 г аланіну потрібно щоб в поживному середовищі було  $0,6+2=2,6$  г.**

Далі ми аналогічно робимо обчислення нітрогену.

Точної формули пептону немає, але відомо що він містить 20% азоту, отже в 5 грамах пептону міститься 1 г азоту

За пропорцією визначаємо скільки нітрогену міститься в аланіні

$$0,5 \text{ г} - 61 \text{ г/моль}$$

$$X - 7 \text{ г/моль}$$

$$X = 0,05 \text{ г нітрогену міститься в 0,5 грамах Аланіну}$$

### ***Розрахуємо кількість азоту для біомаси***

Так як в біомасі міститься лише 10% нітрогену, тоді  $2 \times 0,1 = 0,2$

Виходячи з даних результатів розрахунків можна сказати те, що в середовищі вистачає джерела азоту та вуглецю.

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

Клітини паличкоподібні, прямі або злегка зігнуті, розташовані окремо, інколи попарно. Розміри: ширина 0,7–0,8, довжина 2–3 мкм. Формують ендоспори, але не більше, ніж одна клітина. Спори еліпсоїдної форми, розташовані центрально або субтермінально. Дуже стійкі до багатьох

несприятливих умов – нагрівання, радіації, дезінфікуючих засобів і висушування [16].

Грампозитивні. Муреїнові ланцюги зв'язуються за допомогою пептидного зв'язку, що формується між мезо-діамінопімеліною кислотою у позиції 3 однієї субодиниці та D-аланіном у позиції 4 сусідньої субодиниці [13]. У клітинній стінці також присутні тейхоєві та тейхуронові кислоти.

Капсулу не утворюють, хоча у геномній послідовності виявлені гени, відповідальні за її синтез [14]. Рухливі, мають джгутики [15]. Діляться простим бінарним поділом з утворенням поперечної перегородки.

Колонії неправильної форми, мають середній діаметр 2-4 мм. Характер поверхні коливається в широкому діапазоні – від вологих і гладеньких або мукоїдних (з хвилястими бахромчатыми краями, до грубих і твердих на вигляд під час висихання. Колір варіює від кремового до коричневого [16]. Прямі палички, 0,5-0,25x1,2-10 мкм, з закругленими або „обрубаними” кінцями, часто в парах або ланцюгах. Палички довгі, тонкі, мають овальні спори, що розташовані ближче до центру клітини.

Грампозитивні. Рухомі за рахунок перетрихціальних джгутиків. Ендоспори овальні іноді сферичні або циліндричні, стійкі до багатьох негативних впливів. В клітині утворюється не більше однієї спори. Спори пророщуються поперечно без розриву мембрани. Споруляція не пригнічується в атмосфері повітря.

Аероби, відношення до підвищеної температури, рН сильно варіюється. Хемоорганотрофи; метаболізм бродильного або дихального типу. Зазвичай каталазопозитивні. Мають широкий спектр місць виявлення; деякі види патогенні для хребетних або безхребетних. Типовий вид *B. subtilis*.

Диференціація видів роду *Bacillus*: диференціація видів представляє складності через їх велику кількість, та неповне описання нещодавно опублікованих видів.

На агаризованому поживному середовищі бактерії утворюють жовтуваті зморщені колонії. Бактерії відносять до облігатних аеробів.

При внесенні на МПБ культура утворює на поверхні тонку складчасту плівку, помутніння в центрі бульйону не відбувається.

Розмножується *Bacillus subtilis* бінарним поділом клітини. Іноді окремі бацили, після поперечного поділу, залишаються з'єднаними в нитки. Клітини бактерії можуть утворювати спори, але спороутворення у них не є способом розмноження. Процес спороутворення вивчений у цього організму досить докладно та полягає в наступному: протопласт клітини стає поступово зернистим, а потім в середині його з'являється кругле зернятко, яке все сильніше розростається і стає більш різко окресленим до тих пір, поки не досягне остаточних розмірів спори. Тоді це протоплазматичне зернятко виділяє на своїй поверхні дуже щільну оболонку, а до цього часу оболонка материнської клітини стає погано помітною і нарешті зовсім руйнується. У представників, з'єднаних в нитки, спороутворення може відбуватися в кожній з клітин нитки. Спора має або круглу, або злегка еліптичну форму. Вона дуже стійка по відношенню до різних зовнішніх факторів.

Добре ростуть на стандартному поживному агарі, соєвому та кров'яному агарі. Метаболізують більшість моноцукрів та полісахаридів. У клітинах виявлені фосфотрансферазні системи для транспорту вуглецевих субстратів із зовнішнього середовища. Здатні використовувати цитрат як єдине джерело вуглецю. Як джерело азоту можуть використовувати солі амонію, нітрати, деякі пурини, сечовину, сечову кислоту, алантоїн та амінокислоти [16, 15]. Для транспорту заліза в клітину використовують сидерофори.

Оптимальна температура росту 28-30 °С, мінімум 5-20 °С, максимум 45-55 °С. Діапазон рН – від 5,5 до 8,5. Росте за концентрації NaCl до 10%. Аероби, термінальний акцептор електронів – кисень. Можуть рости в анаеробних умовах, використовуючи нітратне дихання. Наявні каталаза та оксидаза. З глюкози та ряду інших вуглеводів продукують кислоту без виділення газу [16].

Чутливі до пеніцилінів, цефалоспоринів, хлорамфеніколу та

ванкоміцину.

#### **2.4. Таксономічний статус біологічного агента**

Згідно першого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій:

Царство – *Procaryotae*

Відділ – *Firmicutes*

Клас – *Firmibacteria*

Група 18

Родина – *Bacillaceae*

Рід – *Bacillus*

Згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій:

Царство – *Bacteria*

Відділ – *Firmicutes*

Клас – *Bacilli*

Порядок – *Bacillales*

Родина – *Bacillaceae*

Рід – *Bacillus*

## РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Пектинові ферменти знаходять різне застосування у плодоовочевій промисловості, освітленні фруктових соків, освітленні вина, видобутку оливкової олії, консервації деревини, текстильній промисловості тощо. Ферменти обов'язково діють одним або кількома з наступних способів:

- зменшення в'язкості концентратів;
- видалення клітин з рослинного матеріалу, що збільшує вихід соку і твердих речовин;
- модифікуючи та розчиняючи пектинові структури, щоб впливати на осідання освітлення соків [17].

В структурі харчування людини повинні переважати овочі та фрукти, що вважаються основними джерелами мікро- та макроелементів, вітамінів, пектинів та ін. Високий вміст таких важливих компонентів присутній в соках, що виготовляються з плодів різних видів ягід та кісточкових фруктів. Біологічна цінність соків полягає ще і в тому, що вони сприяють більш повній засвоюваності жирів, білків, цукрів, які надходять в організм людини з іншими продуктами. Але фрукти та овочі дуже багаті на природні пектини, що істотно знижує вихід соку. Тому значення біотехнології зростає і в розвитку виробничої сфери традиційні методи отримання різних продуктів замінюються біотехнологічними.

При переробці плодів та овочів ці методи пов'язані насамперед із застосуванням ферментів, в нашому випадку – пектинази [18]. У зв'язку з цим постає питання створення безвідходних та екологічних технологій виробництва соків. Для чого в першу чергу необхідно зменшити відходів виробництва.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дзуман Д.В.			<b>РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						<b>Кафедра БТМ<sub>24</sub></b>		

Щорічно в консервній галузі України та країн СНД утворюється близько 275 тис. тон фруктових вичавок з яких на промислову переробку використовується лише 5% [19].

Одним з ефективних методів отримання соку з різних фруктів і ягід на сьогоднішній день – метод дифузії. Недоліком цього способу є установка додаткового обладнання для дифузії (що збільшить втрати на виробництво), а якість соків за рахунок їх розведення приведе до зменшення вмісту сухих речовин на 2%. Але вирішення цієї проблеми є, – це використання ферментних препаратів мікробного походження. Саме застосування пектиназ під час створення соків, не тільки покращує якість такої продукції, а ще й підвищує їх енергетичну цінність та полегшує процес виробництва. Тому на сьогодні більш поширеним методом отримання соку з плодово-ягідної сировини є використання ферментів [20].

При ферментації сировини для досягнення необхідного ефекту в першу чергу необхідно гідролізувати прямолінійні ділянки молекул пектину. З цією метою слід вибирати препарати з високою активністю, що застосовуються для освітлення соків і придатні для обробки мезги [21].

Пектинові речовини знаходяться в плодах у вигляді нерозчинного у воді протопектину і розчинного пектину. Протопектин входить до складу клітинних стінок рослинної тканини і основний вплив на процес соковіддачі надає розчинний пектин, що володіє водоутримуючою здатністю підвищувати в'язкість соку і перешкоджати його витіканню. Тому при обробці мезги ферментами необхідно перш за все зруйнувати нерозчинний протопектин, але тільки частково так щоб відокремити клітини одна від одної та частково зруйнувати її стінки для підвищення клітинної проникності.

При обробці рослинної сировини, клітинна проникність збільшується і протоплазма мембрани розриваються і вихід соку значно полегшується. Ферментна обробка підвищує ефективність пресування та екстракції соку і навіть посилює смак та виділення кольору, особливо під час безперервних операцій пресування. Використовуючи як целюлази, так і пектинази, вартість

переробки фруктів знижується через синергетичний ефект цих ферментів. Синергетичний ефект є незмінним під час зрідження, як показано у випадку з м'якоттю яблук, коли в'язкість перемішуваної м'якоті падає швидше під час обробки сумішшю пектиназних та целюлазних ферментних препаратів, ніж будь-яка з них окремо (вивільняє 80% полісахаридів) [22].

Ринок України по виготовленню соків та соковмісних напоїв дуже широкий, що сприяє постійному оновленню асортименту своєї продукції, що пов'язано із намаганнями виробників утримувати, а то й наростити свої позиції на ринку.

Сьогодні на українському ринку соків спостерігається висока конкуренція, виробництвом займаються майже 400 підприємств, 20 з яких добре відомі 9 українським споживачам. Лідерами продажів є 5 великих компаній: «Sandora», «Ерлан», «Vitmark», «Coca-cola» та «T.V.Fruit» [23].

Головними бренди по виготовленню соків та соковмісних напоїв на сьогодні є «Садочок» (станом на 2018 рік займає 29,7 % ринку України), «Наш Сік» (23,9 % ринку) та «Sandora» - становить 18,2 %, «Біола» - 1,5 % [24, 25]. Отже, розрахунок потужності виробництва буде розраховано по річному виготовленню соків одного бренду («Біола) для 3 найбільш популярних смаків українського споживача. І це – апельсиновий, яблучний та мультифруктовий.

Стандартне дозування ферментного препарату залежить від сировини та технологій виготовлення. Особливості застосування [26]:

- Дозування залежить від сировини і технологічного процесу. Середньозважена доза 0,5-1 г препарату з активністю 30 од/г на 10 л соку.
- Щоб збільшити соковіддачу, препарат вноситься у віджату макуху і відстоюється перед остаточним віджиманням.
- Робочий температурний діапазон: 20-40°C. Оптимальний діапазон температурної дії 28-32°C.
- Робоче значення рН 3,0-5,0. Оптимальний діапазон лужно-кислотної дії рН 4,0 - 4,5.

*На 5 кг фруктів.*

Потрібно розчинити 5 г Пектинази в 100 мл теплої води, додати до подрібнених фруктів, перемішати і гарно почавити. Залишити отриману масу мінімум на 6-12 годин, потім відокремити сік через прес і підготувати для подальшої ферментації.

*На 5 л соку з м'якоттю.*

Додати 5 г Пектинази безпосередньо до м'якоті, залишити на дві години при температурі 50-55°C, потім можна готувати сусло для основного бродіння. За цими даними, для виготовлення соків середнє значення ферменту становить 5 г на 5 кг фруктової сировини. 10 Проаналізувавши літературні дані, для яблучних соків необхідне дозування має стандартне значення. Помаранчевий пектин в цитрусових, ананасових та мультифруктових соків утворює небажане випадіння частинок сформованого пектату кальцію, тому за технологією перед обробкою ферментним препаратом, фрукти або сік попередньо нагрівають/кип'ятять. Наслідком є підвищення дозування Пектинази вдвічі (10 г Пектинази на 5 кг фруктів або 5 л соку з м'якоттю після їх охолодження) [27].

Дані підрозділу 3.1. (Потреба у цільовому продукті) наводимо у вигляді узагальнюючої таблиці.

За даними таблиці 3.1. потреба в пектиназі становить – 1840 кг в рік, для виробництв соків та соковмісних напоїв. Важливість цієї теми в тому, що кількість виробництв пектинази та ферментних препаратів в Україні не достатньо велика і не може постачати всі ніші спеціалізованих виробництв.

## Вихідні дані для розрахунку річної потреби пектинази

Бренд соку	Смаки соків бренду «Біола»	Кількість пектинази на 1 кг фруктів, г	Кількість фруктів на 1 л соку, кг	Кількість пектинази на 1 л соку, г	Кількість літрів соку виготовлених в рік (станом на 2021 р.), л	Загальна кількість пектинази на 1 рік, кг
«Біола»	Апельсиновий	2*	2,3* <sup>2</sup>	4,6* <sup>3</sup>	194 130* <sup>4</sup>	893
	Яблучний	1	1,4	1,4	495 343	693
	Мультифруктовий	2	0,72	1,4	181 626	254
Всього:						1840 кг

Примітка:

\*розрахунок кількості пектинази на 1 кг фруктів: стандартна доза пектинази на 5 кг фруктів становить 5 г. За технологіє апельсиновий, мультифруктовий та ананасовий сік підігривають, і як наслідок маса ферментного препарату збільшується вдвічі – 10 г на 5 кг. Розрахувавши пропорцію  $10 \cdot 1/5$  ми дізнаємося скільки необхідно ферменту для 1 кг фруктів;

\*<sup>2</sup> за літературними даними кількість фруктів для виготовлення апельсинового соку становить 2,3 кг на 1 л соку, для кожного виду об'єм різний. Значення наведені в таблиці;

\*<sup>3</sup> розрахунок пектинази на 1 л соку: на 1 кг фруктів необхідно 2 г пектинази, то на 2,3 кг фруктів за пропорцією –  $2,3 \cdot 2/1 = 4,6$  г ферментного препарату;

\*<sup>4</sup> за статистичними даними загальний об'єм виробництва соків становить – 110 076 257 л, з яких 1,5% припадає на соки «Біола» (за пропорцією  $110\ 076\ 257 \cdot 1,5/100 = 1\ 651\ 144$  л). Відсоткове значення за смаками: апельсиновий – 36%, яблучний – 30%, мультифруктовий – 11%. Тобто також за пропорцією визначаємо загальну кількість виготовлених соків в залежності від смаку –  $1\ 651\ 144 \cdot 36/100$  (апельсиновий), розрахувавши отримаємо 594 442 л соку апельсинового, що виробляється компанією «Біола» в рік.

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва

На сьогоднішній день асортимент ферментних препаратів «Пектиназа» в Україні формується за рахунок вітчизняного виробництва – «Пектолад (Pectinase)» Ладизинського заводу ферментних препаратів «Ензим» (Україна) та імпортованої продукції – Англія, Китай, яка має високу ціну (європейські препарати) і низьку доступність. А китайські аналоги характеризуються не належною якістю, ферментні препарати не задовольняють чистотою продукції та необхідною активністю [14].

Проаналізувавши літературу, статистичних даних по виробництву

пектинази в Україні немає, тому орієнтуватися в подальшому ми будемо на теоретичних знаннях. Але з точністю можна сказати, що на сьогодні кількість виробників та продукції не задовольняє ринок України, адже пектиназа широко застосовується в харчовій промисловості. Отже, промисловий ринок не дає даних про поставку ферменту в Україну, але з точністю можна сказати, що 30-40 % (в середньому беремо 35 %) пектинази експортують з країн Європи та Китаю. Також важливо сказати, що деякі виробництва соків використовують спеціальні комплексні препарати – Pectinex BE XXL, Pectinex Ultra, що займають приблизно 15 % (вони вважаються дорогими та важко доступними) [15, 16].

Проаналізувавши дані, в подальших розрахунках ми будемо постачати ферментний препарат «Пектиназа» на 10 % від потреби населення. Адже, в Україні присутнє власне виробництво. І тому ми приймемо, що для забезпечення виробництв спеціалізованих на консервних продуктах, а саме соках в Україні, кількість пектинази в рік повинна дорівнювати - 184 кг.

Кількість культуральної рідини, необхідно для отримання 184 кг (184 000 г) пектинази становить:

$$1 \text{ г} - 1 \text{ л};$$

$$184 \text{ 000 г} - x;$$

$$X = 184 \text{ 000 л культуральної рідини}$$

Враховуючи сумарні витрати цільового продукту при виділенні (30%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр.}} = 184 \text{ 000} / (1 - (0,3)) = 262 \text{ 857 л}$$

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

Для повного забезпечення виробництв соків ферментним препаратом пектинази, потрібно одержати (з урахування втрат для виділення) 262,9 м<sup>3</sup> культуральної рідини (див. підрозділ 3.2.).

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

матеріалу. Тому, приймаємо кількість трудоднів – 180, тоді кількість продукту за добу становить:

$$V_d = V_{гп} / T_{тр} = 262,9/180 = 1,4 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф})/24 = (1,1 \cdot 1,4 \cdot 100)/24 = 6,4 \text{ м}^3 / \text{цикл}, \text{ де}$$

$T_{цф}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (90 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год).

$K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

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

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

$$V_{г} = V_{цк} / K_{зап} = 6,4/0,6 = 10,6 \text{ м}^3 .$$

Обираємо за таблицею ферментер з геометричним об'ємом  $12,5 \text{ м}^3$  .

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**

За виробничий цикл отримують  $V_{кр} = 6,4 \text{ м}^3$  культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 - 15%.

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

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 6,4/(1-0,1) = 7 \text{ м}^3 , \text{ де}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1} = 7 \text{ м}^3$ .

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,6$  розраховують

можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_f$ ), що становить  $V_f = V_{роб.1}/K_{зап} = 7/0,6 = 11,7 \text{ м}^3$ .

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер  $V_{сф} = 12,5 \text{ м}^3$ , та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.  $K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 7/12 = 0,58$ .

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно. Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+X_f) = 7/(1+0,1) = 6,4 \text{ м}^3, \text{ де}$$

$X_f = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 7 - 6,4 = 0,6 \text{ м}^3.$$

Для одержання 600 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 600/(1-0,1) = 667 \text{ л.}$$

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

$$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{па}) = 667/(1+0,1) = 606 \text{ л, де}$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 667 - 606 = 61 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{роб.2} = 667 \text{ л}$  можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 667/0,6 = 1,1 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер

$V_{сф} = 1,2 \text{ м}^3$ , уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 667 / 111 = 0,6.$$

Для одержання 61 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 61 / (1 - 0,10) = 68 \text{ л.}$$

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

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 68 / (1 + 0,1) = 62 \text{ л, де}$$

$X_{ін} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить  $V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 68 - 62 = 6 \text{ л.}$

Кількість інокуляту  $V_{роб.3} = 68 \text{ л}$  можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі геометричним об'ємом

$$V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 68 / 0,6 = 113 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 120 \text{ л}$ , уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3} / V_{сф} = 68 / 120 = 0,57.$$

Для одержання 6 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в малому інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{ін}) = 6 / (1 - 0,10) = 6,7 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі. Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде становити:

$$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 6,7 / (1 + 0,1) = 6 \text{ л, де}$$

$X_{in} = 0,10$  –доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить  $V_{pm4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 6,7 - 6 = 0,7$  л.

Кількість інокуляту  $V_{роб.4} = 6,7$  л можна одержати під час культивування бактерій в малому інокуляторі геометричним об'ємом  $V_{in4} = V_{роб.4}/K_{зап} = 6,7/0,6 = 11$  л.

Приймаємо найближчі за об'ємом два стандартних ферментера  $V_{сф} = 12$  л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.4}/V_{сф} = 6,7/12 = 0,56.$$

Для одержання посівного матеріалу  $V_{pm4} = 0,7$  л для засіву малого інокулятора можна культивуванням бактерій в колбах на качалці.

Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл з коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Тоді кількість колб становить:

$$N_{колб} = V_{pm5}/(V_{колб} \cdot K_{зк}) = 700/750 \cdot 0,2 = 5 \text{ колб.}$$

Одже, за результатами розрахунків для біосинтезу пектинази бактеріями *Bacillus subtilis* EFRL 01 необхідно ферментер для біосинтезу об'ємом  $12,5 \text{ м}^3$ , інокулятор об'ємом  $1,2 \text{ м}^3$ , інокулятори по 120 та 12 л та 5 качалочних колб.

## РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю і енергії (ростовим субстратом) у поживному середовищі (розділ 1) для біосинтезу пектинази є глюкоза.

Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes катаболізм глюкози у *Bacillus subtilis* EFRL01 відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність відповідного ключового ферменту 6-фосфофруктокінази 1 (КФ 2.7.1.11) [10].

Гліколізу *B. subtilis* EFRL 01 притаманні певні особливості, пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху.

Перетворення  $\alpha$ -D-Глюкози на  $\alpha$ -D-Глюкозо-6фосфат каталізується ферментом - глюкокіназа (КФ 2.7.1.2).

Фермент глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9) сприяє перетворенню  $\alpha$ -D-Глюкозо-6фосфату,  $\beta$ -D-Глюкозо-6фосфату,  $\beta$ -D-Фруктозо-6фосфату.

З  $\beta$ -D-Фруктозо-6фосфату за участю 6-фосфофруктокінази 1 (КФ 2.7.1.11) утворюється  $\beta$ -D-Фруктозо-1,6дифосфат, частина якого за допомогою фруктозо-1,6-дифосфатази II (КФ 3.1.3.11) зворотно перетворюється на попередню сполуку.

Фермент фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13) здійснює перетворення  $\beta$ -D-Фруктозо-1,6дифосфату на дві сполуки: гліцерат-1,3дифосфат та гліцерин фосфат. Ізомеризація трифосфогліцерату відбувається за допомогою ферменту фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12).

Перетворення фосфоенолпірувату на піруват – є заключною реакцією гліколізу, що каталізується ферментом піруваткіназою (КФ 2.7.1.40). Далі піруват злучається до метаболізму за участю специфічного піруватдегідрогеназного E1 компоненту (КФ 1.2.4.1) або L-Лактат дегідрогенази (КФ 1.1.1.27).

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Дзуман Д.В.			<b>РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ 34		

Схему катаболізму глюкози за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса наведено на рис.4.1.

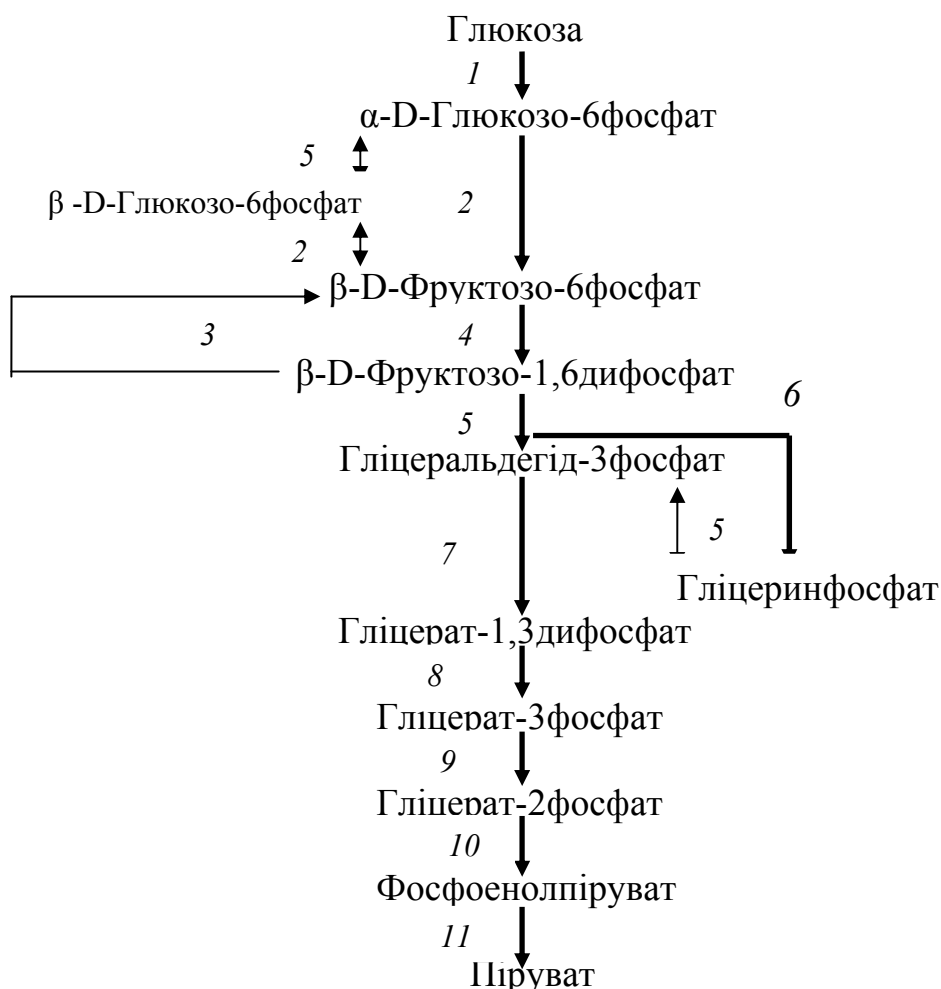


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози у *B. subtilis* EFRL 01

ферменти: 1 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – фруктозо-1,6-дифосфатаза II (КФ 3.1.3.11); 4 – 6-фосфотриозофруктокіназа 1 (КФ 2.7.1.11); 5 – фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 6 – триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 7 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа

## 4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Отже, синтез ферменту складається із біосинтезу амінокислот – складових білків. Пектиназа - водорозчинний білок, який володіє властивостями глобуліну і має молекулярну масу 35000-79000. Пектиназа

відносяться до металоензимів, до їх складу входять атоми кальцію. Ферменти багаті тирозином і триптофаном.

Глутамінова і аспарагінова кислоти становлять 25% маси білка. Наявність даних амінокислот зв'язують з гідролітичною властивістю ферменту [3].

Глутамінова кислота належить до глутаматної родини амінокислот. Попередником глютаміну виступає 2-оксоглутарат, інтермедіат ЦТК. Інтермедіат за участю ферменту глутаматсинтази (КФ 1.4.1.13) перетворюється на глутамат, який в свою чергу трансформується в глютамін під дією ферменту глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) [5, 10].

Аспарагінова кислота входить до аспартатної родини амінокислот і її попередником виступає оксалоацетат. Перетворення оксалоацетату на аспарагін каталізує фермент аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1) [10].

Тирозин належить до родини ароматичних амінокислот. Дана амінокислота може утворюватись з еритрозо-4-фосфату (інтермедіат обміну вуглеводів) через фенілаланін.

За даними Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes у *B. subtilis* EFRL 01 фермент, який трансформує перетворення фенілаланіну на тирозин не функціонує, тому утворення даної амінокислоти відбувається з використанням сукцинату (інтермедіат ЦТК), як попередника.

За участю ферменту сукцинатсеміальдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.16) сукцинат перетворюється на сукцинатсеміальдегід, який в ході певних трансформацій перетворюється на проміжну сполуку гомопротокатехін. Далі сполука під дією ферменту 4-гідроксифенілацетат-3-монооксигеназа (КФ 1.14.1.149) перетворюється на 4-гідроксифенілацетат. В ході низки перетворень 4-гідроксифенілацетат перетворюється на 4-гідроксифенілпіруват. Реакцію трансформації 4-гідроксифенілпірувату на тирозин каталізують два ферменти - аспартатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1), гістидинолфосфатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.9) [10].

До родини ароматичних амінокислот також належить триптофан. Попередником даної амінокислоти виступає еритрозо-4-фосфат, який утворюється в пентозофосфатному циклі. Біосинтез амінокислоти починається з конденсації фосфоенолпірувату і еритрозо-4-фосфату з утворенням семикарбонової сполуки. Утворена сполука піддається циклізації, в результаті чого утворюється 5-дегідрохінат. Далі 5-дегідрохінат через шикінат трансформується в хоризмат. Утворення триптофану з хоризмату відбувається через проміжну сполуку антранілат [5, 6].

Пул оксалоацетату у *B. subtilis* EFRL 01 поповнюється за рахунок функціонування анаплеротичних реакцій: карбоксилування фосфоенолпірувату та пірувату. Дані реакції каталізуються ферментами – фосфоенолпіруваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31), піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1) [10].

Схему перетворення ростового субстрату глюкози на кінцевий продукт пектиназу наведено у Додатку 1.

## РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

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

Спосіб культивування *Bacillus subtilis* EFRL 01 обираємо на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. Тому важливим є визначення таких умов:

1. Для культивування *Bacillus subtilis* EFRL 01 необхідно створити аеробні умови, так як продуцент є аеробом [6]. Для забезпечення таких умов використовують барботер для подачі кисню та перемішуючий пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів.

2. Існують два способи промислового культивування мікроорганізмів: *поверхневий* і *глибинний*.

Глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно зменшити виробничі площі, виключити тяжку ручну працю (високий рівень автоматизації), покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливий перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування більш раціонально використовуються поживні середовища, що дає можливість зменшити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів та отримувати більш активні вторинні метаболіти.

Обираємо глибинний спосіб культивування, так як цей спосіб має ряд очевидних переваг, дозволяє значно скоротити виробничі площі; виключити тяжку ручну роботу; поліпшити гігієну праці; спростити механізацію та автоматизацію виробництва; робить можливість переходу на безперервний спосіб культивування.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Дзуман Д.В.				<b>РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Пенчук Ю.М.							
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							
						<b>Кафедра БТМ<sup>8</sup></b>		

Глибинне культивування може здійснюватися в різного роду ферментерах. В сучасних ферментерах численні параметри культивування (рН, температура, швидкість аерація тощо) контролюються автоматично[29].

При глибинному способі культивування більш раціонально використовуються поживні речовини середовищ, що дає можливість значно скоротити відходи виробництва та отримувати препарати ферментів з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю [30].

Не обираємо поверхневий спосіб культивування так як він має ряд недоліків: недосконалість конструкції застосовуваного обладнання, мала механізація технологічних процесів, проведення процесу в нестерильних умовах.

3. Виробництво пектинази може здійснюватись як безперервним так і періодичним способом. Періодичний спосіб культивування продуцентів ферментів найбільш часто вживаний в промисловості, складається із підготовки компонентів поживних середовищ, їх стерилізації і самого процесу культивування, який починається після засіву стерильного поживного середовища посівним матеріалом [31]. Також біосинтез пектинази здійснюється у періодичному процесі, тому що максимальний синтез ферменту відбувається у стаціонарній фазі росту продуцента. Отже, тривале перебування штаму-продуцента в експоненційній фазі росту, яке спостерігається за безперервного культивування, є недоцільним. При безперервному режимі культивування культура постійно перебуває в експоненційній фазі, що не дає змоги одержати максимальну ферментативну активність пектинази у культуральній рідині [32].

4. *Bacillus subtilis* EFRL 01 росте при оптимальній температурі 37 °С. Згідно [6] оптимум росту спостерігається при рН середовища 7,0.

При даних умовах можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому необхідно забезпечити асептичні умови під час отримання пектинази. Для запобігання контамінації проводиться стерилізація обладнання та компонентів поживних середовищ для культивування.

Також необхідною стадією є контроль рН, який підтримується при зростанні чи падіння розчинами соляної кислоти та їдкою натру (6 %). Початковий рН орієнтовно становить 7,0, оскільки в складі середовища відсутні компоненти з сильними кислотними чи основними властивостями, проте у процесі біосинтезу цей показник може змінюватися. В даному випадку у нас наявні 4 композиції поживного середовища, для зниження ризиків контамінації та 2-ох разового внесення солей у поживне середовище, ми повинні знизити рН до 4,0 за допомогою соляної кислоти, що дозволить нам разом внести 2 композиції солей без випадання в осад при їх взаємодії та відправляємо на стерилізацію. Зниження рН на рівні 4,0 достатньо буде 2 мл соляної кислоти на 1 л поживного середовища. Після охолодження перед внесенням посівного матеріалу рН потрібно довести до 7,0 яке є оптимальним для росту нашого біологічного агента. Підтримки рН на рівні 7,0 достатньо буде 2 мл їдкою натру на 1 л поживного середовища. Оскільки загальний об'єм поживного середовища для накопичення біомаси в інокуляторах та виробничому ферментері  $63+630+6300 = 419,58$  л, то кількість розчинів титрантів буде становити – 1,68 л

Отже, культивування продуцента пектинази *Bacillus subtilis* EFRL 01 здійснюється в аеробних умовах, глибинним способом у періодичному режимі протягом 90 годин при дотриманні усіх правил асептики.

Основним апаратним елементом біотехнологічного процесу є біореактор – ферментер. Біореактори призначені для культивування мікроорганізмів, накопичення біомаси, синтезу цільового продукту. Основні вимоги до ферментера – можливість проведення процесу культивування продуцента в стерильних умовах при інтенсивній аерації поживного середовища. У біореакторах повинні бути забезпечені оптимальні гідродинамічні і масообмінні умови [33].

Оскільки заданий об'єм ферментатора нашому випадку становить  $6,3 \text{ м}^3$ . коефіцієнт заповнення становить  $0,6 = 60\%$ . Обираємо ферментер-біореактор фірми «Solaris» повним об'ємом у 6300 л тобто  $6,3 \text{ м}^3$  [21], адже

ця фірма займається виробництвом як стандартних біореакторів так і на замовлення місткістю до 30 м<sup>3</sup> з нержавіючої сталі. Ферментер обладнано автоматизованою системою керування, системою насосів для подачі поживних розчинів. Інших комунікацій. Також він обладнаний турбінною мішалкою, датчиками температури, кисню, оптичної густини та іншими [34].



Рис 5.1. Промисловий ферментер фірми «Solaris» [35].

Тип ферментерів (біореакторів) для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань. Важливе значення для аеробного процесу має система аерації. При цьому оцінюють, з одного боку, швидкість надходження кисню з рідиною і його масопередачу від газової фази, з іншого - швидкість споживання кисню мікроорганізмами і його видалення з відпрацьованою рідиною. Швидкість переходу кисню з газової фази в рідку виражають через об'ємну швидкість адсорбції.

По відношенню до кисню *Bacillus subtilis* EFRL 01 – аероб, тому важливу роль при культивуванні відіграє аерація та режим перемішування.

Для культивування штаму-продуцента потрібно обрати ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу, який забезпечить найбільш інтенсивний масообмін, і відповідними датчиками контролю.

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

Біореактори з механічним перемішуванням використовують найчастіше, оскільки вони дають змогу легко змінювати технологічні умови й ефективно постачати клітинам повітря, що визначає характер розвитку мікроорганізмів та їх біосинтетичну здатність [35].

### **Порівняльна характеристика аерліфтною мішалки та турбінної мішалки**

Аерліфтне перемішування застосовують для рідин з невеликим коефіцієнтом динамічної в'язкості (до 0,2 Па·с), а також для замочування зерна у воді (у виробництві солоду). Іноді для перемішування застосовують не повітря (газ), а водяну пару, тоді рідина одночасно нагрівається і розбавляється конденсатом. При перемішуванні сипких тіл (зерна) газорідинним потоком використовують принцип дії газоструминного насоса – ерліфта. Повітря подають компресором у центральну трубу апарата. При цьому в трубі утворюється суміш газу, рідини і зерна, густина якої менша від густини суміші, що міститься навколо труби. Внаслідок різниці між густинами виникає циркуляційний рух усієї маси [29].

Основний недолік цієї мішалки в тому, що через подачу циркуляційного повітря виникає набагато більше піни ніж з турбінної мішалки, що потребуватиме збільшенню кількості піногасника, тому встановлення аерліфтною мішалки буде більш затратним в порівнянні з турбіною мішалкою.

Турбінні мішалки використовують у всіх випадках, коли необхідно

інтенсивне перемішування, особливо рідин, що значно розрізняються по в'язкості, а також при диспергуванні газу в рідині. Також їх використовують при розчиненні твердих кристалічних часток, емульгуванні рідин з великою різницею густин [29]. Турбінні мішалки мають лопатки. Якщо лопатки знаходяться в корпусі таким чином, що вони утворюють закриті канали подібні ротору центробіжного насосу, то таку мішалку називають закритою турбінною мішалкою. У відкритих мішалках лопатки не знаходяться в корпусі. Найбільш простою й високоефективною серед відкритих турбінних мішалок є мішалка з прямими лопатками, які розміщені радіально.

Отже, обираємо турбінну мішалку. Так як об'єм ферментера становить  $12,5 \text{ м}^3$ , то мішалка повинна бути двох'ярусною. Мішалка даного типу забезпечить ефективне перемішування поживного середовища під час культивування [39].

В процесі біосинтезу виділяється велика кількість тепла за рахунок життєдіяльності мікроорганізмів і в результаті роботи мішалки. Тепло, яке виділяється в період росту мікроорганізмів, регулюється теплообмінними пристроями різної конструкції. Використання зовнішньої рубашки технологічно найбільш вигідно, так як введення в середину ферментера додаткових конструкцій типу змійовика ускладнює мийку і стерилізацію ферментера. Тому для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком для контролю температури [18].

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

У такому апараті барботер виконують у вигляді кільцевих жолобів, принцип його дії полягає в первинному розподілі газу по окружності, описуваної лопастями мішалки. При швидкості газу в отворах барботера 20-25 м/с він входить в рідину у вигляді розширеного струменя, що розпадається

на великі бульбашки на відстані 50-70 мм від барботера. Подальше дроблення газових пухирців і розвиток міжфазної поверхні відбувається під впливом турбулентних пульсацій, які створюються в рідині лопастями мішалки [36].

Обраний ферментер забезпечений пристосуваннями для достатньої аерації і перемішування культури, підтримки необхідної температури, а також контрольно-вимірювальним приладами

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

### **5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря**

*Bacillus subtilis* EFRL 01 для своєї життєдіяльності потребують повітря, тому культивування проходить в аераційних умовах. Відповідно в технологічній схемі необхідно передбачити стадії підготовки аераційного повітря.

Підготовка аераційного повітря буде здійснюватися в окремих будівлях – компресорних відділеннях, оскільки втрати повітря будуть великі. Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

збір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітря забірником у найвищій точці Н ~ 15 м будівлі (висота потолків будівлі – 8 м, висота поверху – 9 м, разом з косим дахом будівлі – 12, відбір повітря повинен відбуватися на 2-3 метри вище найвищої точки), де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря;

очищення повітря від пилу ( $\delta > 50$  мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;

Систему фільтрації в цілому можна охарактеризувати як мікробіологічну надійність через видалення грубих часток та пилу. Для попередньої очистки повітря від грубого пилу застосовуються осередкові фільтри, заповнені різними фільтруючими матеріалами різних типів:

самоочищуючі з гофрованою металевою сіткою, рулонні з ультратонким скловолокна, панельні регенеруючі, рулонні з пінополіуретаном тощо.

Широке поширення для очищення повітря від грубого пилу отримали осередкові фільтри з афілійованих промислових матеріалів, вони призначені для очищення повітря загальна запиленість якого становить  $\delta > 50$  мкм [36].

Стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках (при цьому повітря нагрівається до температури 120–200°C); Тип компресора залежить від виробництва, від витрат повітря і кінцевого тиску для аерації всього робочого об'єму всіх апаратів. Для подачі кисню в ферментери використовують поршневі, винтові та спіральні компресори.

Найчастіше для великотонажних виробництв застосовують спіральні через ряд переваг:

- нульовий витік повітря, низький коефіцієнт подачі кисню, відсутність теплообміну з навколишнім середовищем та компактність [37]. охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується (використовують водяні теплообмінники різного типу: кожухотрубні, «труба в трубі»);

- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (ємність великого об'єму);

- крім того ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря.

Класичний ресивер складається безпосередньо з посудини для повітря, декількох опор і додаткового допоміжного обладнання. Корпус ресивера повинен мати запас міцності і володіти хорошими антикорозійними властивостями. Опори ресивера як правило представляють собою зварні елементи і забезпечують вертикальний, або горизонтальний варіант розміщення повітрязбірника. На виробництві в комплектації з компресорами, застосовують повітряні ресивери горизонтального типу. Вони прості в обслуговуванні, а також в легкості монтажу електродвигуна на ресивер, компресора та іншого обладнання [29].

Стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням до температури 45–50°C парою у відповідних теплообмінниках; очищення у головних ємнісних набивних фільтрах до ступеня очищення  $E = 95\%$ . Головні фільтри, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень.

Головні фільтри це фільтри I типу, які характеризуються здатністю вловлювати та достатньо надійно утримувати на фільтрувальних поверхнях частинки пилу всіх розмірів – від частинок, що вимірюються десятими, а навіть сотими частками мікрометра, які вловлюються в результаті дії механізму дифузії і зчеплення, до великих частинок, що затримуються в густому переплетенні тонких волокон фільтрувального матеріалу. Базальтові волокна застосовуються для очищення і стерилізації технологічного повітря при виробництві антибіотиків та ферментів. Тривала експлуатація фільтрів з базальтових волокон в виробничих умовах показала, що вони витримують стерилізацію гострою парою.

Такі фільтри дозволяють замінити кілька перехідних шарів традиційних піщано-гравійних фільтрів одним шаром волокна, при цьому в кілька разів зменшується кількість необхідних для фільтрів матеріалів і транспортні витрати, трудовитрати на виготовлення і укладання фільтрів. очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через □ трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення  $E 99,99\%$ . Основним застосуванням мембранних фільтрів є фільтрація повітря, газів або хімічних речовин. Вони виготовляються тільки з політетрафторетилену і тому є незмінно гідрофобними. На відміну від інших типів фільтрів, вони не змочуються вологою в повітрі, дозволяючи повітрю проходити безперешкодно навіть при низьких диференціальних тисках [38]. Тому будемо використовувати саме такий тип фільтруючого матеріалу.

**Очищення відпрацьованого повітря.** Для очищення відпрацьованого повітря ми будемо застосовувати сітчасті фільтри. Вони складаються з

циліндричного корпусу з кришкою і днищем, усередині вміщено фільтрувальний елемент, виготовлений з металевих сіток трикотажного сплетіння з дроту діаметром 0,28 мм із нержавіючої сталі. Повітря, проходить через фільтр, звільняється від крапель культуральної рідини з мікроорганізмами. Очищення відпрацьованого повітря відбувається в фільтрах грубого очищення з афілійованих промислових матеріалів.

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

При проведенні дезінфекції використовують такі основні методи: фізичний, хімічний та комбінований, за якого фізичні і хімічні методи знезараження застосовуються одночасно. Виробничі приміщення: підлогу, стіни, стелю, двері та вікна оброблятимемо хімічним способом - пролонгованими дезінфікуючими засобами, оскільки вони мають властивість зберігати свою дію деякий час. Ферментаційне обладнання також хімічним способом, але не пролонгованими засобами, оскільки дезінфекція повинна проводитися перед кожним виробничим циклом.

На виробництві повітря будемо знезаражувати за допомогою бактерицидних ламп, які вмикають на 2 години для повної очистки повітря після генерального прибирання, тобто раз на тиждень, в попередньо звільнених від персоналу приміщеннях.

Відомо, що частим явищем є виникнення резистентності мікроорганізмів до дезінфекційних засобів, яка розвивається внаслідок довготривалого використання дезінфекційних засобів із однієї хімічної групи. Тому час від часу проводять їх ротацію. Ротація здійснюється шляхом заміни дезінфекційного засобу, до якого сформувалася резистентність на дезінфекційний засіб іншої хімічної групи. Тому для обробки поверхонь виробничого приміщення обираємо 3 види дезінфекційних засобів з різним складом, які були вибрані з «Державного реєстру дезінфекційних засобів України 2020 р.» [40].

«Каустична сода» або їдкий натр – універсальний дезінфектант з

потужним бактерицидним ефектом, що оснований на сильних лужних характеристиках. Виглядає як сильно гігроскопічний твердий лускатий або гранульований матеріал білогоза барвлення. У воді розчиняється добре, причому з виділенням значної кількості тепла і формуванням мильної консистенції. Використовується для миття забруднених поверхонь біотехнологічного устаткування.

За ступенем токсичності каустик відносять до 2-го класу небезпеки. Тому слід пам'ятати, що може викликати опіки шкіри, а при тривалому впливі може викликати виразки та екземи. Тому при роботі, персоналу потрібно дотримуватися всіх правил безпеки.

У вигляді 2-3 %-го гарячого (70 °С) розчину справляється з великою кількістю інфекцій, спровокованих бактеріями і вірусами. При поєднанні з 5-10 %-м хлоридом натрію дезінфікуючий вплив підвищується додатково.

Їдкий натр відповідає основним вимогам до хім. засобів для дезінфекції:

- добре розчинення у воді;
- отримання ефекту в невеликих концентраціях;
- короткий час для отримання результату;
- забезпечення знезараження навіть при наявності органічних речовин;
- оптимальна стійкість при зберіганні плюс повільне зниження знезаражувальної дії;
- не надмірна токсичність для людей і тварин;
- доступність, дешевизна плюс зручність перевезення та зберігання.

У продажу можна знайти каустик як у твердому, так і в рідкому вигляді. Термін зберігання продукту – 1 рік з дати виготовлення [41].

Засіб «Дезоксін» являє собою однорідний рідкий прозорий концентрат від безбарвного до світло-жовтого кольору зі слабким специфічним запахом, добре розчиняється у воді, не фіксує органічні забруднення. рН концентрату – 2,5-3,5. Водні розчини засобу прозорі, безбарвні зі слабким специфічним запахом, мають виражені миючі, дезодоруючі, змочувальні, емульгуючі

властивості, рекомендованих до застосування концентраціях не викликають корозії металів, не пошкоджують поверхні.

Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: пероксид водню – 16,0-20,0; дидецилдиметиламонійхлорид-5,0–7,0; алкілдиметилбензиламоній хлорид – 4,0 – 6,0 (діючі речовини); функціональні добавки, вода до 100,0.

«Дезоксін» дозволяється застосовувати для дезінфекції та очищення медичної апаратури (в тому числі апаратів УЗД, КТ, МРТ, ЕКГ, рентгенів), інвентарю для прибирання, посуду, санітарно-технічного обладнання, різних поверхонь в палатах, маніпуляційних, лабораторіях та інших приміщеннях в медичних установах. Також його застосовують для очищення і дезенфікації твердих поверхонь приміщення, приладів та обладнання на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфюмерно – косметичної, харчової та переробної промисловості.

Засіб для очищення та дезінфекції поверхонь «Дезоксін» володіє широким спектром антисептичних властивостей, в тому числі:

- бактерицидними;
- віруліцидними;
- спороцидними;
- фунгіцидними.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин 3-го класу небезпеки. В умовах одноразової інгаляційної дії засіб належить до мало небезпечних речовин за ступенем леткості. Засіб "Дезоксін" у вигляді концентрату має виражену місцево-подразнюючу дію на шкіру (опіки). Робочі розчини засобу в концентрації до 10,0 % в умовах одноразового і багаторазового впливу не надає подразнюючу дію на шкіру, в концентраціях вище 10,0 % слабо подразнюють шкіру. Концентрат засобу має виражену подразнюючу дію на слизові оболонки очей з пошкодженням рогівки..

Розчини засобу «Дезоксін» зберігають свою активність протягом 15 діб з моменту виготовлення за умови зберігання у закритих ємностях при кімнатній температурі [42].

«Дісмозон<sup>®</sup> пур» використовують для дезінфекційного очищення (миття) в різних медичних установах. Він придатний для обробки медичного обладнання, відповідно до Закону про медичне обладнання (MPG), та для знезараження інших поверхонь, що миються. Дісмозон<sup>®</sup> пур застосовують також для дезінфекції чистих приміщень класів А і В на фармацевтичних підприємствах.

Рекомендовано застосування на всіх ділянках виробництва продуктів харчування, у фармацевтичній і косметичній промисловості, де вимагається дотримання гігієни. Винятково добра сумісність із матеріалами дає змогу застосовувати Дісмозон<sup>®</sup> пур для м'якої, але надійної дезінфекції високочутливої апаратури. Концентрація робочого розчину 1%.

Склад: діюча речовина – магнію монопероксифталат гексагідрат - 80,0 %; допоміжні речовини – натрію кумолсульфонат; натрію алкілбензолсульфонат; ізотридеканолетоксилат–9ЕО; високоетерована метилгідроксіетилцелюлоза; вода.

Засіб бактерицидний (MRSA/ЕНЕС, збудники туберкульозу, легіонельозу), фунгіцидний (гриби роду *Candida* та гриби на вологому дереві), віруліцидний (збудники парентеральних гепатитів В, С, ВІЛ, рота-, вакцинія-, адено-, папова-, поліовіруси, SARS-CoV), спороцидний (*Clostridiumdifficile*, *Bacillussubtilis*).

Термін зберігання засобу – 3 роки [43].

Для дезінфекції обладнання використовуємо не пролонгований засіб«DivosanForteVT6», який являє собою стабілізований 15% розчин надощтової кислоти, що не піниться і легко змивається. Високо ефективний при видаленні будь-яких типів мікроорганізмів включаючи бактерії, дріжджі, грибок, спори та віруси. Може використовуватися як для ручного миття, так і з використанням СІР-мийки. Призначений для видалення різних

забруднень, використовуються для дезінфекцій ферментаційного обладнання та обладнання харчових виробництв. Склад миючого засобу: діючі речовини – пероксид водню - 20-30%; оцтова кислота – 20-30%; наоцтова кислота – 15%. Завдяки сильній окислювальній дії прекрасно видаляє плями і володіє дезодоруючим ефектом, легко змивається, не залишаючи слідів.

Необхідно завжди ретельно протирати поверхню, але не пізніше, ніж через годину після обробки. Різниця концентрації залежить від ступеня забрудненості (1,5-3%).

Зберігати в закритій оригінальній упаковці, берегти від джерел сонячного світла і тепла. Повне керівництво по техніці безпеки знаходиться в Таблиці Параметрів Технологічної Безпеки (MSDS) [44].

Виробництво пектинази здійснюється протягом 180 днів. І під час всього процесу необхідно створити максимально асептичні умови. Згідно з ТЕО, виробниче приміщення включатиме: 12,5 м<sup>3</sup> ферментер, чотири інокулятори – 1,2 м<sup>3</sup>, 120 л, 12, УБС – 5 м<sup>3</sup> та збірники для підготовки поживного середовища, качалочні колби та качалки, інше виробниче обладнання. Оскільки обладнання багато, беремо ширину підлоги 6 м, враховуючи 1-1,5 метри відстані між обладнанням та стінами. Довжину беремо 6 м. Отже площа підлоги (та стелі) = 6\*6=36 м<sup>2</sup>. Висота стін – 8 м (два поверхи), оскільки висота ферментеру 4 м. Отже, загальна площа стін = ((6\*8)+(6\*8))\*2=192 м<sup>2</sup>. Генеральне прибирання проводиться на початку кожного виробничого циклу. Всього 46 циклів/180 днів. Під час генерального прибирання обробляються підлога та стіни (36+192=228 м<sup>2</sup>). Також генеральне прибирання повинно проводитися кожного 5го дня. Отже, 180/46=4, 30/4=7 прибирань за місяць. 180/30=6, 6\*5=30 прибирань за весь виробничий процес. Припустимо, що площа дезінфекції обладнання на комунікацій становить половину, тоді 192/2= 96 м<sup>2</sup>.

При поточному прибиранні дезінфікуються повітря на підлога два рази на день.

**Орієнтований розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь приміщеннях, обладнання тощо на 2021 рік**

№	Найменування підрозділів об'єкта	Кількість підрозділів	Площа, що підлягає дезінфекції, м <sup>2</sup>		Дезінфекуючий засіб			Кратність обробок			Потреба в деззасобах, л (кг)			
			При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину, %	Норма витратиробочого розчину на м <sup>2</sup>	На добу	На місяць	На рік	На одну обробку		На місяць	На рік
											При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні		
1	Стіни, підлога, стеля, вікна, двері	5	36	192	«Дезоксін»	10	70 мл	2	60	580	2,5	13,4	129,5	777
					«Дісмозон пур»	1	50 мл	2	60	580	1,8	9,6	93	558
2	Обладнання і комунікації	2	-	96	«Divosan Forte VT6»	3	50 мл	2	60	580	-	4,8	120	720
					Каустична сода	2	50мл	2	60	580	1,8	9,6	93	558

#### 5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для культивування *Bacillus subtilis* EFRL 01 і отримання цільового продукту використовують середовище даного складу (г/л):

Глюкоза – 10;

Пептон – 5;

MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 5;

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5

Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,01

Проаналізувавши склад поживного середовища для культивування *Bacillus subtilis* EFRL 01 можна поділити його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів)

**Композиція А:** глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,5 МПа).

**Композиція Б:** пептон (режим стерилізації: 120°С, 30 хв, 0,075-0,1 МПа).

**Композиція В:** Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O та MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O (режим стерилізації: 131°С, 40 хв, 0,15 МПа).

**Композиція Г:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

Середні солі (композиція В) стерилізуємо окремо від фосфорних (композиція Г), щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей при нагріванні. Однак для забезпечення умов аспетичності процесу є можливість розчинити солі композиції В і Г в одній колбі, а перед стерелізацією довести рН 6% соляною кислотою та простерелізувати в одній колбі замість 2. Такий спосіб зменшить чисельність внесення компонентів поживного середовища чи то в посівну колбу чи то в інокулятор, забезпечивши асептичність проведення процесу.

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

Також слід звернути увагу на умови стерилізації глюкози та пептону. Глюкоза повинна стерилізуватись впродовж 30 хв та тиску в апараті 0,05

МПа. Для білкових речовин рекомендовані режими стерилізації: 30 хв при 0,1 МПа [45].

### **Вирощування інокуляту в колбах на качалках**

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bacillus subtilis* EFRL 01, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

**Композиція А:** глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,5 МПа).

**Композиція Б:** пептон (режим стерилізації: 120°С, 30 хв, 0,075-0,1 МПа).

**Композиція В:**  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: гостра пара 131°С, 40 хв, 0,15 МПа).

**Композиція Г:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: гостра пара 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа).

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

Стерелізація всіх композицій відбувається в колбах, оскільки дуже малі об'єми. Процес відбувається в автоклаві.

### **Вирощування інокуляту в посівних апаратах**

Стерилізація 120 л та 1,2 м<sup>3</sup> поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

**Композиція А:** глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,5 МПа).

**Композиція Б:** пептон (режим стерилізації: 120°С, 30 хв, 0,075-0,1 МПа).

**Композиція В:**  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (режим стерилізації: гостра пара 131°С, 40 хв, 0,15 МПа рН 4,0–4,5 ).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А. Солі розчиняють в

окремому збірнику, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація.

### **Виробничий біосинтезу ферментаторі**

Стерилізація 1,2 м<sup>3</sup> поживного середовища, необхідних для цієї стадії здійснюється у відповідному лабораторному ферментері об'ємом 12,5 м<sup>3</sup>, що не потребує перескладання композицій поживного середовища:

**Композиція А:** глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,5 МПа).

**Композиція Б:** пептон (режим стерилізації: 120°С, 30 хв, 0,075-0,1 МПа).

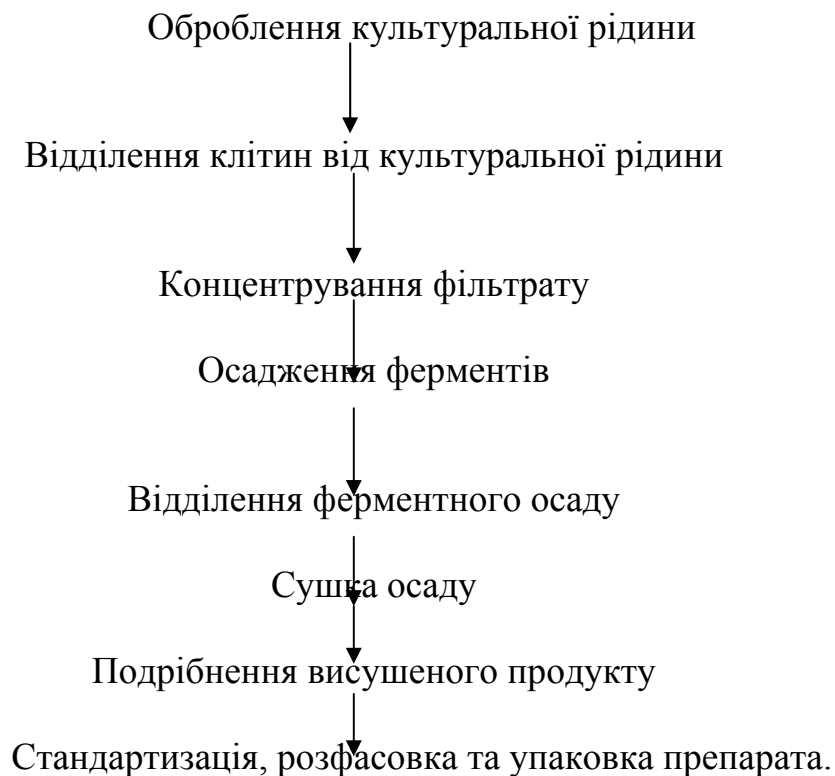
**Композиція В:** Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> та MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O (режим стерилізації: гостра пара 131°С, 40 хв, 0,15 МПа рН 4,0–4,5 ).

Стерилізація композиції Б відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції А. Солі розчиняють в окремому збірнику, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація.

### **5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

Культуральна рідина *Bacillus subtilis* EFRL 01 містить як цільовий продукт комплекс пектолітичних ферментів, так і залишки поживного середовища, продукти метаболізму, та клітини продуцента. Пектолітичні ферменти екзометаболіти, тобто накопичуються позаклітинно [46]. Для потреб харчової промисловості необхідно одержати ферментний препарат ступеню чистоти 10х.

Виділення і очищення цільового продукту включає такі етапи:



### **Вибір способу оброблення культуральної рідини**

Оброблення культуральної рідини є необхідною стадією, яка сприяє руйнуванню колоїдної системи, що ускладнює подальші стадії розділення рідкої та твердої фаз.

Для покращення розділення фаз можна використовувати:

- теплову коагуляцію;
- введення електролітів;
- використання наповнювачів, які покращують фільтрацію.
- кислотну коагуляцію;

Теплова коагуляція є простою в реалізації, але може використовуватись лише для термостабільних метаболітів. Ферменти є термолабільними метаболітами, тому цей метод використовувати ми не можемо.

Введення електролітів також сприяє руйнуванню колоїдної системи, але на подальших стадіях необхідно додавати етап очищення від електролітів. Електролітами можуть бути високомолекулярні органічні та неорганічні речовини. Часто вони є нелеткими сполуками, що ускладнює їх видалення на стадіях очищення.

Використання наповнювачів, наприклад перліту чи бентоніту, також провокує абсорбцію фермента та призводить до його втрат.

При використанні кислот, як коагулянтів, слід враховувати фізико-хімічні особливості ферментів. Ферменти мають ізoeлектричну точку, тобто значення рН, при якому загальний заряд молекули стає нейтральним, і фермент випаде в осад, тобто ми можемо втратити під час видалення залишків клітин. Ізоелектрична точка пектинази становить рН 8,9, а це значить, що ми можемо підкислити культуральну рідину до рН 5 і пектиназа залишиться у розчині. Для такої коагуляції ми плануємо використовувати соляну кислоту, яка є легкою та може легко видалятись в процесі очищення продукту.

### **Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання**

Першим етапом виділення цільового продукту є відділення клітин продуцента (*Bacillus subtilis* EFRL 01) від культуральної рідини, що містить пектолітичні ферменти. Для відділення біомаси використовують різні методи: сепарування, центрифугування, фільтрацію, флотацію тощо [39].

Фільтрування використовується у промислових масштабах для відокремлення бактеріальної маси. Для процесу фільтрації використовують різні фільтрувальні апарати: фільтрпрес, НУТЧ-, ДРУК-фільтри, центрифуги, сепаратори [48].

Фільтрпреси використовують для обробки великих об'ємів культуральної рідини. Ці апарати складаються з плит і рам, що чергуються, і фільтрувальних перегородок між ними. Процес фільтрації здійснюється під тиском [29].

Недоліком фільтрування є те, що осад, що утворюється, зазвичай здатний стискатися, тому при підвищенні тиску шар ущільнюється, і замість очікуваного збільшення швидкості фільтрації спостерігається її зниження. Цього можна уникнути, якщо вчасно очищати плити та рами, тому останнім часом з'явилися фільтри, у яких операції фільтрації,

промивання осаду та його зняття з фільтруючої перегородки автоматизовані. Це фільтрпреси рамні, стрічкового та баштового типу.

Деякі суспензії фільтруються особливо важко, пов'язано, як з малими розмірами твердих частинок, так і з легким стисканням осадів. Для полегшення фільтрування таких суспензій додають допоміжні фільтрувальні матеріали але за умови, що він буде нейтральним до цільової твердої субстанції.

Взагалом фільтрування суспензії на вакуум-фільтрах пов'язане з великими труднощами, які зумовлені малими розмірами клітин, високою в'язкістю суспензії і наявністю великою кількістю домішок мікрочастинок. Тому, стадії фільтрування передують попередня обробка суспензії, а без попередньої обробки, фільтрування культуральної рідини на вакуум-фільтрах є економічно не вигідним, громіздким та неефективним процесом, оскільки відбувається закупорювання пор у фільтрі.

Центрифугування – осадження зважених в різних частинок із застосуванням відцентрової сили.

Загальна класифікація центрифуг подається залежно від основних характеристик:

- за фактором розділення;
- за технологічним призначенням;
- за способом розвантаження осаду з барабана;
- за конструкціями опор і розміщенням осі барабана.

За фактором розділення центрифуги умовно діляться на нормальні центрифуги з фактором розділення  $\Phi_p < 3000$  і швидкісні, або надцентрифуги, в яких фактор розділення  $\Phi_p > 3000$ .

За технологічним призначенням розрізняють:

- відстійні центрифуги, що призначені для розділення погано фільтрувальних суспензій з різною крупністю частинок твердої фази. Окрім цього відстійні центрифуги діляться на тільки відстійні, освітлюючі, концентруючі і розділюючі або сепаруючі центрифуги;

- фільтрувальні центрифуги, що застосовуються для розділення відносно грубодисперсних суспензій кристалічних і аморфних продуктів, промивання отриманого осаду і відділення вологи від штучних матеріалів.

За способом розвантаження осаду з барабана розрізняють центрифуги з ручним розвантаженням, гравітаційним, шнековим, а також пульсуючими поршнями, ножами і скребками.

За конструкцією опор і розміщенням осі барабана центрифуги діляться на підвісні вертикальні, підвісні вертикальні на колонах, вертикальні стоячі з підпертим валом, горизонтальні і похилі.

Залежно від організації технологічного процесу центрифуги діляться на центрифуги періодичної і безперервної дії.

Центрифуги безперервної дії - це високопродуктивні машини, які використовуються в мікробіологічній промисловості і дозволяють перевести ряд технологічних процесів на автоматичний режим роботи. Однак можливість широкого застосування їх обмежується технологічними вимогами і властивостями оброблюваних матеріалів. Більша частина центрифуг безперервної дії - фільтрувальні, за винятком відстійних центрифуг зі шнековим розвантаженням осаду.

Центрифугування у даному випадку зумовлює економічну не вигідність та складність обладнання.

Основним та істотним недоліком сепарування є швидка забиваємість мундштуків і міжтарільчатого простору залишками поживного середовища, наприклад пектину, який виступав індуктором синтезу пектинази, що сприяє як великим економічним втратам, втраті в часі на очищення, так і втратам цільового продукту [29].

Флотацію найчастіше застосовують у виробництві дріжджових концентратів, для відділення клітин бактерій та залишків поживного середовища від культуральної рідини даний спосіб не придатний, оскільки є досить тривалим у часі.

Перевагами центрифуг є:

- для їх розміщення потрібна незначна виробнича площа;
- видалення осаду, здійснюється під тиском 0,1-0,15 МПа, що дозволяє отримати осад з вологістю 60-70% при порівняно малій витраті електроенергії;
- не великий час проведення допоміжних операцій, що підвищує питому продуктивність установки в 6-8 раз порівняно з фільтрами.

Управління технологічними операціями на центрифугах здійснюється за допомогою електромеханічних пристроїв, повністю виключаючи витрати ручної праці [35].

Обираємо для виробництва шнекову відстійну центрифугу безперервної дії (Рис.5.1), продуктивність 3 м<sup>3</sup>/год.

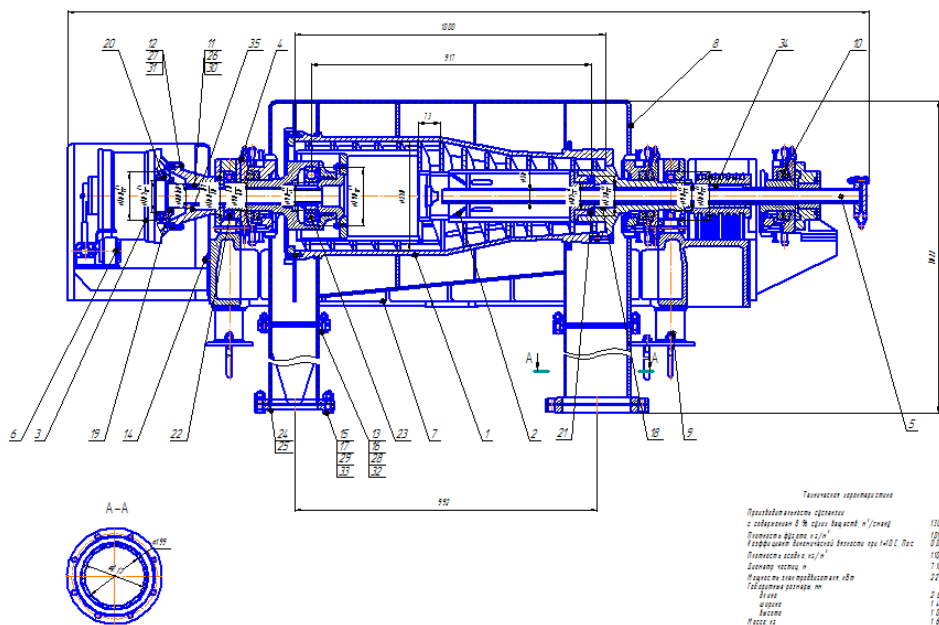


Рис. 5.1. Шнекова відстійна центрифуга

### Вибір способу концентрування фугату культуральної рідини

Існує лише два способи концентрування розчинів ферментів:

- Вакуум-випарювання
- Висолювання
- Ультрафільтрація

Процес випарювання є доцільним через свою простоту, швидкість,

ефективність та легкість випарювання рідкої фази.

При використанні вакуумного способу знижується температура кипіння рідини, що дозволяє ефективно проводити видалення вологи з розчинів термолабільних речовин.

Найпоширеніші в промисловості випарні апарати, які нагріваються водяною парою.

Вакуум-випарні апарати класифікують за способом дії (безперервної і періодичної дії), за кількістю корпусів (одно- і багатокорпусні). Відсоток згущення на одному корпусі становить приблизно 20 %.

Отже для зменшення об'єму приблизно в два рази необхідно використовувати трикорпусну випарну установку, що є економічно та технічно необґрунтованим.

Для забезпечення висолювання слід створити насичення сіллю до 90 %, при цьому в препарат переходить від 20 до 80 % від маси осаду. Такий препарат буде потребувати додаткових стадій очищення, наприклад видалення залишків солі зворотнім осмосом, що призведе до збільшення технологічних стадій та вартості кінцевого продукту [51, 54].

Ще однією складністю при висолюванні є процес внесення солі. Сіль необхідно подрібнити на вносити невеликими порціями за постійного перемішування. Після внесення солі слід продовжити перемішування ще 20-40 хв. Процес формування осаду триває від 40 хв до декількох годин [51]. Також відпрацьований сольовий розчин буде потребувати подальшої переробки.

Метод ультрафільтрації має ряд переваг: проводиться в «м'яких» умовах, що забезпечують менший відсоток зниження активності ферменту (на відміну від упарювання). Крім того, здійснюється очищення від баластних низькомолекулярних домішок і концентрування розчину ферменту в 100-150 разів.

Тангенційна фільтрація (Рис.5.2), або Cross-flow, характеризується високими фільтраційними швидкостями і продуктивністю технологічних

установок, але вона вимагає багаторазової циркуляції оброблювальної рідини крізь мембранні фільтраційні елементи.

Однак при реалізації такого типу фільтрації поступово знижується продуктивність мембранні фільтраційні елементи, що обумовлюється забиванням пор частинками концентрату. Для відновлення фільтраційної здатності мембранних фільтраційних елементів використовується регенерація (промивання). Промивання мембранні фільтраційні елементи, проводиться при збільшених швидкостях руху промивною рідиною крізь канали мембранних фільтраційних елементів, чим забезпечується «вимивання» частинок концентрату з пор і їх видалення з каналу мембранних фільтраційних елементів, можливе використання «зворотного» промивання з використанням хімічних розчинів. Внаслідок цього мембрани можуть змінювати як свої фізико-механічні властивості, так і експлуатаційні [49].

Перевагами такого способу концентрування є:

- висока продуктивність;
- можливість відновлення фільтраційних властивостей при регенерації мембрани, в тому числі способом зворотного промивання;
- можливість багаторазової стерилізації паром або хімічними реагентами;
- фільтрування високов'язких середовищ;
- висока температура експлуатації до 400 °С;
- стійкість в агресивних середовищах [29].

Втрати ферментів на даній стадії складає 2%.



Рис. 5.2. Установка тангенціальної фільтрації

### **Вибір способу виділення ферменту з концентрату**

Наступним етапом виділення цільового продукту є осадження, за класично прийнятою методикою застосовують органічні розчинники, або неорганічні солі (висолювання) [47, 48, 49].

Пектолітичні ферменти можна отримувати шляхом висолювання сульфатом амонію. Після концентрування ми отримаємо приблизно 555 л концентрату (див. табл. 5.1, стор. 70). Для забезпечення висолювання слід створити насичення сіллю до 90 %, при цьому в препарат переходить від 20 до 80 % від маси осаду. Такий препарат буде потребувати додаткових стадій очищення, наприклад видалення залишків солі зворотнім осмосом, що призведе до збільшення технологічних стадій та вартості кінцевого продукту [51, 54].

Ще однією складністю при висолюванні є процес внесення солі. Сіль необхідно подрібнити на вносити невеликими порціями за постійного перемішування. Після внесення солі слід продовжити перемішування ще 20-40 хв. Процес формування осаду триває від 40 хв до декількох годин [51]. Також відпрацьований сольовий розчин буде потребувати подальшої

переробки.

При додаванні до розчину ферменту органічного розчинника (етанолу, метанолу, ізопропанолу, ацетону і ін.) кількість вільної води зменшується. При цьому, як і при висолюванні, руйнується оболонка гідрату білка, і він випадає в осад. Для виробництва пектолітичних ферментних препаратів з індексом Г10х зазвичай використовується етиловий спирт. При постійному перемішуванні концентрату у нього додавали етиловий спирт у співвідношенні 1:3 [54].

На процес осадження ферментів органічними розчинниками істотно впливає температура. В більшості випадків цей процес проводять при температурі від 0 до 5°C; для цього водний розчин ферменту охолоджують до 1—2°C, а розчинник – до температури (– 5) — (– 10)° С з урахуванням того, що при змішуванні води із спиртом суміш нагрівається. Підвищення температури приводить до денатурації багатьох ферментів, оскільки їх термолабільність при додаванні органічних розчинників сильно зростає [55, 56].

Для осадження пектолітичних ферментів ми плануємо використовувати етиловий спирт у співвідношенні 1:3. Температуру при цьому будемо підтримувати на рівні 10° С.

### **Обґрунтування способу відділення ферментного осаду**

Після осадження одержану суміш відправляють на розділення. Можливість використання центрифугування, обмежується виробом сушильної установки – розпилювальна сушарка, що для неї необхідно використовувати рідку фазу. На сепараторі відділяється водно-спиртова суміш і подається на регенерацію спирту, що дозволяє економити ресурси підприємства. Застосовується сепаратор типу ВСМ, що класично використовується у всіх технологіях одержання ферментних препаратів [52].

Сепарація – це розділення сумішей різнорідних частинок твердих матеріалів, рідин різної густини, емульсій, завислих твердих частинок або крапельок у газах, парі, двофазних середовищах.

Сепаратори (Рис. 5.3) використовуються для розділення, концентрування, очистки, освітлення, для постадійної обробки рідини.

При виборі типа сепаратора необхідно визначити його технологічне призначення.

Поділяються на три групи:

1) сепаратори - розділювачі – для розділення суміші взаємонерозчинних речовин і для концентрування чи згущення суспензії та емульсії.

2) сепаратори-освітлювачі – для виділення твердих суспензій із рідини( наприклад відділення ферментів після осадження)

3) комбіновані сепаратори – для одночасного чи послідовного виконання двох чи більше операцій переробки рідкої суміші.

Найбільше застосування в ферментній промисловості отримали сепаратори-освітлювачі.

Сепаратори-освітлювачі діляться на два типи:

1) Сепаратори тарільчасті – для розділення суспензії з невеликою різницею в співвідношенні густини розділювальних фаз

2) Сепаратори багатокамерні – для розділення суспензії із значною різницею в співвідношенні густини.

Тривалість робочого циклу сепарації залежить від концентрації зважених частин в вихідному продукті і потужності сепаратора по даному продукту.



Рис. 5.3. Загальний вид сепаратора

Відпрацьований спирт направляють в відділення регенерації, де його міцність доводять на ректифікаційних апаратах до 96,5% об. Ферментний осад, вивантажений з сепаратора, направляють в змішувач, де знову обробляють спиртом (96,%) і суміш повторно направляють на сепаратор. Висушений ферментний осад поступає на сушку.

Втрати ферментів на стадії осадження спиртом, розділення осаду і водно-спиртової суміші, обробки ферментного осаду спиртом, вторинне розділення осаду і спирту досить великі і складають 25%. Після сепарування на піддони вивантажуємо, а тільки потім на сушіння [29].

### **Вибір способу отримання сухого препарату**

Остання стадія виділення ферментного препарату – сушіння. Сухі ферментні препарати пектиназ з осаджених спиртом осадів раціонально отримувати шляхом сушіння.

У біотехнологічній промисловості застосовується значна кількість самих різноманітних типів сушарок, які класифікуються за своїми конструктивними і технологічними признаками:

- за режимом роботи - періодичної і безперервної дії;
- за видом теплоносія - нагріте повітря, димові гази або перегріта пара;
- за способом підведення теплоти - кондуктивні, конвективні і радіаційні;

- за тиском в сушильній камері - атмосферні і вакуумні;
- за взаємним рухом теплоносія і вологого матеріалу - прямотечійні, протитечійні і з перехресним потоком;
- за конструкцією сушильної ємності - барабанні, камерні, шахтні, стрічкові, з киплячим шаром і розпилюючі.

Більш продуктивніша сушарка розпилюючого типу. Вона сприяє досягненню високої якості висушеного матеріалу, забезпечує збереження його природних властивостей та зменшує енергомісткість сушіння. Розпилювальна сушка - один з основних методів отримання сухих продуктів в харчовій промисловості.

При розпилюючому сушінні продуктів використовують три методи розпилення: механічними форсунками, пневматичними форсунками та відцентровими дисками. При механічному розпиленні рідина, що диспергується подається в форсунки під значним тиском. Призначення форсунки полягає в тому, щоб розбити рідину на малесенькі краплинки. Для цього струмінь газу пропускається через отвір дуже маленького діаметра. Крім того, за допомогою форсунок струменню надається обертовий рух, що забезпечує розпилення рідини. При пневматичному розпиленні рідини стиснене повітря або пара з надмірним тиском допомагаю розпилювати рідину. Для розпилення рідини у відцентрових розпилювачах продукт подається в швидкообертовий диск, де він під дією відцентрової сили розприскується і диспергується.

Сушарка являє собою циліндричну камеру великого обсягу. Продукт розпорошується за допомогою механічних або пневматичних форсунок, відцентрових дискових або ультразвукових розпилювачів.

Однак, при застосуванні розпилювальної сушарки спостерігається значна інактивація ферментів (на 20-40%). Для попередження інактивації осад перед сушінням розчиняють у мінімальній кількості води (1:5), додають наповнювач (хлористий натрій) та стабілізатор (сірчаноокислий аммоній). Потім такий розчин сушать розпилюванням. За температурного режиму

сушильного агента 130 °C на вході і 50°C на виході, таким чином втрати пектолітичних ферментів не перевищують 4-6% на цьому етапі [35].

У кондуктивних сушарках теплота для висушування матеріалу передається шляхом контакту його з нагрітою поверхнею, а в конвективних - теплота передається безпосередньо від теплоносія до матеріалу. При цьому видаляється волога, зв'язана з матеріалом, за рахунок механічних і фізико-хімічних сил. Хімічно зв'язана волога не видаляється у зв'язку з руйнуванням матеріалу.

Барабанні та стрічкові сушарки використовуються в основному для сушіння лише сипучих матеріалів. У мікробіологічній промисловості цей вид сушарок широко використовується для сушки поверхневих культур мікроскопічних грибів. У переважній більшості - це атмосферні сушарки, в яких теплоносієм є нагріте повітря або димові гази. Саме ці барабанні сушарки, що працюють при атмосферному тиску. Застосовують для сушки ферментних препаратів, органічних кислот та інших продуктів мікробіологічного синтезу. До переваг барабанних сушарок можна віднести те, що тут спостерігається порівняно невелика втрата ферментативної активності 10-15%, а суттєвими недоліками є низький коефіцієнт заповнення сушарки (0,2-0,25), великі габарити та мала виробнича потужність.

Стрічкові сушарки теж мають великі габарити, до того ж у такій сушарці кожна стрічка використовується тільки на половині її довжини, нижні ж ділянки рухаються без продукту. До переваг такої сушарки можна віднести велику виробничу потужність та простоту обслуговування.

Шахтні сушарки належать до установок безперервної дії. Тут теплоносії і вологий матеріал рухаються у протилежних напрямках. Сушарки цього типу працюють на топкових газах або на гарячому повітрі. Дану сушарку складно обслуговувати, до того ж, щоб отримати необхідний порошок готового продукту потрібно встановлювати допоміжне обладнання розраховане на подрібнення гранул.

Камерні сушарки представляють собою камеру з розміщеними у ній

коліями, по яких рухаються вагонетки. Вагонетки з вологим матеріалом поступають у камеру, повітря всмоктується вентиляторами і через підігрівачі поступає в сушарку, а у кінці тунелю матеріал охолоджується атмосферним повітрям. Основний недолік камерних сушарок – це довго тривалість процесу сушіння (10-12 год), що призводить до великої втрати активності готового продукту.

Сушіння продуктів у киплячому шарі полягає у тому, що коли через шар зернистого матеріалу, який знаходиться на решітці, пропускати з певною швидкістю повітря, то шар спочатку розпушується, а потім переходить у стан, що нагадує киплячу рідину. У цьому стані шар інтенсивно перемішується, завдяки чому всі частинки матеріалу омиваються теплоносієм. Внаслідок чого, вирівнюється температура у всьому об'ємі, що особливо важливо при висушуванні мікробіологічних препаратів. Переваги способу висушування матеріалу у сушарки з киплячим шаром наступні: простота конструкції апарату, висока продуктивність та відносно короткий термін сушіння. Основний недолік - це можливість комкування матеріалу у вологому стані.

Сублімаційна сушка у мікробіологічних виробництвах застосовується для високо термолабільних мікроорганізмів, дріжджів, антибіотиків, вітамінів та ферментів. При 0°C колоїдна система матеріалів, в тому числі та їх волога, замерзає і надалі проходить сублімація, тобто випаровування твердого тіла без його розплавлення. У цьому випадку з твердого агрегатного стану вода переходить у паровий, проминувши рідку фазу. При такому способі сушіння молекулярна структура матеріалу зберігається майже без змін і висушений матеріал характеризується доброю дисперсністю і пористістю, тоді як при звичайному сушінні відбувається значне зменшення об'єму його. Продукти, висушені способом сублімації, зберігають первісний об'єм, колір, смак, запах, біологічну цінність, активність значно краще, ніж за інших способів висушування. Проте цей метод сушіння є дуже енергоємним, що значно підвищить вартість кінцевого продукту.

Взагалі, сублімаційна сушка дозволяє забезпечити асептичні умови під час процесу, тому вона набуває найбільше розповсюдження у медичній промисловості.

Для нашого виробництва обираємо сублімаційну сушарку, продуктивністю по випареній волозі 20 кг/год. Робочий тиск 98-190 кПа. Тривалість висушування становить 4 год.



Рис. 5.4. Вакуумна сушарка сушарка

### **Обґрунтування способу подрібнення базового продукту**

Після сушіння продукт знаходиться на піддонах у вигляді грудкоподібної маси, яка потребує додаткового подрібнення. Процес подрібнення в технології отримання сухих ферментних препаратів є одним з фінішних процесів отримання кінцевого продукту.

Подрібненням називають процес руйнування твердого матеріалу під дією зовнішніх сил. В технології отримання ферментних препаратів зазвичай використовується не подрібнення, а помел – тонке дроблення твердого матеріалу (менше ніж 5 мм) зі ступенем подрібнення від 50 до 100.

Процес механічного подрібнення твердих речовин може бути представлений дробленням або помелом.

#### *Барабанні кулькові млини*

##### Переваги

- надійність роботи;
- просте обслуговування;
- універсальність

##### Недоліки

- забруднення матеріалу;
- шум під час роботи;
- громіздкість обладнання;

#### *Штифтові млини*

##### Переваги

- спеціальні конструкції, що призначені для помелу термолабільних матеріалів;
- можливість проведення процесу в асептичних умовах;

##### Недоліки

складність конструкції;

#### *Дисмембратори*

##### Переваги

- висока швидкість дії на подрібнючий матеріал;
- швидке відведення тепла від взаємодіючих речовин;
- простота конструкції

##### Недоліки

- не цілком раціональна подача матеріалу,
- подрібнюючого продукту в обсяг між дисками з подрібнюючими елементами

Порівнявши можливі способи подрібнення обираємо дисмембратор для подрібнення комплексного ферменту, тому що можна досягати товщини

подрібнення, які відповідають вимогам технологічного процесу; можливість подрібнення матеріалів з вологістю до 8-10%.

### **Пакування, фасування та маркування цільового продукту**

Сухий ферментний препарат фасують у поліетиленові мішки по 0,2 кг або за бажанням замовника. Використовують поліетилен для кращого збереження властивостей продукту, аби запобігти небажаному зволоженню та втраті активності. Для цього використовують лінії для дозування, фасування, пакування та транспортування типу В6-ВФА або В6-ВРА. Автоматичні лінії встановлюють у фасовочному відділенні з температурою повітря 18-30°C і відносній вологості повітря не більше 75%. Автомат складається з комплексу механізмів, які здійснюють ряд послідовних операцій, починаючи від дозування і закінчуючи пакуванням продукту. Також на мішки наклеюють етикетки з відповідним маркуванням продукту та інструкцією до застосування. Після виконання цих операцій наповнений продуктом мішок затягується, зашивається, зіштовхується з автомата та транспортується на склад готової продукції. Мішки упаковують в дощаті ящики або жестяні банки [39].

### **5.3. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях**

*Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:*

1. Оброблення культуральної рідини
2. Відділення клітин від культуральної рідини
3. Концентрування фільтрату
4. Осадження ферментів
5. Відділення ферментного осаду
6. Сушка осаду
7. Подрібнення висушеного продукту
8. Стандартизація, розфасовка та упаковка препарату.

*Вихідні дані:*

- a. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації –  $V_{кр} = 6,4 \text{ м}^3$ ;
- b. Концентрація цільового продукту у КР  $C_{ферм} = 3 \text{ г/л} (= 3 \text{ кг/м}^3)$ ;
- c. Концентрація біомаси у КР  $C_{БМ} = 2 \text{ г/л} (= 2 \text{ кг/м}^3)$ ;
- d. Втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 25%:
  - початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає  $6,4 \text{ м}^3 \times 3 \text{ кг/м}^3 = 19,2 \text{ кг}$ ;
  - кінцева кількість (з урахуванням 25 % втрат) буде становити 14,4 кг.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 1.1.

Таблиця 5.1.

## Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 25 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 6 Оброблення культуральної рідини</b>						
1	ТП 6.1. Оброблення культуральної рідини соляною кислотою	КР	6,4 м <sup>3</sup>	-	7 м <sup>3</sup>	Реактор 8 м <sup>3</sup>
		Кислота соляна 35 %-а	0,6 м <sup>3</sup>	-		
<b>ТП 7. Відділення біомаси</b>						
2	ТП 7.1. Центрифугування	Біомаса	12,8 кг (6,4×2) - АСБ, з урахуванням 90% вологості 1152 кг	57,6 кг (5%)	1094,4 кг	Центрифуга продуктивністю 3 м <sup>3</sup> /год
		Фугат		-	5848 л (7000-1152)	Збірник фугату об'ємом 6 м <sup>3</sup>
<b>ТП 8. Концентрування</b>						
	ТП 8.1. Ультрафільтрація ферментного комплексу	Фугат	5848 л	292,4 л (5 %)	5000,1 л (5555,6-555,5)	На знешкодження
		Концентрат		-	Згущення в 10 разів 555,5 л	Збірник концентрату об'ємом 1 м <sup>3</sup>

<b>ТП 9. Осадження</b>						
	ТП 9.1. Осадження ферментів спиртом	Концентрат	555,5 л	-	Суміш 2400,66 л	Реактор об'ємом 3 м <sup>3</sup>
		Спирт етиловий	1850,16 л	-		
<b>ТП 10. Відділення осаду</b>						
	ТП 10.1. Сепарація	Суміш	2400,66 л	5 % 120 л	2280,66 л	Сепаратор продуктивністю 1000 л/год
		Осад			284 кг	
		Збіднений розчин			1996,66 л	
<b>ТП 11. Сушіння</b>						
3	ТП 11.1. Сушіння у вакуум сушильній шафі	Вологий осад (вологість 90%)	284 кг	2,84 кг (1%)	317,6 кг	Сушарка сублимаційна з камерою завантаження 300 кг
		Сухий порошок			15,2 кг	
		Волога			269,8 кг	
<b>ТП 12. Подрібнення порошку</b>						
	ТП 12.1. Подрібнення в дисмембраторі	Сухий порошок	15,2 кг	7,5 % 1 кг	14,2 кг	Дисмембратор продуктивністю 50 кг/год
<b>ПМВ 13. Пакування, маркування, відвантаження</b>						
10	ПМВ 13.1. Фасування, пакування, маркування препарату	Висушений порошок (вологість 12%)	14,2 кг	-	14,2	Робоча поверхня для пакування у вологонепроникні металізовані тришарові поліетиленові упаковки
		Упаковки по 200 г	-		71 пакет по 200 г.	

## РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д3 Д12 Д15 Д25 Д28 Д44	Об'ємно- ваговий дозатор	6	Мікродозатор шнековий малих добавок ДМД 50. Виробник: МП СтройМеханика (Росія). Регулювання оборотів шнека дозатора здійснюється за допомогою електронного перетворювача частоти електричного струму. Складається: корпус гвинта дозування з фланцем, витратний бункер, дозуючий гвинт з лопатями і пологим кроком витків, підшипник вузла, мотор- редуктор, пластина з отворами, пульт управління. Кількість дозуючих гвинтів - 1, потужність мотору - 0,75 кВт, напруга – 380 Вт. Діаметр дозуючого гвинта - 60 мм. Частота електричного струму - 10 - 50 Гц. Кількість бункерів - 1 шт, кількість виходів для матеріала - 1 або 2. Температура використовуваних матеріалів - від - 5 до 40°С. Щільність матеріалу для дозування не більше 3 000 кг/м <sup>3</sup> . Габарити: 820(L)x410(B)x575(H), маса: 39,5 кг. Продуктивність - 195 - 970 г/хв [60].
Д17 Д21 Д40	Об'ємно- ваговий дозатор	3	Мікродозатор MBF. Виробник: WAM Ukraine. Складається: з корпусу з конструкційного полімеру SINT, армований сталлю (опційно: корпус повністю з нержавіючої сталі), горизонтально встановлений ворошитель, шнековий живильник, встановлений під ворошителем, трубчастий корпус живильника, що закриває виступаючу частину, незалежні приводи для ворошителя і шнека. Три типорозміри - 3 дм <sup>3</sup> /год до 4000 дм <sup>3</sup> /год. Точність зважування - 0,1%. Автоматичне обнуління тари [61]

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дзуман Д.В.						
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.						<b>Кафедра БТМ</b>		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

СМ-1	Сіп-мийка	1	СІП-мийка «САТТИ-СІП». Виробник: «Attic» (Україна). Апарат може містити з 3 до 6 ємностей - холодна вода, гаряча вода, кислотний миючий розчин, лужний миючий розчин, ємність для збору води для ополіскування, ємність для нейтралізації мийних розчинів. Кожний контур комплектуваний: насосом з частотним керуванням подачі, підігрівачем миючих розчинів, витратоміром, запірною і запірно-регулюючою арматурою з пневмоприводами, контрольно-вимірювальною апаратурою. Особливості: багаторазове використання миючих розчинів, одночасно миття кількох об'єктів, збір води для ополіскування, підтримка темп. і концентрації миючих розчинів, нагрівання води в малому контурі економить час, воду і енергію, індивідуальні програми мийки для різних об'єктів, функція зворотного зв'язку з об'єктами мийки [62].
Н20	Насос відцентровий	1	Насос Grandfar СРт 130. Виробник: Огапёфag (Китай). Обмотки статора: мідь, вал двигуна: нержавіюча сталь АШ 304, робоче колесо - латунь, вбудований термозахист, низький рівень вібрації і шуму, високоякісні підшипники. Вага - 9 кг, максимальний напір - 22 м. Потужність 370 Вт. Розміри - 285x185x230 мм. Максимальна температура - 120оС, продуктивність 204 л за 3 хв [63].
Н24	Насос відцентровий	1	Насос Grandfar СРт 130. Виробник: Огапёфag (Китай). Обмотки статора: мідь, вал двигуна: нержавіюча сталь АШ 304, робоче колесо - латунь, вбудований термозахист, низький рівень вібрації і шуму, високоякісні підшипники. Вага - 9 кг, максимальний напір - 22 м. Потужність 370 Вт. Розміри - 285x185x230 мм.

			Максимальна температура - 120°C, продуктивність 103 л за 1,5 хв [64].
H27	Насос відцентровий	1	Насос Grandfar CPт 130. Виробник: Ogaņeřar (Китай). Обмотки статора: мідь, вал двигуна: нержавіюча сталь АІШ 304, робоче колесо - латунь, вбудований термозахист, низький рівень вібрації і шуму, високоякісні підшипники. Вага - 9 кг, максимальний напір - 22 м. Потужність 370 Вт. Розміри - 285x185x230 мм. Максимальна температура - 120°C, продуктивність 205 л за 3 хв [65].
H42	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос Reęo11o CP 210B. Виробник: Reęo11o (Італія). Обмотки статора: мідь, вал двигуна: нержавіюча сталь AISI 304. Частота електроживлення - 50 Гц. Напір горизонтальної ділянки - 530 м, захист IP55. Глибина виробу - 402 м, типустановки - горизонтальний. Вага виробу - 30 кг, максимальний гідравлічний напір - 53 м. Напруга електроживлення - 380 В, а потужність двигуна - 3 кВт. Продуктивність - 6,2 м3 за 21 хвилину [66].
H47	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Pedrollo JDWm 2 / 30-4. Виробник: Pedrollo (Італія). Корпус насоса - чавун, патрубки з різьбою ISO 228/1, корпус ежектора: чавун. Ведучий вал: нержавіюча сталь EN 10088-3 - 1.4104, механічнеуцільнення: кераміка - графіт - NBR. Ступінь захисту IP 44. Напруга - 220 В. Тип установки - горизонтальний. Вага виробу - 24,6 кг, максимальний гідравлічний напір - 53 м. Напруга електроживлення - 220 В, а потужність двигуна - 1,1 кВт. Частота тока - 50 Гц. Температура перекачуючої рідини -10 до +40°C. Клас ізоляції - F. Висота всмоктування - 45 м. Продуктивність - 20 л за 1 хвилину [67].

ПЗ2	Повітро-забірник	1	Обладнений металевою сіткою для видалення механічних забруднень [68]
Ф3	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр ФМ 480/10. Виробник: «Уралкомпресормаш», Росія. Продуктивність - 8 000 л, тиск - 10 Бар. Площа фільтрації 3 м <sup>2</sup> , корпус нержавіюча сталь, матеріал - волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е = 90 %. Габарити 350x250x1040 мм. Маса - 35 кг [69].
К4	Компресор	1	Компресор С412М. Виробник: Бежецький завод АСО, Росія. Тип: поршневий, горизонтальний. Пропускна здатність вхідна 360 л/хв, вихідна - 250 л/хв. Робочий тиск компресора 10 Бар. Потужність - 2,2 кВт. Габарити: 750x400x500 мм. Матеріал: високоякісна нержавіюча сталь. Тип мастила: масляний. Кількість циліндрів - 2, ступінь стиснення - 1. Рівень шуму - 93-100. Маса - 72 кг [70].
Т5	Теплообмінник охолоджувач	1	Осушувач BERG OB 4. Виробник: BERG, Тайвань. Матеріал: високоякісна нержавіюча сталь. Продуктивність - 750 л/хвилину. Робочий тиск - 13 Бар, температура навколишнього середовища - точка роси +3°C. Габарити: 640x380x750 мм, підключення до мережі - 220 В та 50 Гц. Потужність 0,3 кВт, маса - 44 кг [71].
Р6	Ресирвер		Ресирвер вертикальний серії РВ 110/10. Виробник: Бежецький завод АСО, Росія. Тип: вертикальний. Продуктивність - об'єм 110 л в хвилину. Робочий тиск 10 Бар. Включає манометр та охоронний клапан. Матеріал: нержавіюча сталь з кольоровим порошковим покриттям. Габарити: 600x600x1000, маса - 70 кг [72]
Т7	Теплообмінник нагрівач		Теплообмінник КВ 3000. Виробник: Мануфактур, Україна. Монтажний розмір 1000 на 500 мм, довжина - 200 мм, муфтове

			приєднання труб. Кількість повітря - 7500 м <sup>3</sup> /годину, робочий тиск - 12 бар. Матеріал: високоякісна антикорозійна сталь. Необхідна теплова потужність 80 кВт (від - 100°C до + 200 °C
Ф8	Фільтр головний		Є4. Виробник: Україна. Фільтруючий матеріал - целюлоза або базальтові волокна, скло або мікрволокно. Перепад тиску - 250 Па. швидкість фільтрування 0,1 м/с, середня утримуюча здатність E = 99%. Габарити: ширина - 490, висота - 592 [67].
P11	Реактор змішувач		Збірник середнього тиску об'ємом 25 л. Виробник: виконаний на замовлення в Pore Scientific (США). Робочий об'єм 20 л, габарити: ширина 0,5 м, висота - 1 м. Матеріал: нержавіюча антикорозійна сталь AISI 316 та сплави, титан. Робочий тиск: -1.. .15 Бар. Кількість фланців: до 9. Внутрішня поліровка - зеркальна. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Швидкість обертів - 50.1000 об/хв. Мішалка: якірна, проперлерна. Манометр - аналоговий, тиск - 1 Бар. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений сорочкою, пробовідбірником [74].
P14	Реактор змішувач	1	Збірник середнього тиску об'ємом 15 л. Виробник: виконаний на замовлення Pore Scientific (США). Робочий об'єм - 10 л габарити 0,2 на 0,4 м. Матеріал: нержавіюча антикорозійна сталь AISI 316 та сплави, титан. Робочий тиск: -1.15 Бар. Кількість фланців: до 9. Внутрішня поліровка - зеркальна. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Швидкість обертів - 50.1000 об/хв. Мішалка: якірна, проперлерна. Манометр - аналоговий, тиск - 1 Бар. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений

			сорочкою, пробовідбірником [75].
P16	Реактор змішувач	1	Збірник середнього тиску об'ємом 25 л. Виробник: виконаний на замовлення в Pore Scientific (США). Робочий об'єм 20 л, габарити: ширина 0,5 м, висота - 1 м. Матеріал: нержавіюча антикорозійна сталь AISI 316 та сплави, титан. Робочий тиск: -1.15 Бар. Кількість фланців: до 9. Внутрішня поліровка - зеркальна. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Швидкість обертів - 50.1000 об/хв. Мішалка: якірна, проперлерна. Манометр - аналоговий, тиск - 1 Бар. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений сорочкою, пробовідбірником [73].
P19	Реактор змішувач	1	Збірник СЕнв 0,25. Виробник: завод «Красный Октябрь», реалізатор ООО «ЭкоХимМаш» (Росія). Робочий об'єм 220 л, габарити: ширина 1000 мм, висота 1800 мм. Матеріал: склоемалеве покриття зі сколами. Маса - 480 кг. Тип ущільнення валу - сальникове. Швидкість обертів - 50. 500 об/хв. Робочий тиск: до 20 Бар. Кількість фланців: до 7. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Тип мішалки: якірного типу. Потужність електродвигуна - 3 кВт. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений сорочкою, пробовідбірником, манометром, датчиком температур [74].
P23	Реактор змішувач	1	Збірник 150 л. Виробник: КоролевФармТех (Росія). Робочий об'єм 130 л, габарити: ширина 800 мм, висота 1500 мм. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L. Маса - 390 кг. Швидкість обертів - 50.400 об/хв. Робочий тиск: до 20 Бар. Кількість фланців: до 9. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування,

			вибухозахищений двигун. Тип мішалки: якірного або шнекового типу. Потужність електродвигуна - 3,5 кВт. Датчик температур - pt120. Оснащений сорочкою, пробовідбірником, манометром, датчиком температур [74].
P26	Реактор змішувач	1	Збірник СЕнв 0,25. Виробник: завод «Красный Октябрь», реалізатор ООО «ЭкоХимМаш» (Росія). Робочий об'єм 220 л, габарити: ширина 1000 мм, висота 1800 мм. Матеріал: склоемалеве покриття зі сколами. Маса - 480 кг. Тип ущільнення валу - сальникове. Швидкість обертів - 50... 500 об/хв. Робочий тиск: до 20 Бар. Кількість фланців: до 7. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Тип мішалки: якірного типу. Потужність електродвигуна - 3 кВт. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений сорочкою, пробовідбірником, манометром, датчиком температур [75].
P29	Реактор змішувач	1	Збірник середнього тиску об'ємом 25 л. Виробник: виконаний на замовлення в Pure Scientific (США). Робочий об'єм 20 л, габарити: ширина 0,5 м, висота - 1 м. Матеріал: нержавіюча антикорозійна сталь AISI 316 та сплави, титан. Робочий тиск: -1.15 Бар. Кількість фланців: до 9. Внутрішня поліровка - зеркальна. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Швидкість обертів - 50.1000 об/хв. Мішалка: якірна, проперлерна. Манометр - аналоговий, тиск - 1 Бар. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений сорочкою, пробовідбірником [80].
P41	Реактор змішувач	1	Збірник СЕнв 6,3. Виробник: виконаний на замовлення ГК ЕВРОХИММАШ К.О. (Україна). Робочий об'єм 6 200 л, габарити: ширина - 2 200 мм, висота 3 600 мм.

			Виготовлений з нержавіючої сталі AISI 316 та покритий емаллю. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, швидкість обертів - 50.500 об/хв. Робочий тиск: -1.15 Бар. Кількість фланців: до 5. Маса дорівнює 2 950 кг. Оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 200 об/хв, пробовідбірником та датчиком температури [75].	
Н47	Реактор змішувач	1	Збірник середнього тиску об'ємом 25 л. Виробник: виконаний на замовлення в Pore Scientific (США). Робочий об'єм 20 л, габарити: ширина 0,5 м, висота - 1 м. Матеріал: нержавіюча антикорозійна сталь AISI 316 та сплави, титан. Робочий тиск: -1.15 Бар. Кількість фланців: до 9. Внутрішня поліровка - зеркальна. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Швидкість обертів - 50.1000 об/хв. Мішалка: якірна, проперлерна. Манометр - аналоговий, тиск - 1 Бар. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений сорочкою, пробовідбірником [75].	
Ф10 Ф18 Ф31 Ф34 Ф37 Ф45 Ф49	Ф13 Ф22 Ф32 Ф35 Ф38 Ф48	Індивідуальні фільтри	13	Індивідуальні мембранні фільтри F 0460. Виробник: ОМІ (Італія). Габарити: довжина - 485, ширина - 240, висота - 1265. Маса - 125 кг. З'єднання - DN100. Максимальна температура середовища - 25оС, робочий тиск - 7 БАР. Видалення частинок до 1 мікрона - 0,1 мг/м3. Швидкість потоку - 46 000 л/хвилину [76]
УБС43	Установка безперервної стерилізації	1	Потужність - 5 м3. Виробник: виготовлений на замовлення (Україна). Матеріал: виготовлений з антикорозійної сталі. Оснащений інокулятором, компресором, теплообмінником-нагрівачем, 2 додатковими теплообмінниками, індивідуальним фільтром та насосами.	

ІН33	Інокулятор	1	<p>Біореактор Pro-Lab 12 л. Виробник: ООО «БИОТЕХНО» (Росія). Робочий об'єм 10 л, габарити: ширина - 0,2 м, висота - 0,45 м. Матеріал: посудина - нержавіюча сталь 316 L. Контролюється до 8 параметрів: перемішування, температура, рН, рО<sub>2</sub>, піногасник, рівень, ОВП (окислювально-відновний потенціал), оптична щільність та інше. У біореакторі встановлений двигун для перемішування з магнітним ущільнювачем від 100 об/хв до 1000 об/хв Спін-фільтр для перфузійних процесів. Оснащена подвійною сорочкою для температурного контролю, оглядовим склом з підсвіткою на кришці. 5 бокових портів, діаметр 25 мм для подачі повітря, 5 портів знизу апарата. Присутній зливний клапан та для пробовідбірника. Встановлена головка для СІР-мийки. Мішалки Роштона, конденсор 15 л/хв. Тиск - 2 - 7 Бар. Потужність мотора 200 В, 50 Гц. Основа програмного забезпечення С-ВІО2 [77].</p>
ІН36	Інокулятор	1	<p>BioFlo 120 - лабораторний універсальний. Виробник: «ЛАБИНСТРУМЕНТЫ» (Росія). Робочий об'єм 100 л, розміри: ширина 24,7 см, висота 62,9 см. Маса - 14,8 кг. Дисплей - 18 см, "touchscreen", порти 2xШВ, Ethernet, 3 аналогових. Електроспецифікація: 208 - 240 В, 60 Г, 20 А, одна фаза. Перемішування: прямий привід 25 - 1200 об/хв, магнітний привід. Температура: водяна подвійна рубашка - від 5°C вище температури холодоагенту до 45°C вище температури навколишнього середовища) (доступний діапазон: 0-70°C), температурний датчик - Pt100. Аерація: контроль 1 TMFC (0,04 - 20 л / хв) або 1 ротаметр, барботер – кільцевий або мікробарботер. Датчики: рН - аналоговий або цифровий, Mettler Toledo ISM, 2-12 рН;</p>

			розчиненого кисню (DO) - аналоговий або цифровий, Mettler Toledo ISM, 0-200%; оптичний DO – цифровий Mettler Toledo ISM, 0-200%; Redox - аналоговий або цифровий, Mettler Toledo ISM, -2000 мВ - +2000 мВ; CO2 – цифровий Mettler Toledo ISM, 0-100%. Мішалки (прямий і магнітний приводи) Rushton-type, Pitchedblade, Marineblade і Spinfilter. Присутній зливний клапан та для пробовідбірника. Встановлена головка для СІР-мийки [78].
ІНЗ9	Інокулятор	1	Біореактор 1200 л. Виробник: «БИОТЕХНО» (Росія). Робочий об'єм 800 л, матеріал - нержавіюча сталь марки 316L (для частин, що контактують з продуктом), нержавіюча сталь марки 304L (для частин, що не контактують з продуктом). Матеріал ущільнень EPDM. Розрахунковий тиск ємності - 3,0 кг/см <sup>3</sup> , тиск сорочки - 4,0 кг/см <sup>3</sup> . Діапазон температури від 10 до 135°C, присутня головка для СІР-мийки. Обробка поверхонь - внутрішня полірування 0,4 т + електрополіровка, зовнішня полірування 1,2 т, кришка - електропідйомник кришки. Порти та ємності: зверху - порт для мембранного манометра, порт для мембранного передавача тиску, випуск та конденсор відпрацьованих газів, оглядове скло, порт для датчика піни, запасний порт; верхні бічні стінки - подача газової суміші, оглядове вікно, подача культуральної рідини, кільцевий барботер, запасний порт; нижні бічні стінки - порт для резисторного датчика температури РТ100, порт для датчика рН, порт для датчика CO2, порт для пробовідборника, запасний порт. Сорочка - подача пари/вихід технічної води, вихід пари/подача технічної води. Перемішування: нижній магнітний привід, двигун постійного току 380 В, 3 Ф, 50 Гц, змінні мішалки.

			<p>Механізм аерації: автоматична подача газової суміші 2 УУМ, 5 "високоєфективний фільтр 0,2 т і корпус фільтра з нержавіючої сталі марки 316L, контролер масової витрати повітря, контролер масової витрати CO<sub>2</sub>, контролер масової витрати O<sub>2</sub>. Контроль тиску: манометр, позиціонер, датчик тиску, клапан контролю. Датчик рН та кабель для датчика [79].</p>
Н51	Насос кулачковий	1	<p>Насос кулачковий БРЕСТМАШ НМ-03 3-х пелюстковий. Виробник: БРЕСТМАШ (Білорусь). Тип насосу: поверхневий, висота підйому - 50 м. Максимальний тиск в робочій камері - 2,5 БАР, потужність 2,2 кВт, горизонтальний. Напруга - В 380 - 440, максимальна температура - 90оС. Матеріал корпусу та вал двигуна - нержавіюча сталь. Продуктивність: 6 м3 за 30 хвилин [80].</p>
Ф50	Ферментер	1	<p>Ферментер об'ємом 12,5 м3 виготовляється на замовлення. Виробник: Solida Biotech (Германія). Матеріал - нержавіюча сталь марки 316L. Матеріал ущільнень EPDM. Розрахунковий тиск ємності - 3,0 кг/см3. Діапазон температури від 2 до 150°С, присутня головка для Сіп-мийки. Обробка поверхонь - внутрішня полірування 0,4 ^m + електрополіровка, зовнішня полірування 1,2 ^m, кришка -електропідйомник кришки. Порти та ємності: порт для мембранного манометра, порт для мембранного передавача тиску, випуск та конденсор відпрацьованих газів, оглядове скло, порт для датчика піни, подача газової суміші, подача культуральної рідини, кільцевий барботер, порт для резисторного датчика температури РТ 100, порт для датчика рН (12 мм, 19 мм або 25 мм роз'єми Інгольд, (різної довжини) PLC and SCADA), порт для датчика CO<sub>2</sub> (12 мм, 19 мм або 25 мм роз'єми Інгольд,</p>

			<p>(різної довжини) PLC and SCADA Software Control: через або в поєднанні з N<sub>2</sub>, повітрям, O<sub>2</sub> (витратомір або автоматичний масомірний датчик)). Сорочка - подача пари/вихід технічної води, вихід пари/подача технічної води. Швидкість обертання мішалки (об / хв): Стандартний діапазон 1 - 2000 об / хв регулюється відповідно до будь-якої необхідної завданням; Крильчатки: Раштон, якірна, з похилими лопатями, регульовані і знімні типи крильчаток. Також доступні спеціальні крильчатки. Механізм аерації: автоматична подача газової суміші 2 VVM, 5 "високоєфективний фільтр 0,2 <sup>^</sup>m і корпус фільтра з нержавіючої сталі марки 316L, контролер масової витрати повітря, контролер масової витрати CO<sub>2</sub>, контролер масової витрати O<sub>2</sub>. Контроль тиску: манометр, позиціонер, датчик тиску, клапан контролю. Відбір проб: Стерильна система відбору проб з фіксованою або регульованою по висоті трубкою для пробовідбору, що включає колби для зразків різного об'єму. Збір готового продукту: стерильна дренажна трубка або погрузна трубка з фіксованою або регульованою висотою; Рідкі добавки: Потрійні або поодинокі впускні отвори для додавання хімічних речовин (додаткові мікро-рідинні форсунки) [81].</p>
36 53, 36 55	Збірник	2	<p>Металева ємність для культуральної рідини, оснащена перемішуючим пристроєм з нижнім спуском [17]. Збірник СЕнв 0,25. Виробник: завод «Красный Октябрь», реалізатор ООО «ЭкоХимМаш» (Росія). Робочий об'єм 220 л, габарити: ширина 1000 мм, висота 1800 мм. Матеріал: скломалеве покриття зі сколами. Маса - 480 кг. Тип ущільнення валу -</p>

			сальникове. Швидкість обертів - 50... 500 об/хв. Робочий тиск: до 20 Бар.
Ц 55	Центрифуга	1	Горизонтальна металева ємність нержавіючої сталі [19]. Містить шнек, двигун асинхронний (потужність 5 кВт). Виробник: «ЛАБИНСТРУМЕНТЫ» (Росія). Робочий об'єм 100 л, розміри: ширина 24,7 см, висота 62,9 см. Маса - 14,8 кг. Дисплей - 18 см, "touchscreen", порти 2xШВ, Ethernet, 3 аналогових. Електроспецифікація: 208 - 240 В, 60 Г, 20 А, одна фаза. Перемішування: прямий привід 25 - 1200 об/хв, магнітний привід. Температура: водяна подвійна рубашка - від 5°C вище температури холодоагенту до 45°C вище температури навколишнього середовища) (доступний діапазон: 0-70°C), температурний датчик - Pt100.
УФ 56	Ультрафільтр - руюча установка	1	Керамічна мембрана розмір часток 0,5 мкм та тиском 3 МПа. мембранні фільтри F 0460. Виробник: OMI (Італія). Габарити: довжина - 485, ширина - 240, висота - 1265. Маса - 125 кг. З'єднання - DN100. Максимальна температура середовища - 25°C, робочий тиск - 7 БАР.
С-57	Сепаратор	1	Сепаратор фірми фірмою "Вестфалія з габаритами 975- 1190×500×780. Маса - 480 кг. Тип ущільнення валу - сальникове. Швидкість обертів - 50... 500 об/хв. Робочий тиск: до 20 Бар. Кількість фланців: до 7. Привід мішалки - зі зміною швидкості перемішування, вибухозахищений двигун. Тип мішалки: якірного типу. Потужність електродвигуна - 3 кВт. Датчик температур - pt100, 3-приводний. Оснащений сорочкою, пробовідбірником, манометром, датчиком температур [21]

ВСШ-59	Вакуум-сушильна шафа	1	Вакуум-сушильна шафа СВП 3000 фірми UOSLAB (Україна). Контроль тиску: манометр, позиціонер, датчик тиску, клапан контролю. Горизонтальна металева ємність нержавіючої сталі. Матеріал ущільнень EPDM. Розрахунковий тиск ємності - 3,0 кг/см <sup>3</sup> , тиск сорочки - 4,0 кг/см <sup>3</sup> . Діапазон температури від -40 до 85°C. [22]
Д - 60	Дисмембратор	1	Дисмембратор 630С фірми Контраплекс (Росія), продуктивністю 300 – 4000 кг/год. нержавіюча сталь АІШ 304, робоче колесо - латунь, вбудований термозахист, низький рівень вібрації і шуму, високоякісні підшипники. Вага - 9 кг, максимальний напір - 22 м. Потужність 370 Вт. Розміри - 285x185x230 мм. Максимальна температура - 120°C [23].
ФП-62	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина фірми Сервіс Пак (Україна). Продуктивністю 500 уп./год., масою до 5 кг у поліетиленові мішки [24].

## РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

### ДР1. Санітарна підготовка виробництва

#### ДР 1.1. Підготовка миючих засобів

ДР 1.1.1 Приготування 3% розчину Divosan Forte VT6 для миття виробничого обладнання.

Початковою стадією підготовки виробничого процесу є приготування миючих засобів. Для обладнання ми застосовуємо СІР-мийку (СМ-1), витрати на дезінфікуючих засіб становить лише 20% від загального об'єму миючого засобу. Необхідна концентрація Divosan Forte VT6 становить 3%, тому для повного виробничого процесу - 46 циклів, ми готуємо 443 м<sup>3</sup> миючого засобу (за розрахунком обладнання на всіх етапах виробничого біосинтезу). Розрахуємо кількість дез. засобу на 1 цикл (9,6 м<sup>3</sup>): використовуючи об'ємно-ваговий дозатор ми відміряємо 288 л розчину та 9,3 м<sup>3</sup> питної води для розведення. В процесі внесення води в СІР-мийку (СМ-1), суміш перемішують і через насос (Н) передають до ДР 1.3.1. У разі утворення відходів, їх відправляють на етап знешкодження до ЗВ.

#### ДР 1.2. Підготовка виробничого приміщення

##### ДР 1.2.1. Щоденне прибирання виробничого приміщення

Щоденне прибирання включає в себе дезінфекцію підлоги, стін спеціальним засобом кожний день перед біосинтезом. Для всіх цехів необхідна концентрація «Дезоксину» становить 10%, для забезпечення повного виробничого процесу - це 180 днів, потрібно приготувати на один день 2,5 л засобу. Для цього ми відміряємо 250 мл розчину «Дезоксину» і розводимо у відрі, до якого додаємо 2,25 л води. Отриманий розчин миючого та дезінфікуючого засобу Дезоксін ми використовуємо для обробки підлоги, також можна використовувати для миття зовнішньої поверхні обладнання,

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дзуман Д.В.						
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.			<b>Кафедра БТМ</b>			

комунікації та трубопроводи. Значення КУО повинно становити менше 800/см<sup>2</sup>. Відпрацьований розчин знешкоджується на етапі ЗВ.

*ДР 1.2.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень* Обробка стін, вікон, дверей проводять раз у 30 днів, загалом за весь період біосинтезу це 6 разів. Для генерального прибирання ми відміряємо 8 л купленого розчин «Дезоксіну», та розводимо у 73 л питної води. За 1 день кількість використаного миючого розчину становить - 13,4 л, для розведення будемо використовувати відро об'ємом 15. На такий об'єм ємності кількість засобу буде становити - 1,3 л, а питної води для розведення - 12 л. Під час роботи з цим дезінфікуючим засобом необхідно дотримуватись правил безпеки: використання захисних окулярів, спец-взутті та гумових рукавичках. КУО поверхонь < 300/м<sup>2</sup>. Рідкі відходи у вигляді відпрацьованого розчину зливається на знешкодження відходів до ЗВ.

### ***ДР 1.3. Підготовка виробничого обладнання***

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

Готовим розчином від *ДР 1.1.1.* ми промиваємо виробниче обладнання за допомогою установки СІР-мийки (СМ-1) протягом 15 хвилин при температурі 70 - 80°C. Цей етап створений для видалення білково-жирових забруднень різного походження. Відпрацьований миючий засіб повертається до спеціального збірника СІР-мийки (СМ-1) через фільтр (Ф) для подальшої обробки/очистки та використання. Після миття все обладнання ополіскується звичайною водою протягом 20 хвилин. Відпрацьована вода після ополіскування зливається в каналізацію і знешкоджується на ЗВ.

#### *ДР 1.3.2. Технічний огляд*

Перед процесом стерилізації проводять технічний огляд обладнання на вміст ущільнень, вм'ятин та інших різноманітних пошкоджень, що можуть призвести до негативних наслідків. Всі несправності одразу усувають інженери на виробництві.

#### *ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність*

У апарат подається стиснене повітря, тривалість процесу - 60 хвилин, тиск Р = 0,07 МПа. Особливість технології наведені в розділі 2. Фланцеві з'єднання

перевіряють за допомогою внесення у апарат мильної води, і пропускають повторно повітря. Відпрацьоване стиснене повітря та мильну воду відправляють на знешкодження газоподібних та рідких відходів до ЗВ.

#### *ДР 1.3.4. Стерилізація обладнання*

В сорочку апарата подають гостру пару і прогрівають апарат до температури 80 - 90°C. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації 131°C та тиску  $P = 0,3$  всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 60 хвилин. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30 - 40 °C і надлишкового тиску  $P = 0,003 - 0,005$  МПа.

### *ДР 2. Підготовка аераційного повітря*

#### *ДР 2.1. Забір атмосферного повітря*

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (ПЗ 2) у найвищій точці  $H = 15$  м, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

#### *ДР 2.2. Очистка від грубих домішок*

Попередню очистку повітря здійснюють на тканинних фільтрах грубої очистки (Ф3). Очистка від грубих домішок проводиться до концентрації не менше  $C = 90\%$ , забір частинок  $8 > 50$  мкм. Утворені тверді відходи відправляють на знешкодження до ЗВ.

#### *ДР 2.3. Компресування повітря*

Для забезпечення умов аерації культури та подолання гідравлічного тиску стовпа рідини в ферментері, інших опорів, а також для інших потреб виробництва, повітря необхідно стиснути. Повітря в компресорах (К4) нагрівають до  $t = 250^\circ\text{C}$ , тиск при цьому становить 0,35 МПа.

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

Стиснене повітря, що утворилося при компресуванні необхідно охолодити у

водяному теплообміннику (Т5) до температури 25 - 30 °С для відведення надлишкової вологи. Зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р6), де зменшують пульсацію руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Головний технологічний показник, що контролюється на цьому етапі це  $W = 60 - 70\%$ . Після етапу утворюється вода оборотна, що може використовуватися в подальшому, та конденсат.

#### *ДР 2.5. Нагрівання повітря*

Повітря нагрівають за допомогою гострої пари до температури 45-50°C у теплообміннику-нагрівачі (Т7). Вологість повітря повинна становити 50%. В кінцевому результаті, відбувається утворення конденсату.

#### *ДР 2.6. Головна фільтрація*

Фільтри (Ф8), що фільтрують підготовлене на попередніх етапах повітря, встановлюють біля ферментаційних відділень. Ступінь очищення повітря повинно становити 95%. Тверді відходи після фільтрації повітря йдуть на знешкодження до ЗВ.

#### *ДР 2.7. Тонка очистка*

Після фільтрації повітря через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (Ф10, Ф13, Ф18, Ф22, Ф31, Ф32, Ф34, Ф35, Ф37, Ф38, Ф45, Ф48, Ф49) кожного біореактора до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1. Ступінь кінцевої очистки повітря становить  $E = 99,9999\%$  та КУО - 0. Тверді відходи відправляються на знешкодження відходів до ЗВ.

### ***ДР 3 Приготування та стерилізація титрувальних розчинів***

#### ***ДР 3.1. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH***

*ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для вирошування інокуляту в посівному апараті 12 л .*

3 г сипучого NaOH відміряємо на аналітичних терезах та вносимо у колбу об'ємом 100 мл та при постійному перемішуванні додаємо 47 мл води для розведення. Перемішуємо отриманий розчин, колбу закриваємо ватно -марлевою пробкою і стерилізуємо у вертикальному автоклаві АВ-2 подачею гострої пари упродовж 40 хвилин при температурі 131 °С. Спостерігається утворенням та відведенням конденсату по окремій комунікації. Розчин гідроксиду натрію подаємо

через засівну колбу до ТП 5.5. для контролю рН середовища в інокуляторі ІН33 об'ємом 12 л.

*ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для вирощування інокуляту в посівному апараті 120 л.*

18 г сухого NaOH відміряємо на аналітичних терезах та вносимо у колбу об'ємом 500 л та при постійному перемішуванні додаємо 282 мл води для розведення. Перемішуємо отриманий розчин, колбу закриваємо ватно -марлевою пробкою і стерилізуємо у вертикальному автоклаві АВ-2 подачею гострої пари упродовж 40 хвилин при температурі 131<sup>0</sup>С. Спостерігається утворенням та відведенням конденсату по окремій комунікації. Розчин гідроксиду натрію подаємо через засівну колбу до ТП 5.6. для контролю рН середовища в інокуляторі ІН3 6 об'ємом 120 л.

*ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для вирощування інокуляту в посівному апараті 1,2 м<sup>3</sup>.*

144 г сипучого NaOH відміряємо на аналітичних терезах та вносимо у колбу об'ємом 5 л та при постійному перемішуванні додаємо 2,4 л води для розведення. Перемішуємо отриманий розчин, колбу закриваємо ватно -марлевою пробкою і стерилізуємо у вертикальному автоклаві АВ-2 подачею гострої пари упродовж 40 хвилин при температурі 131<sup>0</sup>С. Спостерігається утворенням та відведенням конденсату по окремій комунікації. Розчин гідроксиду натрію подаємо через засівну колбу до ТП 5.7. для контролю рН середовища в інокуляторі ІН39 об'ємом 1,2 м<sup>3</sup>.

*ДР 3.1.4. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для вирощування інокуляту в посівному апараті 12,5 м<sup>3</sup>.*

744 г сипучого NaOH відміряємо на об'ємно-ваговому дозаторі (Д44), вносимо у реактор-змішувач об'ємом 25 л (Р46) та при постійному перемішуванні через Д44 вносимо 12,4 л води. Отриманий розчин стерилізуємо гострою парою упродовж 40 хвилин при температурі 131<sup>0</sup>С з утворенням та подальшим відведенням конденсату по окремій комунікації. Отриманий розчин подають через насос Н47 до ТП 6.1. для контролю рН середовища.

### *ДР 3.2. Приготування 6% розчину HCl*

*ДР 3.2.1. Приготування 6% розчину HCl для вирощування інокуляту в посівному апараті 12 л.*

9,6 мл 37% розчину HCl розчиняємо у 38,4 мл води, готуємо розчин у колбі об'ємом 100 мл при постійному перемішуванні. Розчин не стерилізуємо, оскільки він випаровується та в даній хімічній сполуці не може розвиватися мікрофлора. Отриманий розчин подаємо через засівну колбу у інокулятор ІН33 об'ємом 12 л для контролю рН середовища в інокуляторі ІН33 та до ДР 4.2.3. в колбу з композицією В для запобігання утворення нерозчинних солей.

*ДР 3.2.2. Приготування 6% розчину HCl для вирощування інокуляту в посівному апараті 120 л.*

93 мл 37% розчину HCl розчиняємо у 374 мл води, готуємо розчин у колбі об'ємом 500 мл при постійному перемішуванні. Розчин не стерилізуємо, оскільки він випаровується та в даній хімічній сполуці не може розвиватися мікрофлора. Отриманий розчин подаємо через засівну колбу у інокулятор ІН36 об'ємом 120 л для контролю рН середовища в інокуляторі ІН36 та до ДР 4.3.3. з композицією В для запобігання утворення нерозчинних солей в збірнику Р16.

*ДР 3.2.3. Приготування 6% розчину HCl для вирощування інокуляту в посівному апараті 1,2 м<sup>3</sup>.*

908 мл 37% розчину HCl розчиняємо у 3,6 л води, готуємо розчин у колбі об'ємом 5 л при постійному перемішуванні. Розчин не стерилізуємо, оскільки він випаровується та в даній хімічній сполуці не може розвиватися мікрофлора. Отриманий розчин подаємо через засівну колбу у інокулятор ІН39 об'ємом 1,2 м<sup>3</sup> для контролю рН середовища в інокуляторі ІН39 та до ДР 4.4.3. з композицією В для запобігання утворення нерозчинних солей в збірнику Р26.

*ДР 3.2.4. Приготування 6% розчину HCl для вирощування інокуляту в посівному апараті 12,5 м<sup>3</sup>.*

9,3 л 37% розчину HCl відміряємо на об'ємно-ваговому дозаторі (Д28), вносимо у реактор-змішувач об'ємом 25 л (Р46) та при постійному перемішуванні через Д28 вносимо 37,1 л води. Розчин не стерилізуємо, оскільки він випаровується та в даній хімічній сполуці не може розвиватися мікрофлора. Отриманий розчин

подають самопливом до ТП 6.1. для контролю рН середовища в ферментері ФР50.

#### *ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ*

##### *ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці*

На першій стадії необхідно приготувати 591 мл поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 591 мл середовища наведено в табл. 7.1.

*Таблиця 7.1.*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 591 мл середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 591 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	10,0	5,91	А	236,21
Пептон	5,0	2,96	Б	118,11
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5,0	2,96	В	118,11
Be <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01	0,006		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	2,96	Г	118,11
			<b>Всього:</b>	<b>591</b>

##### *ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На аналітичних терезах зважуємо 5,91 г глюкози, наважку поміщаємо у колбу об'ємом 500 мл та додаємо 230 мл дистильованої води, перемішуємо. Далі закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо у вертикальному автоклаві типу АВ-2 подачею гострою парою при температурі 112°C упродовж 30 хв (тиск - 0,5 МПа). Приготований розчин відправляємо до ТП 5.4. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

##### *ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На аналітичних вагах зважуємо 2,96 г пептону, наважку переносимо у колбу об'ємом 250 мл, та вносимо 115 мл дистильованої води, перемішуємо. Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою та отриманий розчин стерилізуємо подачею гострої пари при 120°C впродовж 30 хв (тиск - 0,075 - 0,1 МПа).

Композиція Б йде до етапу культивування в колбах на качалці до ТП 5.4. При стерилізації спостерігається утворення конденсату.

*ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В*

На аналітичних вагах зважуємо 2,96 г  $M\text{f}304\text{x}7\text{H}_2\text{O}$  та 0,006 г  $\text{Be}^0\text{O}_4\text{x}7\text{H}_2\text{O}$ , розчиняємо у 115 мл дистильованої води та стерилізуємо у вертикальному автоклаві при 131°C протягом 40 хв (тиск - 0,15 МПа). При стерилізації відбувається утворення конденсату. Композиція В йде до етапу культивування в колбах на качалці до ТП 5.4.

*ДР 4.1.4 Приготування і стерилізація композиції Г*

На аналітичних вагах зважуємо 2,96 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , розчиняємо у 115 мл дистильованої води та стерилізуємо у вертикальному автоклаві при 131°C протягом 40 хв (тиск - 0,15 МПа). При стерилізації відбувається утворення конденсату. Розчини композицій А, Б, В та Г зливаємо в одну колбу і культивуємо (ТП 5.4.).

***ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 12 л***

На першій стадії необхідно приготувати 6,49 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 6,49 л середовища наведено в табл. 7.2.

*Таблиця 7.2.*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6,49 л середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 64 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	10,0	64,9	А	2 076
Пептон	5,0	32,35	Б	1 037
$M\text{f}804\text{x}7\text{H}_2\text{O}$	5,0	32,35	В	2 078
$\text{E}\text{e}2804\text{x}7\text{H}_2\text{O}$	0,01	0,64		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5	32,35		
			<b>Всього:</b>	<b>6 490</b>

#### *ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На аналітичних терезах зважуємо 64,9 г глюкози, наважку поміщаємо у колбу об'ємом 3 л та додаємо 2 л дистильованої води, перемішуємо. Далі закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізуємо у вертикальному автоклаві типу АВ- 2 подачею гострою парою при температурі 112°C упродовж 30 хвилин (тиск - 0,5 МПа). Приготований розчин відправляємо до ТП 5.5. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

#### *ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На аналітичних вагах зважуємо 32,35 г пептону, наважку переносимо у колбу об'ємом 2 л, та вносимо 1 л дистильованої води, перемішуємо. Закриваємо колбу ватно-марлевою пробкою та отриманий розчин стерилізуємо в автоклаві подачею гострої пари при 120°C впродовж 30 хв (тиск - 0,075 - 0,1 МПа). Композиція Б йде до етапу культивування в посівному апараті 12 л до ТП 5.5. При стерилізації спостерігається утворення конденсату.

#### *ДР 4.2.3 Приготування і стерилізація композиції В*

На аналітичних вагах зважуємо 32,35 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,06 г  $Be^{0_4} \cdot 7H_2O$  та 32,35 г  $K_2HPO_4$ , розчиняємо у 2 л дистильованої води та стерилізуємо у вертикальному автоклаві при 131°C протягом 40 хв (тиск - 0,15 МПа). При стерилізації відбувається утворення конденсату. Для запобігання випадіння солей в осад, до композиції додаємо 6% розчин соляної кислоти від ДР 3.2.1. Композиція В йде до етапу культивування в посівному апараті об'ємом 12 л до ТП 5.5. Розчини композицій А, Б, В зливаємо в одну колбу і культивуємо (ТП 5.5.).

### ***ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 120 л***

На першій стадії необхідно приготувати 64 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 64 л середовища наведено в табл. 7.3.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 64 л середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 64 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	10,0	643	А	20 579
Пептон	5,0	321	Б	10 289
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	5,0	321	В	20 599
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,01	0,64		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	321		
			<b>Всього:</b>	<b>64 270</b>

*ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д9) зважуємо 643 г глюкози, наважку поміщаємо у реактор-змішувач об'ємом 25 л (Р11) та додаємо 19,9 л питної води, перемішуємо при 120 об/хв і подаємо глуху пару в сорочку для кращого розчинення компонентів у воді. Компоненти стерилізуємо гострою парою при температурі 112°C протягом 30 хв (тиск - 0,5 МПа) і подаємо самопливом через окремий патрубок в інокулятор об'ємом 120 л (ІН-36) до ТП 5.6. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

*ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д12) зважуємо 321 г пептону, наважку поміщаємо у реактор-змішувач об'ємом 15 л (Р14) та додаємо 10 л питної води. Перемішуємо при 120 об/хв і подаємо глуху пару в сорочку для кращого розчинення компонентів у воді. Компоненти композиції Б стерилізуємо гострою парою при температурі 120°C протягом 30 хв (тиск - 0,075 - 0,1 МПа) і подаємо самопливом через окремий патрубок в інокулятор об'ємом 120 л (ІН-36) до ТП 5.6. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

#### *ДР 4.3.3 Приготування і стерилізація композиції В*

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д15) зважуємо 321 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,64 г  $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$  та 321 г  $K_2HPO_4$ , наважку поміщаємо у реактор-змішувач об'ємом 25 л (Р16) та додаємо 19,9 л питної води. Перемішуємо при 120 об/хв і подаємо глуху пару в сорочку для кращого розчинення солей у воді. Компоненти стерилізуємо гострою парою при температурі 131 °С протягом 40 хв (тиск - 0,15 МПа) безпосередньо в інокуляторі об'ємом 120 л (ІН-36), що подають самопливом через окремий патрубок до ТП 5.6. Для запобігання випадіння солей в осад, до композиції додаємо 6% розчин соляної кислоти від ДР 3.2.2. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

#### *ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 1,2 м<sup>3</sup>*

На першій стадії необхідно приготувати 636 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 636 л середовища наведено в табл. 7.4.

*Таблиця 7.4.*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 636 л середовища**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 636 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	10,0	6,37	А	204
Пептон	5,0	3,18	Б	102
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0	3,18	В	204
$Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	0,006		
$K_2HPO_4$	5	3,18		
			Всього:	<b>636</b>

#### *ДР 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції А*

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д17) зважуємо 6,37 кг глюкози, наважку поміщаємо у реактор-змішувач об'ємом 200 л (Р19) та додаємо 197 л питної води. Перемішуємо при 120 об/хв і подаємо глуху пару в сорочку для кращого розчинення компонентів у воді. Компоненти стерилізуємо гострою парою при температурі 112°C протягом 30 хв (тиск - 0,5 МПа) і подаємо за допомогою насоса

H<sub>2</sub>O в інокулятор об'ємом 1,2 м<sup>3</sup> (ІН-39) до ТП 5.7. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

#### *ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б*

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д21) зважуємо 3,18 кг пептону, наважку поміщаємо у реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р23) та додаємо 99 л питної води. Перемішуємо при 120 об/хв і подаємо глуху пару в сорочку для кращого розчинення компонентів у воді. Компоненти стерилізуємо гострою парою при температурі 120°C протягом 30 хв (тиск - 0,075 - 0,1 МПа) і подаємо за допомогою насоса Н24 в інокулятор об'ємом 1,2 м<sup>3</sup> (ІН-39) до ТП 5.7. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

#### *ДР 4.4.3 Приготування і стерилізація композиції В*

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д25) зважуємо 3,18 кг MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,006 кг Be<sup>0</sup><sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O та 3,18 кг K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, наважку поміщаємо у реактор-змішувач об'ємом 200 л (Р26) та додаємо 99 л питної води. Перемішуємо при 120 об/хв і подаємо глуху пару в сорочку для кращого розчинення солей у воді. Компоненти стерилізуємо гострою парою при температурі 131 °C протягом 40 хв (тиск - 0,15 МПа) безпосередньо в інокуляторі об'ємом 1,2 м<sup>3</sup> (ІН-39), що подаємо за допомогою насоса Н27 до ТП 5.7. Для запобігання випадіння солей в осад, до композиції додаємо 6% розчин соляної кислоти від ДР 3.2.3. При стерилізації відбувається утворення конденсату.

#### ***ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 12 м<sup>3</sup>***

На першій стадії необхідно приготувати 6,26 м<sup>3</sup> поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 6,26 м<sup>3</sup> середовища наведено в табл. 7.5.

## Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 260 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Вміст компонента у 6,26 м <sup>3</sup> середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	10,0	62,6	А	5 009
Пептон	5,0	31,3		
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	5,0	31,3		
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,01	0,06		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	31,3		
			<b>Всього:</b>	<b>6 260</b>

*ДР 4.5.1 Приготування композиції А*

На об'ємно-ваговому дозаторі (Д40) зважуємо 62,6 кг глюкози, 31,3 кг пептон, 31,3 кг MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 0,06 кг Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O та 31,3 кг K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> наважку поміщаємо у реактор-змішувач об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> (Р41) та додаємо 4,8 м<sup>3</sup> питної води. Перемішуємо при 120 об/хв і подаємо глуху пару в сорочку для кращого розчинення компонентів у воді. Охолоджений розчин компонентів подаємо до УБС-43 установки за допомогою насоса Н42.

*ДР 4.5.2 Стерилізація середовища в УБС для виробничого біосинтеза*

Компоненти стерилізуємо гострою парою при температурі 140°C впродовж 2 хвилин (тиск - 0,15 МПа), наслідок - це утворення конденсату. Отриманий стерильний розчин композицій подаємо за допомогою насоса в ферментер ФР50 об'ємом 12,5 м<sup>3</sup> до ТП 6.1.

**ТП 5. Підготовка посівного матеріалу***ТП 5.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* EFRL 01 зберігаємо у пробірках зі скошеним МПА та у пробірках під вазеліною олією з запарафінованими пробками в холодильнику при 4°C.

Пересіви здійснюємо кожні 3 місяці. Всі роботи за колекційною культурою проходять строго в стерильних умовах.

### *ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах*

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках на середовищі МПА, розсіваємо петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із МПА і вирощуємо при температурі 37°C упродовж 24 год.

### *ТП 5.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах*

Отримані ізольовані колонії (від ТП 5.2) пересіваємо петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересіваємо ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування - 24 год.

### *ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалках*

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять 236 мл розчину композиції А (від ДР 4.1.1), 118 мл розчину композиції Б (від ДР 4.1.2), 118 мл композиції В (від ДР 4.1.3) та 118 мл композиції Г (від ДР 4.1.4). Перемішують і розливають по 150 мл в 4 стерильних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus subtilis* EFRL 01, вирощеною на МПА агаризованому середовищі, вносять 10 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують клітини і піпеткою в асептичних умовах відбирають одержану суспензію та вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують біомасу, одержану з однієї пробірки.

Після вирощування у колбах на качалці 220 - 250 об/хв впродовж 45 год при 37 °С, культуральну рідину в асептичних умовах з колб переносять в засівну колбу об'ємом 1 л.

### *ТП 5.5 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 12 л.*

В попередньо простерелізований інокулятор об'ємом 12 л з композицією В (від ДР 4.2.3) об'ємом - 2 л, в асептичних умовах з колби вносять 2 л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.2.1) та 1 л композиції Б (від ДР 4.2.2). Після цього через насос Н47 додають стерильний розчин 6% NaOH (від ДР 3.1.1) та самопливом 6% розчин HCl від ДР 3.2.1 для доведення рН до 7,0, що контролюється рН датчиком. За допомогою засівної колби перекачують посівний матеріал через патрубок відкривши вентиль (від ТП 5.4) і вмикають перемішуючий

пристрій. У інокулятор подається стерильне стиснуте повітря через фільтр Ф32 від ДР 2.7, а виводиться відпрацьоване через індивідуальний фільтр Ф31. У кожух інокулятора ІН33 подається холодна вода, а виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі - 37°C, тривалість - 45 год. Швидкість перемішування становить 220 - 250 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 120 л (ІН36). Рідкі та газоподібні відходи відправляються на знешкодження до ЗВ.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (відсутність сторонньої мікробіоти, концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

#### *ТП 5.6 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 120 л.*

В попередньо простерелізований інокулятор об'ємом 120 л з композицією В (від ДР 4.3.3) об'ємом - 21 л, далі самопливом зі збірника Р11 переносять 21 л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.3.1) та 10 л композиції Б (від ДР 4.3.2) самопливом зі збірника Р16. За допомогою труби перетискування з інокулятора (ІН33) об'ємом 12 л перекачують посівний матеріал через патрубок відкривши вентиль (від ТП 5.5) і вмикають перемішувач. У інокулятор подається стерильне стиснуте повітря через фільтр Ф34 від ДР 2.7, а виводиться відпрацьоване через індивідуальний фільтр Ф35. У кожух інокулятора ІН36 подається холодна вода, а виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі - 37°C, тривалість - 45 год. Швидкість перемішування становить 220 - 250 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 1,2 м<sup>3</sup> (ІН39). Рідкі та газоподібні відходи відправляються на знешкодження до ЗВ.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (відсутність сторонньої мікробіоти, концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

#### *ТП 5.7 Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1,2 м<sup>3</sup>.*

В попередньо простерелізований інокулятор ІН39 об'ємом 1,2 м<sup>3</sup> з композицією В (від ДР 4.4.3) об'ємом - 204 л, далі за допомогою насоса Н20 зі

збірника P19 переносять 204 л стерильного розчину композиції А (від ДР 4.4.1) та зі збірника P23 насосом Н24 102 л композиції Б (від ДР 4.3.2). За допомогою засівної колби перекачують посівний матеріал через патрубков відкривши вентиль (від ТП 5.6) і вмикають перемішувач. Після цього через насос Н47 додають стерильний розчин 6% NaOH (від ДР 3.1.3) та самопливом 6% розчин HCl від ДР 3.2.3 для доведення рН до 7,0, що контролюється рН датчиком. У інокулятор подається стерильне стиснуте повітря через фільтр Ф37 від ДР 2.7, а виводиться відпрацьоване через індивідуальний фільтр Ф38. У кожух ферментера ІН39 подається холодна вода, а також виводиться оборотна вода.

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі - 37°C, тривалість - 45 год. Швидкість перемішування становить 220 - 250 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в ферментер об'ємом 12,5 убс (ФР50). Рідкі та газоподібні відходи відправляються на знешкодження до ЗВ.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (відсутність сторонньої мікробіоти, концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

## **ТП 6. Біосинтез**

### *ТП 6.1 Виробниче культивування*

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з об'ємом 12,5 м<sup>3</sup>. У попередньо простерилізований ферментер (ФР50) вносять насосом-УБС 6,2 м<sup>3</sup> композиції А від установки безперервної стерилізації УБС43 від ДР 4.5.2. За допомогою труби перетискування перекачують посівний матеріал (від ТП 5.7) з інокулятора ІН39 і вмикають перемішувач. Після цього через насос Н47 додають стерильний розчин 6% NaOH (від ДР 3.1.4) та самопливом 6% розчин HCl від ДР 3.2.4 для доведення рН до 7,0, що контролюється рН датчиком. Перемішувачем слугує одновальна турбінна мішалка, якою обладнаний ферментер. Швидкість перемішування становить 250 об/хв. Тривалість виробничого культивування становить 90 годин при температурі 37°C та тиску у ферментері 0,030,04 МПа, рН 7,0. У ферментер подається стерильне стиснуте повітря через фільтр

Ф49 від ДР 2.7, а виводиться відпрацьоване через індивідуальний фільтр Ф48. У кожух ферментера подається холодна вода, а також виводиться оборотна вода.

Кожні 5-6 годин відбирають проби для мікробіологічного аналізу та аналізу процесу ферментації (відсутність сторонньої мікробіоти, концентрації біомаси, кількість вуглецю і азоту) у культуральній рідині.

Процес ферментації проводили в умовах високої аерації і закінчується при досягненні активності ферменту 2700 од/мл.

### ***ТП. 7 Попереднє оброблення культуральної рідини***

#### ***ТП 7.1. Оброблення культуральної рідини соляною кислотою***

По закінченню виробничого біосинтезу культуральна рідина передається в збірник (Зб-53), в якому потрібно охолодити до 27 °С та додати соляну кислоту для кислотної коагуляції. Після кислотної коагуляції отримаємо 5848 л культуральної рідини. Враховуючи коефіцієнт заповнення для збірників 0,7 використовуємо збірник для культуральної рідини об'ємом 8 м<sup>3</sup>.

Культуральна рідина перекачується у збірник, за допомогою відцентрового насосу. У збірник додається соляна кислота концентрацією 35 % у кількості 0,6 м<sup>3</sup>. Після додавання соляної кислоти вмикають переміщуючий пристрій та перемішують впродовж 30 хв при температурі 27 °С.

### ***ТП. 8. Відділення біомаси***

#### ***ТП 8.1 Центрифугування***

Відділення біомаси і зважених часток середовища проводиться на шнековій відстійній центрифугі. Центрифугування відбувається при швидкості 5000 об/хв. Далі фугат з (Ц-55) подається на ультрафільтрацію до (УФ- 54)

Фугат передається на ультрафільтраційну установку УФ-54 на концентрування, а біомасу завантажують у збірник відходів.

### ***ТП 9. Концентрування супернатанту***

#### ***ТП 9.1 Ультрафільтрація ферментного комплексу***

Концентрування проводиться на ультрафільтраційній установці типу «крос-флоу» (УФ-54), використовується мембрани на основі целюлози регенерувальній з

діаметром пор 10 нм.

Ультрафільтрацію проводять при температурі 14° С. Фільтрат зі збірника за допомогою насоса подають на ультрафільтраційну установку УФ-54, поверхня фільтрації установки 200 м<sup>2</sup>, діаметр пор мембрани типу УАМ 54×10<sup>-10</sup> м.

Тиск підтримують 0,4 МПа протягом всього процесу ультрафільтрації. Утворений ультраконцентрат повертають до збірника для досягнення необхідного ступеня концентрування. По мірі забруднення поверхні фільтрування вона промивається збідненим розчином.

Концентрують фільтрат в 10 разів. Подальше концентрування ферменту недоцільно, тому що призводить до значних втрат активності. Готовий ультраконцентрат передають в збірник.

Далі очищений від домішок, поживного середовища, ферментний комплекс направляється на осадження в (ЗБ-55)

### ***ТП 10. Осадження***

#### ***ТП 10.1 Осадження ферментів спиртом***

Осадження відбувається при відношенні об'ємів концентрата та етилового спирту 1:3. Перед осадженням концентрат охолоджують до  $t = 4-6$  °С. У змішувачі (ЗБ-55) спирт з фільтратом ретельно перемішується мішалкою (200 об/хв) протягом 20 хв. З змішувача суспензія направляється на сепарування для відділення осаду ферментного препарату.

### ***ТП 11. Відділення осаду***

#### ***ТП 11.1 Сепарування***

Суспензію в УБОС-52 надходить у сепаратор (С-57), де відділяють осад від водно-спиртової суміші. Швидкість обертів сепаратора – 2000 об/хв. Осад автоматично вивантажується (ферментний препарат).

Суспензія по патрубку надходить у циліндр із найменшим радіусом, потім проходить уздовж встановлених циліндрів, щоразу міняючи напрямок. Водно-спиртова суміш видаляється з барабана за допомогою напірного диска під тиском і подається на ЗВ 5.2, а осад під дією відцентрової сили відкидається до внутрішньої стінки циліндричних вставок. Апарат виконаний у вибухонебезпечному виконанні

(оскільки ведеться робота з етиловим спиртом). При сепаруванні необхідно сепаратор безперервно охолоджувати водою до 10-15 °С, для того щоб уникнути інактивації пектолітичних ферментів. Після чого відпрацьований спирт відправляється на регенерацію.

### ***ТП 12 Сушіння***

#### ***ТП 12.1. Сушіння ферментного препарату***

Отриманий ферментний осад вологістю 30-35% передається на сушіння (ВСШ-59), при тиску в середині камери 200 кПа, температура 20-22 °С.

Перша стадія сушіння ферментного препарату відбувається до  $w = 30\%$ . Після цього в камері знижується тиск до 150 кПа, температура піднімається до 30°C, де висушуємо його до  $w = 12\%$  впродовж 2 год. Друга стадія процесу (досушування продукту до потрібної вологомiсткостi -12% та його подальше охолодження) необхідна для забезпечення стабiльностi препарату (сушіння — за температури 30 °С i бiльшoї тривалостi).

Коли, досягається вологiсть ферментного осаду 8-12 % сушіння припиняється. Висушений порошок вивантажується з пiддонiв та передається на подрiбнення.

### ***ТП 13 Подрiбнення порошку***

#### ***ТП 13.1. Подрiбнення в дисмембраторi***

Пiсля сушіння ферментний препарат подається на подрiбнення на дисмембратор (Д-61).

Порошок пiсля висушування передається в живлючий пристрiй дисмембратора. Порошок потрапляє в камеру дисмембратора де розбивається «пальцями» до розмiру часточок дiаметром 5 мкм. Швидкiсть обертiв робочого диску дисмембратора становить 10000 об/хв. Подрiбнений порошок збирається у приймальний бункер та передається на стадiю пакування.

### ***ПМВ 14. Пакування, маркування, вiдвантажання***

#### ***ПМВ 14.1. Фасування, пакування, маркування препарату***

Готовий ферментний препарат пакують (ФП 62) у полiетиленовi металiзованi

пакеди місткістю 0,2 кг та відвантажують на склад.

### ***ЗВ 15. Знешкодження відходів***

#### ***ЗВ 15.1. Знешкодження газоподібних відходів***

Каталітичний засіб очищення заснований на хімічній взаємодії домішок на твердих каталізаторах, що містять платину, паладій, родій, нікель, хром, мідь, цинк, ванадій або інші елементи.

Існує багато практичних засобів очищення газоподібних викидів. Один із них - апарат мокрого очищення, що працює за принципом осадження часток пилу на поверхню крапель рідини, або плівки рідини. Осадження часток пилу на рідину відбувається під дією сил інерції і броуновського руху.

#### ***ЗВ 15.2. Знешкодження рідких відходів***

Виробничі стоки на ділянці виробництва готових лікарських препаратів утворюються на стадії санітарної підготовки та промивки обладнання та разом з загальнозаводськими стоками скидаються в міську каналізацію.

#### ***ЗВ 15.3. Знешкодження твердих відходів***

Тверді некондиційні відходи виробництва збираються та направляються на полігон твердих побутових відходів.

## РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

Ефективне проведення біотехнологічних процесів на виробництві пов'язані з вдосконаленням методів контролю і управління. В загальному підхід до контролю процесу біосинтезу ферменту пектинази є системним для точного та ефективного біосинтезу.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Дзуман Д.В.						
Перевір.		Пенчук Ю.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.			Кафедра БТМ			

### 8.1. Карта постадійного контролю

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
Кх Кт ДР 1.1.1 <i>Приготування 3% розчину каустичної соди</i>	<b>Розчин Divosan Forte VT6</b> Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 3%
Км Кх Кт ДР 1.2.1 <i>Щоденне прибирання виробничого приміщення</i>	<b>Підлога</b> Мікробіологічний контроль, концентрація розчину	Мікробіологічний контроль Хімічний контроль Технічний контроль	Після прибирання	C = 10% КУО < 800/см <sup>2</sup>
Км Кх Кт ДР 1.2.2 <i>Генеральне прибирання</i>	<b>Стіни, двері, вікна</b> Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль Хімічний контроль Технічний контроль	Після прибирання	C = 10%, КУО < 300/см <sup>2</sup>
Кт ДР 1.3.1 <i>Миття та ополіскування виробничого обладнання</i>	<b>Обладнання та комунікації</b> Температура мийного розчину, час обробки	Термометр, годинник	Під час миття	і = 70 - 80°C, Т = 10 хв
Кт ДР 1.3.2 <i>Технічний огляд</i>	<b>Обладнання та комунікації</b>	-	-	Візуальна відсутність ущільнень та несправностей
Кт ДР 1.3.3 <i>Перевірка на герметичність</i>	<b>Обладнання та комунікації</b> Тиск, час перевірки, герметичність обладнання	Годинник, манометр	Тиск - безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,07 МПа, Т = 60 хв

Кт Км ДР 1.3.4 <i>Стерилізація обладнання</i>	<b>Обладнання та комунікації</b> Температура, час стерилізації та тиск, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, манометр	Температура визначається безперервно під час стерилізації	$\dot{i} = 131^{\circ}\text{C}$ , $T = 60$ хв, $P = 0,3$ МПа, відсутність мікробіоти
Кт ДР 2.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	<b>Повітрозабірник</b> Висота повітрозабірника	-	Під час купівлі та встановлення повітрозабірника	$H = 15$ м
Кт ДР 2.2 <i>Очищення від грубих домішок</i>	<b>Повітря на виході з фільтру грубого очищення</b> Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	$E = 80\%$
Кт ДР 2.3 <i>Компресування повітря</i>	<b>Стиснене повітря</b> Температура, тиск	Термометр, манометр	Вимірюється після компресування	$t = 125 - 130^{\circ}\text{C}$ , $P = 0,35$ МПа
Кт ДР 2.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	<b>Охоложене повітря</b> Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після охолодження та видалення зайвої вологи	$t = 25 - 30^{\circ}\text{C}$ , $w = 60 - 70\%$
Кт ДР 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	<b>Нагріте повітря</b> Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після нагрівання	$t = 50^{\circ}\text{C}$ , $w = 50\%$
Кт ДР 2.6 <i>Головна фільтрація</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	$E = 95 - 99\%$
Кт, Км ДР 2.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра,	Після проходження через фільтр	$E = 99,99\%$ , відсутність мікробіоти

		мікробіологічний контроль згідно пункту 8.1 цього розділу		
Кт, Км, Кх ДР 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	<b>Розчин їдкового натру</b> Концентрація, стерильність, температура, тиск, час, мікробіологічна чистота	Мікробіологічний контроль Технологічний контроль, термометр, манометр, годинник	Мікробіологічний контроль після приготування	C = 6%, T = 40 хв, t = 131°C, P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км ТП 5.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Колекційна культура <b>Bacillus subtilis EFRL01</b> Температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль після активації	i = 30°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ТП 5.3 Вирощування робочої культури	<b>Посівний матеріал,</b> Тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль	Температура контролюється і підтримується автоматично, мікробіологічний контроль кожні 4 годин	i = 37°C, i = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на качалці	<b>Посівний матеріал,</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, морфологічна однорідність, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично, мікробіологічний контроль кожні 4 години	i = 37°C, i = 45 год, и = 220 об/хв, рН = 7,0, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Кх, Км ТП 5.5 <i>Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 12 л</i></p>	<p><b>Посівний матеріал,</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, морфологічна однорідність, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично, мікробіологічний контроль кожні 4 години</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>i = 45</math> год, <math>n = 220</math> об/хв, рН = 7,0, біомаса, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км ТП 5.6 <i>Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 120 л</i></p>	<p><b>Посівний матеріал,</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, морфологічна однорідність, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично, мікробіологічний контроль кожні 4 години</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>i = 45</math> год, рН = 7,0, <math>n = 220</math> об/хв, біомаса, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км ТП 5.7 <i>Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 1,2 м<sup>3</sup></i></p>	<p><b>Посівний матеріал,</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, морфологічна однорідність, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично, мікробіологічний контроль кожні 4 години</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>i = 45</math> год, рН = 7,0, <math>n = 220</math> об/хв, біомаса, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км ТП 6.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом</i></p>	<p><b>Культуральна рідина,</b> тривалість культивування, температура, значення</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний</p>	<p>Температура, рН і швидкість обертання контролюють і</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>i = 90</math> год, рН = 7,0, <math>n = 220</math> об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти,</p>

<p><math>12 \text{ м}^3</math></p>	<p>рН, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, морфологічна однорідність, концентрація біомаси</p>	<p>контроль</p>	<p>підтримують автоматично; мікробіологічний контроль кожні 4 години, концентрація біомаси визначається за оптичною густиною</p>	<p>концентрація біомаси = 2,0 г/л,</p>
------------------------------------	---	-----------------	--	--

## 8.2. Мікробіологічний контроль

**Мікробіологічний контроль** передбачає контроль виробничого процесу та готової продукції; своєчасне виявлення контамінації та встановлення джерела її появи [82].

Упродовж культивування періодично відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації біомаси, концентрації пектинази, а також вмісту джерела вуглецю (глюкоза) і азоту (пептон).

**Мікробіологічний контроль** здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованим середовищем і подальшим мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА).

*Підготовка чашок Петрі:* у попередньо простерилізовані у сухожаровій шафі чашки Петрі розливають 20-30 мл вже розплавлене на водяній бані агаризоване середовище (МПА). Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару, після чого їх ставлять в автоклав і стерилізують при температурі 30°C (тиск - 0,1 МПа), впродовж 2-3-х діб.

Опис колонії *Bacillus subtilis* EFRL 01 має наступний вигляд: матові, складчасті колонії тілесного кольору з порізаними краями [82].



**Рис. 12.1.** Піст *Bacillus subtilis* EFRL 01 на МПА [82].

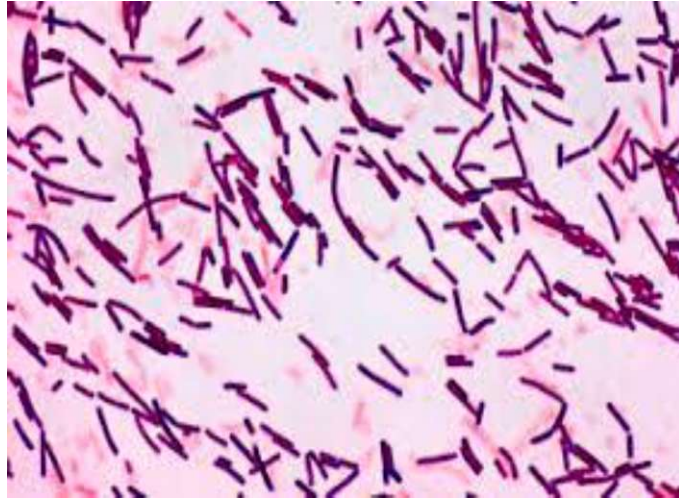


**Рис. 12.2.** Бактеріальні колонії *Bacillus subtilis* EFRL 01 після 48 годин інкубації при 37°C (збільшено приблизно в 9 разів).

Для мікроскопіювання використовують препарат - «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою 90х. При потребі перед мікроскопією звичайного препарату роблять препарат з фарбуванням за Грамом.

Для кращого підтвердження чистоти культури готують мазковий препарат та фіксують його на полум'ї пальника. На фіксований мазок кладуть просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води і через 2 хвилини його знімають, а залишки фарби зливають. На мазок наносять розчин Люголя і через 2 хвилини його зливають.

Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2 хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. У препараті повинні бути лише грампозитивні клітини які фарбуються у фіолетовий колір [82].



*Рис. 12.3.* Клітини *Bacillus subtilis* EFRL01 пофарбовані за Грамом (збільшення x1000) [83]

З метою перевірки або підтвердження наявності сторонньої мікробіоти, пробу з поверхонь приміщення, конденсату з обладнання та повітря, зразок висівають методом виснажуючого штриха для отримання ізольованих колоній на МПА для виявлення бактерій та на середовище Сабуро для виявлення грибів. Інкубацію проводять 24 год при температурах 30-35°C та 20-25°C відповідно.

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

#### **8.3.1. Концентрація біомаси**

Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення. З цією метою фільтри, заздалегідь встановлені у відкриту чашку Петрі, або центрифужні пробірки поміщують в сушильну шафу і висушують до постійної маси протягом 1—2 год. при температурі 80—85°C і 90—100°C відповідно.

Відділення клітин продуцента від культуральної рідини здійснюють центрифугуванням. Для цього в центрифужну пробірку наливають точно зміряний об'єм ретельно перемішаної культуральної рідини (від 5 до 20 мл). Час центрифугування 20 хв і число обертів 5000 об/хв.

Після центрифугування рідину обережно зливають, осад промивають

злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованої HCl на 1 л води) і знов центрифугують при тому ж числі обертів.

Супернатант зливають негайно після зупинки центрифуги. Інакше частина осаду може бути втрачена.

Щоб визначити масу сухих клітин, центрифужну пробірку або фільтр з осадом клітин мікроорганізмів поміщають в сушильну шафу, висушують і зважують.

### **8.3.2. Концентрація цільового продукту**

*Метод визначення пектолітичної активності (інтерферометричний метод).* Метод заснований на визначенні пектолітичних ферментів при каталітичному розщепленні пектину. За одиницю пектолітичної активності має бути прийнято кількість ферменту, який каталізує 1 г пектину до продуктів, неосаджених сірчаноокислим цинком при проведенні гідролізу в строго визначених умовах: температура 30 °С, час гідролізу 1 година, рН реакційного середовища 4.0. Кількість продуктів гідролізу пектину, неосаджених сірчаноокислим цинком, визначають на інтерферометрі.

*Проведення дослідження.*

100 мл культуральної рідини фільтрують через беззольний фільтр. З фільтрату відбирають певну кількість розчину в залежності від активності препарату для проведення аналізу.

Для аналізу беруть декілька пробірок діаметром 2 см і висотою 18 см по кількості досліджуваної проби. В кожену пробірку наливають по 20 см<sup>3</sup> субстрату і ставлять їх в термостат з температурою (30 +/- 0,2) °С. В термостаті пробірки витримують протягом 10 хв для того, щоб розчин прийняв постійну температуру, попередньо підігрітого до 30 °С, вміст кожної пробірки ретельно перемішують і залишають в термостаті при 30 °С на 1 год. Для проведення гідролізу. По закінченню часу в пробірки з реакційною сумішшю добавляють по 2 см<sup>3</sup> 15 %-ного розчину сірчаноокислового цинку для інактивації ферменту и осадження продуктів гідролізу і виймають з термостата. Вміст кожної пробірки

перемішують шляхом струшування не менше 10 разів і фільтрують через фільтр. Якщо фільтрат буде мутним, то його необхідно заново профільтрувати, щоб отримати прозорий розчин. Одночасно готують контрольний розчин. Вимірювання проводять на інтерферометрі [84].

*Метод визначення ендополігалактуразної активності (віскозиметричний метод).* Метод заснований на визначенні кількості прогідролізованих зв'язків по збільшенню кінцевих альдегідних груп. За одиницю екзополігалактуразної активності прийнята кількість ферменту, який в умовах визначення при 30 °С каталізує гідроліз 1 мкекв. глікозидних зв'язків в молекулі пектинової кислоти за 1 хв.

#### *Проведення аналізу*

У сухий віскозиметр Оствальда з розміром діаметра капіляра 0,99 мм, занурений в термостат з температурою 50° С, автоматичною піпеткою вносять 10см<sup>3</sup> 1,0%-ного розчину пектової кислоти, прогривають протягом 5 хв. Через 5 хв автоматичною піпеткою вводять зразок культуральної рідини (від 1,0 до 5,0 см<sup>3</sup>) в залежності від активності ферментного препарату. Загальний об'єм реакційної суміші завжди повинен бути 15,0 см<sup>3</sup>, тому при додаванні меншого кількості розчину ферменту вносять відповідну кількість прогрітій дистильованої води. Дистильовану воду обов'язково вносять безпосередньо перед внесенням розчину ферменту.

Після введення розчину ферменту відразу за секундоміром відзначають час початку гідролізу і одночасно перемішують вміст віскозиметра за допомогою груші, одягненою на вузьке коліно віскозиметра. Через 3 хв після введення розчину ферменту вимірюють в'язкість по часу закінчення реакційної суміші. Час закінчення реакційної суміші відзначають другим секундоміром через кожні 2 хв, поки в'язкість не знизиться на 30% від початкової. При відхиленні від цієї величини необхідно збільшити або зменшити кількість ферментного препарату. Час гідролізу не повинно перевищувати 15 хв [84].

*Метод визначення екзополігалактуразної активності по збільшенню кількості відновлених альдегідних груп.* Метод заснований на гідролізі пектину чи пектинової кислоти досліджуваним ферментним препаратом з наступним контролем ступеню розчеплення по зниженню в'язкості. Ендополігалактуразна активність характеризує здатність ферменту знижувати в'язкість 1%-го розчину пектину.

#### *Проведення аналізу*

У мірну колбу місткість  $100 \text{ см}^3$  вносять  $10 \text{ см}^3$  1,0%-ного розчину пектової кислоти і поміщають в термостат з температурою  $30^\circ \text{C}$ . Через 10 хв доливають в колбу від 1 до  $5 \text{ см}^3$  культуральної рідини в залежності від ферментативної активності, ретельно перемішують і відзначають час за секундоміром для проведення гідролізу. Реакційну суміш інкубують в термостаті з такою тривалістю, щоб ступінь гідролізу пектової кислоти перебувала в межах 20% і не більше.

Після закінчення часу інкубації в колбу додають  $1,8 \text{ см}^3$  розчину вуглекислого натрію молярної концентрацією  $1,0 \text{ моль/дм}^3$  і  $10 \text{ см}^3$  розчину йоду молярної концентрації  $0,1 \text{ моль/дм}^3$ .

Розчини ретельно перемішують, закривають скляними пробками і залишають в темному місці на 20 хв. Потім до реакційної суміші доливають  $2,0 \text{ см}^3$  розчину сірчаної кислоти, молярної концентрації  $2 \text{ моль/дм}^3$ , інтенсивно перемішують і оттітровивають надлишок йоду розчином тіосульфату натрію молярної концентрації  $0,05 \text{ моль/дм}^3$  з індикатором - 1,0%-м розчином крохмалю.

При аналізі ферментних розчинів, величина активності яких невідома, беруть  $50 \text{ см}^3$  1,0%-го розчину пектової кислоти (субстрат) і від 1,0 до  $25,0 \text{ см}^3$  розчину ферменту. Обсяг розчину ферменту менше  $25 \text{ см}^3$  заповнюють дистильованою водою. Загальний обсяг суміші -  $75 \text{ см}^3$ . З реакційної суміші відбирають кожні 5-10 хв проби по  $15 \text{ см}^3$  в колбу, де попередньо налито  $1,8 \text{ см}^3$  розчину вуглекислого натрію молярної концентрації  $1 \text{ моль} / \text{дм}^3$ . Всі інші процедури проводять як описано вище [84].

### 8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

#### Визначення джерела вуглецю

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Bacillus subtilis* EFRL є глюкоза.

Суть методу. Концентрація даного джерела вуглецю буде визначатися глюкозооксидазним методом з використанням біосенсорів з іммобілізованою глюкозооксидазою та амперометричним датчиком.

Техніка визначення. Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 90 об/хв 7 хв, далі відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

Для проведення аналізу пробу розводили у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ — $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  з рН 7,2. До даної системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТА (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10 - 2 М 3,4-етилендіокситіофену, 10 - 3 М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину глюкооксидази) у вигляді суспензії.

Вимірювання концентрації глюкози здійснюється за допомогою амперометричного перетворювального приладу, що складається з традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) [85] поєднав у собі всі три електроди: платиновий робочий, до поміжний та електрод порівняння. Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ. Вимірювання проводять опусканням датчика амперометричного приладу у розчин-систему з глюкозооксидазою та підготовленою культуральною рідиною.

Величина, що вимірюється - це сила струму, що визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за градувальним графіком залежності сили струму (нА) і концентрації глюкози (мМ). Одержане значення

концентрації спочатку перемножують на ступінь розведення а потім переводять концентрацію з мМ у г у певному об'ємі чи г/л [85].

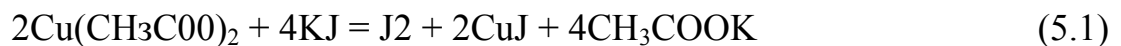
### ***Визначення концентрації амінного азоту***

Джерелом амінного азоту в середовищі для культивування *Bacillus subtilis* EFRL є пептон, до складу якого входить амонійний азот у складі амінокислот.

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням.

Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [86].

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



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



1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот [86].

Техніка визначення. Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 3000 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 мл фільтрату, додають 34 краплини індикатору тимолфталеїну і по краплям розчин гідроксиду натрію

концентрацією 0,1 моль/л до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 мл 80 %-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л . В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію [86].

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 мл культуральної рідини. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = a * 0,28 * b * 10 * 100 / 50 \quad (5.3)$$

де а - кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, витраченого на титрування, л ;

б - об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, л [86].

## РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва

До складу колоїдних речовин, що обумовлюють каламутність соків, входять пектинові речовини, крохмаль, поліфенольні сполуки, білки та деякі інші. Пектинові речовини, що діють як колоїди для зважених часток, затримують їх випадання в осад і збільшують в'язкість соків. Тому при ферментативному освітленні соків можливе застосування пектолітичного ферменту пектинази, який діє на пектин. Пектиназа синтезується продуцентом *Bacillus subtilis* EFRL 01 і міститься в культуральній рідині, оскільки пектолітичні ферменти є екзометаболітами і накопичуються позаклітинно.

Виробничий біосинтез ферменту здійснюється у ферментері. Апарат виконаний із нержавіючої сталі марки 316L, оснащений перемішувальним пристроєм і сорочкою.

Від попередньої стадії підготовки поживного середовища, котре подають у ферментер. Регулювання температури відбувається за рахунок подачі гарячої та холодної води в сорочку апарата [36].

Таблиця 10.1

### Завдання на розробку схеми автоматизації

№ з/п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управляючої дії
1	Ферментер	Температура	$60 \pm 1$ °C	Регулювання	Підтримання заданому значенні	АРМ оператора
		рН агрегаті	$4,0 \pm 1$	Контроль	Відображення, сигналізація (світлова)	АРМ оператора
				Регулювання	Підтримання заданому значенні	
		Рівень		Управління	Дистанційне	АРМ оператора

<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Дзуман Д.В.			
Перевір.	Пенчук Ю.М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Пирог Т.П.			
<b>РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва</b>				
		Літ.	Арк.	Акрушів
Кафедра БТМ				

2	Збірникпоживного середовища (ПС)	pH	$4,0 \pm 0,1$	Контроль	Відображення, сигналізація (світлова)	АРМ оператора
				Регулювання	Підтримання наведеномузначенні	
		Температура	$60 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$	Регулювання	Підтримання наведеномузначенні	АРМ оператора

### Опис функціональної схеми автоматизації

Температура у ферментері вимірюється датчиком температури (поз. 1а). Сигнал від датчика подається на контролері в залежності від температури іде управління подачею пари регулюючим органом (поз. 1в), що приводиться в дію за допомогою електропневмо перетворювача 1б.

Температура у збірнику вимірюється датчиком температури (поз. 2а). Сигнал від датчика подається на контролері в залежності від температури іде управління подачею пари регулюючим органом (поз. 2в), що приводиться в дію за допомогою електропневмо перетворювача 2б. Рівень у ферментері контролюється датчиком рівня (поз. 3а, 3б).

Сигнал від датчика подається на контролері в залежності від значення рівня регулюється за допомогою регулюючих органів (поз. 3г, 3е), які приводяться в дію виконавчими механізмами 3в, 3д.

pH у ферментерів вимірюється датчиком pH (поз. 4а). Сигнал від датчика подається на контролері в залежності від значення pH іде управління подачею соляною кислотою регулюючим органом (поз. 4в), що приводяться в дію за допомогою виконавчих механізмів 4б.

pH у збірнику вимірюється датчиком pH (поз. 5а). Сигнал від датчика подається на контролері в залежності від значення pH іде управління подачею соляною кислотою регулюючим органом (поз. 5в), що приводяться в дію за допомогою виконавчих механізмів 5б.

## Специфікація на прилади та засоби автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1а 2а	Температура	В агрегатах	Датчиктермоперетворювачопору ТСП, НСХ-Pt100, діапазон (0 – 100)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	TSM-0193-01	ЧТП «Теплоприбор» м. Челябинск
1б 2б	Температура	Нащиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
1в 2в	Температура	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA32-230-L0	СВ Альтера м. Київ
3а 3б	Рівень	В агрегаті	Контактнийдатчикрівня, з вихідним сигналомпо напрузі	SITRNS L Pointek CLS 200	ДП «Сименс Україна» м.Київ
3в 3г 3д 3е	Рівень	По місцю	Електромагніт-ний регулюючий клапан	JASKA D201	СВ Альтера м. Київ
4а 5а	pH	В агрегатах	Для вимірюваннярНводних речовин у стаціонарнихумовахпромисловогопідприємства	pH-101П	ОООКомпанія «Химснаб-жение» м. Харків

4б 5б	pH	Нащиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
4в 5в	pH	По місцю	Регулюючий пневматичний клапан	Dwyer серія Hi-Flow 2001VA32- 230-L0	СВ Альтера м. Київ

## РОЗДІЛ 11. Охорона довкілля

### 11.1. Аналіз технологічної схеми виробництва ферментного препаратупектинази та ідентифікація місць емісії рідких та газоподібних відходів

Для того, щоб виявити наявність рідких та газоподібних відходів, необхідно детально проаналізувати технологічну схему по окремим стадіям.

#### 1.1 Короткий опис кожної стадії технологічного процесу

**1. Санітарна підготовка виробництва.** На даному етапі проводиться миття обладнання за допомогою СІР-мийки, а також підготовка приміщень, миття стін, підлоги, вікон, дверей, поверхонь. Зокрема на цій стадії використовуються великі обсяги миючих засобів, таких як DivosanForteVT6 та Дезоксін. Після обробки, відпрацьовані мийні розчини та промивна вода з відповідними забруднювачам прямує до каналізації звідки вже має згодом залишити межі виробництва.

*Отже, робимо висновок, щоцей етап є місцем емісії значної кількості рідких відходів.*

**2. Підготовка аераційного повітря.** На стадії охолодження повітря та видалення вологи в теплообмінник подається вода, яка в подальшому йде на повторне використання або утилізується. На стадії підігріву повітря утворюється конденсат, який також потребує повторного використання або зливу в каналізацію.

*Отже, на даному етапі утворюються незначні рідкі відходи, проте їх переробку також необхідно забезпечити.*

#### **3. Приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів.**

Титрувальні розчини, які використовуються представлені 6% розчином соляної кислоти та 6% розчином гідроксидом натрію.

					<b>НУХТ БТЕК 04.02.36 ДП ПЗ</b>		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 11. Охорона довкілля</b>		
Розроб.		Дзуман Д.В.					
Перевір.		Пенчук Ю.М					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.			Літ.	Арк.	Акрушів
					Кафедра БТМ		

На даному етапі відходи можуть складати лише певні невеликі кількості розчинів, що втратили свої показники нормативної відповідності через певний ряд умов, і не можуть використовуватися в подальшому виробництві. Всі розчини далі передаються на етап виробничого біосинтезу (6 етап).

*Отже, у разі утворення відходів на даному етапі, титрувальні розчини для зливу в каналізацію необхідно нейтралізувати відповідним кислим чи лужним розчином.*

**4. Приготування та стерилізація поживних середовищ.** При приготування поживних середовищ можливе відбракування сировини при невідповідності якісних показників, проте передбачається порівняно мала кількість таких відходів. Далі поживне середовище передається на етап підготовки посівного матеріалу (5 етап) та виробничого біосинтезу (6 етап).

**5. Підготовка посівного матеріалу.** Під час культивування аеробного мікроорганізму, продуцента пектинази, необхідно забезпечити подачу аераційного повітря. В результаті чого існує необхідність знешкодження відпрацьованого повітря.

*Отже на даному етапі отримуємо місце емісії значних газо-повітряних відходів.*

**6. Виробниче культивування.** В результаті утворюється культуральна рідна, що передається на подальші післяферментаційні процеси (ПП 7). Рідкі відходи можуть виділятися лише за непередбачуваних обставин, повітряні відходи як і на минулому етапі утворені відпрацьованим аераційним повітрям. Концентрація біомаси становить 10 г/л. *Цей етап також є місцем емісії значних обсягів газо-повітряних відходів.*

**7. Центрифугування.** Із робочого ферментеру культуральну рідину подають на центрифугувальну установку з охолодженням з 15 500 об/хв впродовж 30 хв. Відходами даного етапу є фільтрат – біомасапродуцента пектинази *Bacillus subtilis* EFRL 01, який містить залишки компонентів поживного середовища. *Передбачаємо, що даний етап є місцем твердих відходів.*

**8. Ультрафільтрація.** Одержаний супернатант піддають ультрафільтрації, робочим елементом якої є напівпроникна мембрана з середнім діаметром пор  $d = 0,3$  мкм. *Предбачаємо, що даний етап є місцем утворенням незначної кількості твердих відходів.*

**9. Осадження пектинази.** У виробництві очищених ферментних препаратів широко застосовується метод осадження ферментів органічними розчинниками. Найбільш ефективним є метод осадження за допомогою етанолом. *Предбачаємо, що на даному етапі утворюється незначна кількість рідких відходів.*

**10. Сепарація.** Відділення рідкої органічної фази від осаду.

*Отже, на даному етапі утворюються рідкі відходи, проте їх переробку також необхідно забезпечити.*

**11. Сушка.** Вологий фермент сушать в вакуумних сушильних камерах, які обогріваються водою температурою 50 – 60 °С. *Предбачаємо, що даний етап є місцем емісії незначних обсягів газо – повітряних відходів.*

## **11.2. Характеристика відходів виробництва пектинази**

### **2.1. Характеристика рідких відходів у виробництві пектинази**

**2.1.1. Розрахунок об'ємів рідких відходів.** Для щоденного прибирання готують 10% розчин «Дезоксін», тому за один цикл виробництва ( 90 год ) витрачається 2,5 л робочого розчину, який після відпрацювання зливається в каналізацію. За весь цикл виробництва проводять 4 генеральних прибирань тим самим 10% розчином «Дезоксін». Миття обладнання проводять 3% розчином DivosanForteVT6, об'єм відходів за один цикл – 1 920 л. Усі мийні засоби є безпечними для навколишнього середовища і мають клас безпеки -IV.

### **2.1.2. Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів.**

Для миття та дезінфекції ємнісного обладнання на виробництві пектинази ми будемо використовувати циркуляційн

у СІР-мийку (Cleaninginplace) для багаторазового використання для зменшення витрат (зменшення витрат на 20%) мийного засобу під час

виробничого процесу. Вибір саме такого обладнання для миття зумовлений рядом переваг [2]:

- ⇒ можливість багаторазового використання миючих засобів;
- ⇒ підтримання заданої концентрації, температури миючих засобів, часу обробки в автоматичному режимі;
- ⇒ автоматичний та ручний режим роботи;
- ⇒ можливість модернізації процесу дезінфекції;
- ⇒ економічність витрат миючих засобів;
- ⇒ надійність і простота у використанні.

Склад рідких відходів представлений мийно-дезінфікуючими розчином з залишками культуральної рідини та компонентів поживного середовища. Детальніше склад і приблизні об'єми наведені в таблиці 11.2.

Таблиця 11.2

**Характеристика рідких відходів на виробництві ферментного препарату пектинази *Bacillus subtilis* EFRL 01**

<i>Назва складової рідких відходів</i>	<i>Речовини що входять до складу</i>	<i>Приблизні об'єми за виробничий цикл (л)</i>	<i>Клас небезпеки</i>
3 % розчин Divosan Forte VT6	Пероксид водню; оцтова кислота; наоцтова кислота	1 920 л	IV клас
10 % розчин Дезоксін	Пероксид водню; дидецилдиметиламоній хлорид; алкілдиметилбензиламоній хлорид; функціональні добавки; вода	2,5 л	IV клас
Поживне середовище	Глюкоза; пептон; MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	Мізерні кількості (у разі помилок)	IV клас
Культуральна рідина	Біомаса та поживне середовище	Мізерні кількості (у разі помилок)	IV клас
Всього		Приблизно 1 922,5 л	IV клас

### 2.1.3. Утилізація рідких відходів

Вважаючи, що дане виробництво за своїми обсягами є малотонажним, тоді можна сказати, що на 1 т продукцію припадає приблизно 150 - 170 м<sup>3</sup> стічних вод.

Найефективніший варіант очищення стічних вод – поєднання механічного, хімічного, та біологічних методів.

Очищення стічних вод від механічних домішок здійснюють за допомогою проціджування, що забезпечує затримання порівняно великих частин забруднень, розміри яких перевищують 15–20 мм.

Хімічне очищення – за допомогою додавання до стічних вод (очищених від механічних домішок) речовин-коагулянтів, що сприяють прискореному виділенню нерозчинних і частково розчинних речовин, які при відстоюванні не випадають в осад [3].

Біологічне очищення - за допомогою анаеробного реактору UASB.

**Конструкція:** Анаеробний реактор, який заповнений гранульованою або у вигляді клаптів (згустків) біомасою, що складається з двох видів бактерій: кислотоутворюючих, метаногенних.

**Принцип дії:** Здатність мікроорганізмів використовувати різноманітні речовини, які містяться в стічних водах, у якості джерела живлення в процесі життєдіяльності. Таким чином мікроорганізми звільняють воду від забруднень [4].

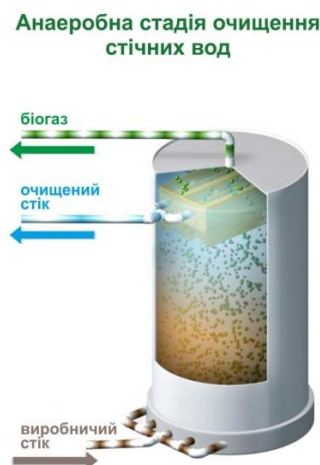


Рис.11.1 Анаеробний реактор UASB

Таким чином знешкоджені стічні води, з виробництва, є екологічно безпечними і можуть бути подані як в навколишнє середовище, так і станції доочищення.

## **2.2. Характеристика газоподібних відходів виробництва пектинази**

**2.2.1. Розрахунок об'ємів газоподібних відходів.** Основна кількість газоподібних відходів виробництва утворюються на етапі отримання посівного матеріалу, виробничого біосинтезу. А також незначна кількість газоподібних відходів утворюється під час процесу сушіння. У складі газоподібних відходів наявний вуглекислий газ і аерозоль бактеріальних спор.

Тривалість процесу отримання посівного матеріалу складає 45 год, а виробничого біосинтезу – 90 год. Для аерації середовища використовують стерильне повітря зі швидкістю аерації – 1 л/хв.. У виробничому приміщенні встановлюють 4 ферментаційні апарати. Таким чином, приблизний об'єм відпрацьованого повітря буде становити:  $3 \times (60 \times 45) + 1 \times (60 \times 90) = 13500$  л ( $13,5 \text{ м}^3$ ).

Для розрахунку об'єму відпрацьованого повітря під час процесу сушіння приймаємо, що сушарка має продуктивність  $G = 70$  кг/хв з витратою сушильного агенту 0,3 л/с. Тривалість сушіння 20 кг вологої пектинази триває 80 хв. Тоді, розрахунковий об'єм сушильного агенту і відповідно об'єм відпрацьованого повітря становить:  $80 \times (0,3 \times 70) = 1680$  л ( $1,6 \text{ м}^3$ ).

Оскільки продуцент пектинази *Bacillus subtilis* EFRL 01 належить до класу безпечності BSL-1, а сам ферментний препарат належать до IV класу небезпеки, то і газоподібні відходи матимуть клас небезпеки – IV.

**Характеристика газоподібних відходів на виробництві ферментного препарату пектинази *Bacillus subtilis* EFRL 01**

<i>Назва складової рідких відходів</i>	<i>Речовини що входять до складу</i>	<i>Приблизні об'єми за виробничий цикл (м<sup>3</sup>)</i>	<i>Клас небезпеки</i>
Відпрацьоване повітря після ферментації	СО <sub>2</sub> , аерозоль бактеріальних спор	13,5	IV клас
Відпрацьоване повітря після сушіння	Аерозоль механічних часток від пектинази	1,6	IV клас
Всього:		15,1	IV клас

### 2.2.2 Утилізація газоподібних відходів

Для очищення газо-повітряних відходів пропонується використати – фізичний метод.

**Принцип дії:** очищення повітря в розглянутій схемі буде проходити в два етапи: перший – затримання вегетативних клітин і спор на волокнистому фільтрі Петрянова фланцевої конструкції зі змінною фільтрує касетою (матеріал - БСТВ, полістирол або перхлорвініла). Проскакування частинок для цього фільтра може складати 0,01-0,1%. Тому вважаємо необхідною наявність другої стадії очистки.

Для знищення спор, що проникають за фільтр, пропонується використовувати обробку повітря, що відходить водяною парою. Установа (Рис. 2.2.) передбачає парову камеру з інжекцією гострої пари, і подальший охолоджувач для відділення конденсату пари. У холодильнику водяна пароконденсується, а очищене повітря продовжує рухатись по технологічному ланцюгу. Конденсат стікає в камеру нагріву, де за рахунок підведення тепла відбувається утворення пари, що подається на стерилізацію повітря [5].

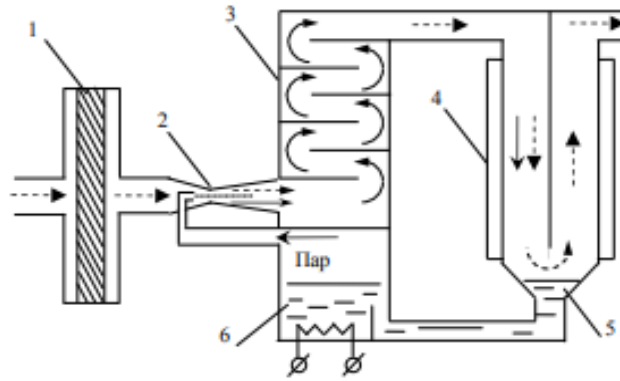


Рис. 2.2. Схеми очистки повітря фізичним методом:

- 1 – фільтр; 2 – дифузор; 3 – термокамера витримання;  
 4 – холодильник; 5 – збірник конденсату; 6 – нагрівач.

### 2.3. Характеристика твердих відходів виробництва пектинази

**2.3.1. Розрахунок об'ємів твердих відходів.** Тверді відходи етапу санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ представлені пакувальною тарою для мийних засобів і компонентів поживного середовища. Тара для мийних засобів виготовлена із поліетилену високої щільності, який піддається вторинній переробці.

Деякі компоненти поживного середовища поставляються в упаковці з полівініл хлориду, який вважають важко піддається вторинній переробці і тому його заборонено утилізувати разом з іншими видами пластику.

До твердих відходів виробництва належить також біомаса бактерій, яка утворюється після центрифугування культуральної рідини. Вона утворюється в кількості близько 112 кг. *Bacillus subtilis* EFRL 01 належить до класу безпеки BSL-1, що означає, безпечність для здоров'я людини та тварини.

**Характеристика твердих відходів на виробництві ферментного препарату пектинази *Bacillus subtilis* EFRL 01**

<i>Назва складової рідких відходів</i>	<i>Речовини що входять до складу</i>	<i>Приблизні об'єми за виробничий цикл (кг)</i>	<i>Клас небезпеки</i>
Пластикова тара для мийних засобів	HDPE - 2 – поліетилен високої щільності	0,4	IV клас
Відпрацьоване повітря після сушіння	HDPE - 2 – поліетилен високої щільності; PVC – 3 – полівініл хлорид	0,4	IV клас
Бактеріальна маса	Біомаса культури <i>Bacillus subtilis</i> EFRL 01	112	IV клас BSL-1
Всього:		112,8	

**2.3.2. Утилізація твердих відходів.** На даному виробництві кількість твердих відходів є досить незначною, тому для утилізації тари від мийних засобів і компонентів поживного середовища їх попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини на переробку.

Бактеріальна маса також належить до твердих відходів виробництва. Тому було б доцільно використовувати її в якості компосту для реалізації сільськогосподарської галузі. Бактеріальну масу можна додавати в якості підживки до основного добрива, а також вносити як самостійний готовий препарат.

Однією з корисних властивостей бактерій роду *Bacillus subtilis* є їх здатність до вироблення фітогормонів, подібних до тих, що синтезуються в самому рослинному організмі. Ці сполуки в надзвичайно низьких концентраціях здатні регулювати різноманітні процеси в тканинах рослини, а особливо – впливати на швидкість росту. Тому застосування біомаси в цілому підвищує врожайність рослини [6].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Confortin T. C., Spannenberg S. S., Todero I., Luft L. Microbial Enzymes as Control Agents of Diseases and Pests in Organic Agriculture. Department of Chem. Eng. 2019, 21: 321 – 332.
2. Rosales E., Pazos M., Sanroman A. Solid-State fermentation for food applications. Current Developments in Biotechnol. and BioEng. 2018,15: 319 – 355.
3. Мараева О. Б., Ухина Е. Ю. Новая технология получения яблочного сока. Пищевая промышленность. - ВГАУ. 2008, 7: 20 – 21.
4. A.S. Qureshi. Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in a date syrup medium. Academic Journals. 2012, 11(62). DOI: 10.5897/AJB11.4236
5. H. Enshasy, E.Elsayed, N.Suhaimi, R.Malek, M.Esawy., Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. El Enshasy et al. BMC Biotechnology. 2018, 13. doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7
6. VIAZYM EXTRACT (Виазим Экстракт). [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.martinviolate.com/wp-content/uploads/2017/07/FT\\_MV\\_VIAZYMEXTRACT\\_RU.pdf](https://www.martinviolate.com/wp-content/uploads/2017/07/FT_MV_VIAZYMEXTRACT_RU.pdf)
7. INOZYME (ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ). [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://ioc.eu.com/wp-content/uploads/documents/ioc/ft/FT%20INOZYME%20\(RU\).pdf](https://ioc.eu.com/wp-content/uploads/documents/ioc/ft/FT%20INOZYME%20(RU).pdf)
8. Пектиназа ENZIM. Фермент для гидролиза растительных полисахаридов (пектиновых веществ) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ferment.enzim.biz/pektinaza.html>
9. F.Guo, X.Li, J.Zhao, G.Li, P.Gao, X.Han., Optimizing Culture Conditions by Statistical Approach to Enhance Production of Pectinase from *Bacillus sp.* Y1. *BioMed Research International*.2019, 10 pages. doi.org/10.1155/2019/8146948
10. H.Enshasy, E.Elsayed, N.Suhaimi, R.Malek, M.Esawy., Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger*NRC1ami in a

submerged cultivation system. El Enshasy et al. *BMC Biotechnology*. 2018, 13 pages. doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7

11. P.Yu, C.Xu., Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus sp.* ZJ1407. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 31 pages. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.012

12. Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.О. та ін. Медична мікробіологія, вірусологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П. Широбокова / Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011. – 952 с.

13. Юматова М.А. Исследование культуры микроорганизма *Bacillus subtilis* на физиолого – биохимические признаки. *Вестник науки и образования* № 6(60): 5-8. DOI: 10.20861/2312-8089-2019-60-002

14. Васильев Д.А, Архипова Г.Ф., Николайчук Л.Ф. Бактерии *Bacillus cereus* и межвидовая рекомбинация с *Bacillus anthracis* как угроза здоровью человека. – Ульяновск 2013. – с. 88.

15. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – 471с.

16. Confortin T. C., Spannenberg S. S., Todero I., Luft L. Microbial Enzymes as Control Agents of Diseases and Pests in Organic Agriculture. *Department of Chem. Eng.* 2019, 21: 321 – 332

17. M. Mahmoodi, G. D. Najafpour, M. Mohammadi. Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *J. Food Sci. Technol.* 2017, 54(12): 4123 – 4128.

18. Мараева О. Б., Ухина Е. Ю. Новая технология получения яблочного сока. *Пищевая промышленность*. - ВГАУ. 2008, 7: 20 – 21.

19. Панкина И. А., Белокурова Е. С. Интенсификация технологии получения сока из плодово-ягодного сырья с высоким содержанием пектина. *Научный журнал НИУ ИТМО*. 2017, 1: 36 – 40.

20. Кожухова М. А., Теркун А. Н., Рожков С. Е. Биотехнологические методы в производстве плодовоовощных соков и нектаров. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2003, 4: 5 – 9.

21. Кожухова М. А. Получение овощных соков и напитков с использованием биотехнологических методов. Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2007, 5: 23 – 27.
22. Алсивар С. К. А., Курбатова Е. И., Соколова Е. Н., Римарева Л. В. Биотехнологический способ переработки цитрусовых для получения осветленных соков. Ингредиенты для производства пива и напитков. 2013, 4: 18 – 22. 66
23. Cocol Ana Maryani, Fahrurrozi, Anja Meryandini. Pectinase production and clarification treatments of apple (malus domestics) juice. Annales Bogorienses. 2017, 21(2): 63 – 68.
24. Кручак Л. В. Ринок соків в Україні: аналіз стану та оцінка впливу дебіторської заборгованості покупців на його розвиток. Облік і фінанси. – Тернопіль. 2017, 3(73): 147 – 152.
25. Исследование рынка соков в Украине: анализ производства и потребления. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://koloro.ua/blog/issledovaniya/issledovanie-rynka-sokov-v-ukraine-analizproizvodstva-i-potrebleniya.html>
26. Пектиназа ENZIM. Фермент для гидролиза растительных полисахаридов (пектиновых веществ) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ferment.enzim.biz/pektinaza.html>
27. Nighojkar A., Patidar M. Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. Processing and Sustainability of Beverages. 2019, 8: 235 – 273.
28. Совершенствование технологии производства соков. [Электронный ресурс] – Режим доступа: [https://ozlib.com/810779/tovarovedenie/sovershenstvovanie\\_tehnologii\\_proizvodstva\\_sokov](https://ozlib.com/810779/tovarovedenie/sovershenstvovanie_tehnologii_proizvodstva_sokov)
29. *Малежик І.* Процеси та апарати харчових виробництв. – К.: НУХТ, 2003. – с. 400.
30. *Сидоров Ю.І.* Промислові ферментери // Журнал “Біотехнологія” – 2012. –Т.5, №3 – с. 33-39.

31. 1. Бейли Дж. Основы биохимической инженерии: монография / Дж. Бейли, Д. Оллис / пер. с англ. в 2 частях. — М.: Мир, 1989. — Ч. 2. — 590 с.
32. Гордеева Ю.Л. Алгоритмы расчета показателей процесса микробиологического синтеза в периодических условиях культивирования / Ю.Л. Гордеева, Ю.А. Ивашкин, Л.С. Гордеев // Вестник Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер: Управление, вычислительная техника и информатика. — 2011. — № 2. — С. 7—14.
33. Сидоров Ю.І. Пілотні ферментери ємнісного типу // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 2. — С. 68—75. 4. Ферментеры. Современная практика выбора оборудования / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. — 2006. — № 3. — С. 34—37.
34. *Попов А. Ю.* Ферментеры. Современная практика выбора оборудования // Чистые помещения и технологические среды. — 2006. — № 3. — С. 34—37.
35. *Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П.* Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. — Львів: ІнтеллектЗахід, 2008. — 736 с.
36. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудование микробиологических производств. — М.: Агропромиздат, 1987, с. 107 – 124.
37. Виды компрессоров [Электронный ресурс] – Режим доступа: [https://compressorgroup.ru/info/articles/vidy\\_kompressorov/](https://compressorgroup.ru/info/articles/vidy_kompressorov/)
38. Какие бывают ресиверы для воздуха и газа. Виды, типы ресиверов. Преимущество и недостатки различных конструкций [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://resiver.su/articles/kakie-byvaut-resivery-dlya-vozdruha-i-gazapreimushstva-i-nedostatki>
39. Карлаш Ю. В. Основы проектування біотехнологічних виробництв. [Электронный ресурс]: конспект лекцій для для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо- 67 професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – с. 50 – 55.

40. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2020 рік. [Електронний ресурс] – Режим доступа: [https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020\\_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf](https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D1%83%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8/%D0%94%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%BF%D1%83%D0%B1%D0%BB%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97/2020_%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B21.pdf).

41. Каустична сода для дезінфекції. [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://www.systopt.com.ua/article-kaustycheskaya-soda-dlya-dezynfekcyu>

42. ДЕЗОКСІН средство для очистки и дезинфекции поверхностей и изделий медицинского назначения.. [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p1175060959-sredstvo-dezinfektsii-dezoksin.html>.

43. «Дісмозон<sup>®</sup> пур». [Електронний ресурс] – Режим доступа: <http://wylan.com.ua/ru/product/109/Dismozon-pur.vis>.

44. Дезинфекция и Санитарная обработка на пищевых предприятиях. [Електронний ресурс] – Режим доступа: <https://preiclass.ru/catalog/dive/diversey-desinfection/diversey-divosan-forte-vt6.html>.

45. Асташкина А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов. Методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения. Томск.: ТПУ. 2015. – 19 с.

46. Семенова М.В. Гришутин С.Г., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Снцицын А.П. Выделение и свойства пектиназ из гриба *Aspergillus japonicus* // Биохимия. - 2003. - Т. 68. № 5. - С. 686-697.

47. Grishutin S.G., Gusakov A.V., Markov A.V., Ustinov V.V., Seinenova M.V., Synytsyn A.P. Specific xylogluconases as a new class of a polysaccharide -

degrading enzymes // *Biochimica and biophysica Acta.* - 2004. - Vol. 3. - P. 268-281.

48. Yadav S., Yadav P.K., Yadav D., Yadav K.D.S. Pectinlyase: a review // *Process Biochemistry.* - 2009. - Vol. 44. - P. 1-10.

49. Шубаков А.А. Селекция культуры *Penicillium dierckxii* - продуцента полигалактуроназ // *Естеств. и техн. науки.* -2009. - №3. - С. 152-153.

50. Kashyap D.R., Vohra P.K., Tewari R. Application of pectinases in the commercial sector: a review // *Bioresour. Technol.* -2001. - Vol. 77. - P.215-227.

51. Буценко Л. М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів : навчальний посібник для студ. вузів, які навч. за напрямом підготовки "Біотехнологія" / Л. М. Буценко, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. - К. : НУХТ, 2010. - 323 с.

52. Донцов Л.Г., Шубаков Л.Л. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез. Екатеринбург УрО РАН, 2010.-164 с.

53. Лобанюк А.Г. Исследование биосинтеза пектиназ, целлюлаз и лизоэнзимов микроорганизмами. - Минск: Микробный синтез биологически активных соединений, 1976. - С. 106-120.

54. Донцов А.Г., Шубаков А.А. Активация полигалактуроназ в процессе очистки: эффект использования кальцийсодержащих носителей // *Естеств. и техн. науки.* - 2009. - №6. - С.196-198.

55. Ngo L.T.A., Pham T.L., Le V.V.M. Purification of endopolygalacturonase from submerged culture of *Aspergillus awamori* LI using a two-step procedure: enzyme precipitation and gel filtration // *International Food Research Journal.* - 2008. -Vol.15, №2,-P.135-140.

56. Nasuno S., Starr M.P. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora* II *Journal Biol. Chem.* - 1966. - Vol. 241, №22. - P. 5298-5306.

57. Miyairi K., Matsue T., Kagawa O. et al. Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Physalospora piricola* // *Biosci. Biotech. Biochem.* - 1994. - Vol. 58, № 10. - P. 1909-1910.

58. Пат. 2195492 РФ. Способ получения пектолитического ферментного препарата: МПК С12N9/14, С12N9/24 / А.Г. Донцов, З.В. Хозяинов, А.А. Шубаков, Ю.С. Оводов; заявитель и патентообладатель Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. -№ 2000122994/13; заявл. 04.09.2000; опубл. 27.12.2002.

59. Шубаков А.А., Донцов А.Г., Челпанова Т.И., Елькина Е.А. Выделение и очистка полигалактуроназ *Aspergillus niger* и *Penicillium dierckxi* // Химия растительного сырья. - 2008.- №4. - С. 119-123.

60. Микродозатор (шнековый дозатор малых добавок) ДМД 50 [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.stroymehnika.ru/dmd\\_50.php](https://www.stroymehnika.ru/dmd_50.php)

61. Микродозаторы MBF. Универсальная модульная конструкция системы [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://wamgroup.com.ua/ruRU/WAMUA/Product/MBF/%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B>

62. СІП-мийка компанії АТТІС. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.attis.com.ua/site/equipment/CIP.html>

63. Поверхностный центробежный насос Grandfar СРm 130 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://marsus.ua/nasos/poverkhnostnyye-nasosy/poverhnostnytsentrobegnyj-nasos-grandfar-cpm-130/>

64. Центробежный насос Pedrollo CP 210B [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pedrollo-ua.com/products/tsentrobezhnyj-nasos-pedrollo-cp-210b>

65. КУПИТЬ PEDROLLO JDWM 2/30-4 [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://nasos-m.com.ua/nasosi/nasosi\\_pedrollo/pedrollo\\_jdwm\\_2\\_30-4.html](https://nasos-m.com.ua/nasosi/nasosi_pedrollo/pedrollo_jdwm_2_30-4.html)

66. Приточно-витяжні установки. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://vz.com.ua>

67. Фільтри різних типів очистки. [Электронный ресурс] Режим доступа <https://bcompressor.ru/magistralnyy-filtr-fm-480-10>

68. Коспресори. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bcompressor.ru/kompressor-C-412M>
- 69.осушувачі. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bcompressor.ru/Osushitel-BERG-OB-4>
70. Ресивер. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bcompressor.ru/resiver-rv110-1068>
71. Система підігріву повітря. [Электронный ресурс] Режим доступа: [http://www.galactic.kiev.ua/pages/painting\\_cameras\\_equipment/air\\_heating\\_system.php](http://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php)
72. Фильтр грубой очистки воздуха G3-G4. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>
73. Реакторы среднего давления Pope Scientific (США) [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://tirit.org/reactor\\_him/lab\\_steel\\_pope.php](https://tirit.org/reactor_him/lab_steel_pope.php)
74. Сборники стальные эмалированные [Электронный ресурс] Режим доступа: [http://euromash.kiev.ua/ru/sborniki\\_emal\\_ru.php](http://euromash.kiev.ua/ru/sborniki_emal_ru.php)
75. Реактор-смеситель номинальным объемом 150 л. Сталь AISI 316L [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://kpht.ru/katalog-oborudovaniya/smesitelnoeoborudovanie/reactor-smesitel-nominalnym-ob-emom-150-l-stal-aisi-316l>
76. Индивидуальные фильтры [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.omi-italy.it/en>
77. Лабораторный биореактор Pro-Lab 12 л [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/bioreaktory/laboratornyy-bioreaktor-pro-lab-s-dvumyakulturalnymi-sosudami-obemom-7-12-l/>
78. BioFlo 120 – лабораторный ферментер/биореактор [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://labinstruments.ru/equipment-bioreaktory-i-fermenterybioreaktory/ependorf-bioflo-120#opisanie>
79. Биореактор 1200 л для трёх способов культивирования [Электронный ресурс] Режим доступа:

<https://biotechno.ru/catalog/promyshlennye-bioreaktory/bioreaktor1200-l-dlya-trekh-sposobov-kultivirovaniya/>

80. Роторный насос НМ-03 (12,5 м<sup>3</sup> /час) 3-х лепестковый ротор [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://stream-energy.com.ua/p751038990-rotornyj-nasos125m3chas.html>

81. Ферментер\Биореактор Solida Biotech SIP Производственный 500L-50000L [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://pharmaspb.com/products/sldsipindustrial> Андрианова Т.В., Бобир В.В., Виноград Н.О. та ін. Медична мікробіологія, вірусологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад / За редакцією В.П. Широбокова / Видання 2-е. – Вінниця: Нова Книга, 2011. – 952 с.

82. Юматова М.А. Исследование культуры микроорганизма *Bacillus subtilis* на физиолого – биохимические признаки. Вестник науки и образования № 6(60): 5- 8. DOI: 10.20861/2312-8089-2019-60-002

83. Гусаков А.В., Марков А.В., Гришутин С.Г., Семенова М.В., Кондратьева Е.Г., Сеницын А.П. Вискозиметрический метод определения общей эндодеполимеразной активности пектиназ // Биохимия. - 2002. -Т. 67, № -6. -С. 815-822.

84. Горюшкіна Т. Б, О. В. Остроухова. В. О, Солдаткін.О .П, Дзядевич С. В. Оптимізація методики визначення вмісту глюкози у виноматеріалі ензимним амперометричним біосенсором // Біотехнологія. – 2009, 2(1): 89 – 93

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

с