

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан
факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

« » червня 2022 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ
(ім'я та прізвище)

« » червня 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

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

на тему: Культивування *Brevibacillus laterosporus* для виробництва
альгіцидного препарату

Виконав: здобувачки 4 курсу, групи 2

БЕЗКОРОВАЙНА КАТЕРИНА ІВАНІВНА
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ВОРОНЦОВ ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

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

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БЕЗКОРОВАЙНОЇ Катерини Іванівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Brevibacillus laterosporus* для виробництва альгіцидного препарату

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, к.т.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи: штам *Brevibacillus laterosporus* ВКПМ В – 10531; вихід біомаси - 7,4 г/л; просте та дешеве середовище для культивування;

час	культивування	-	48
-----	---------------	---	----

год

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Розділ 1. Характеристика цільового продукту; Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; Розділ 3. Техніко - економічне обґрунтування; Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 5. Специфікація обладнання; Розділ 6. Опис технологічної схеми; Розділ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А-1. Технологічна схема 1 лист А-1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Приймає
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	04.04.2022-08.04.2022	
	Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.04.2022-15.04.2022	
	Розділ 3. Техніко - економічне обґрунтування	17.04.2022-22.04.2022	
	Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	23.04.2022-28.04.2022	
	Розділ 5. Специфікація обладнання	30.04.2022-06.05.2022	
	Розділ 6. Опис технологічної схеми	08.05.2022-13.05.2022	
	Розділ 7. Контроль виробництва	15.05.2022-19.05.2022	
	Виконання графічної частини проекту	13.05.2022-20.05.2022	
	Оформлення пояснювальної записки	23.05.2022-01.06.2022	

Здобувач _____
(підпис)

БЕЗКОРОВАЙНА Катерина
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

ВОРОНЦОВ Олександр
(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	6
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	8
<i>2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування</i>	8
<i>2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента</i>	14
<i>2.3. Таксономічний статус біологічного агента</i>	16
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	17
<i>3.1. Потреба у цільовому продукті</i>	17
<i>3.2. Розрахунок потужності виробництва</i>	18
<i>3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера</i>	19
<i>3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу</i>	19
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	21
<i>4.1. Обґрунтування умов і способу культивування біологічного агента та підготовки поживного середовища</i>	21
<i>4.1.1. Вибір умов і способу культивування</i>	21
<i>4.1.2 Вибір типу ферментера</i>	23
<i>4.1.3. Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря</i>	25
<i>4.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів</i>	27
<i>4.1.4.1 Класифікація миючих засобів за агрегатним станом:</i>	28
<i>4.1.4.2 Дезінфікуючі засоби.</i>	29
<i>4.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища</i>	30
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	34
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	36
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	49
<i>7.1. Визначення концентрації біомаси</i>	52
<i>7.2. Мікробіологічний контроль</i>	53
<i>7.3 Визначення концентрації джерела вуглецю.</i>	54
<i>7.3 Концентрація джерела азоту</i>	56
<i>7.4 Визначення кількості КУО</i>	57
ВИСНОВКИ	58
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	59
ДОДАТКИ	65

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробці технології та схем біосинтезу одержання альгіцидного препарату, виділеного з *Brevibacillus laterosporus*, для широкого використання та протидії формування водоростей в басейнах. Технологічний процес складається з допоміжних (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища та ін.) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу).

Кваліфікаційна робота викладена на 66 стор. друкованого тексту, містить 13 таблиць, 4 рисунки, і складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (55 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: Альгіцид, біологічний агент *Brevibacillus laterosporus*, штам-продуцент, поживне середовище, біосинтез

ВСТУП

В останні роки у зв'язку з бурхливим розвитком біотехнології та завданнями забезпечення екологічних умов життя та виробництва посилюється інтерес до спороутворювальних бактерій. Головними об'єктами фундаментальних та прикладних досліджень протягом багатьох років були бактерії *Bacillus subtilis* та *Bacillus thuringiensis*. Штами *B. Subtilis* використовуються як продуценти ферментів та як пробіотики, бактерії *B. thuringiensis* є практично унікальними біологічними продуцентами засобів захисту рослин. Тим часом, дослідження останніх років свідчать, що є бацили, які мають низку цінних у прикладному сенсі.

Серед них важливе місце посідають бактерії *Brevibacillus laterosporus* (колишня назва – *Bacillus laterosporus*). Показано, що бацили *B. laterosporus* (BL) здатні до синтезу інсектицидних факторів, ферментів, продукують цілий спектр антагоністичних факторів, у тому числі, володіють антибактеріальним ефектом, фунгіцидною та ціанолітичною активностями, їх застосовують як ефективні пробіотики.

Зростає інтерес до біологічних агентам, що пригнічують розвиток мікроскопічних водоростей. Серед мікроорганізмів, що продукують біологічно активні сполуки різної спрямованості, в останні роки особливе місце займають спороутворюючі грампозитивні бактерії *Brevibacillus laterosporus*. Інтерес до цих бактерій обумовлений відсутністю вони токсичності для теплокровних тварин. Штами *B. laterosporus* мають низку біотехнологічних переваг: легко культивуються на відносно дешевих

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Безкоровайна К.І.			Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Воронцов О.О.				1	2
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.					ВСТУП		
Затверд.		Стабніков					

поживних середовищах, не вимагають спеціальних умов для культивування, штами бацил можуть підтримуватися в лабораторних умовах протягом тривалого часу. В даний час описані штами *B. laterosporus*, які синтезують ряд біологічно активних сполук, у тому числі антибіотики, пестицидні фактори, ферменти, альгіциди, нематоциди та і т.д. Вищесказане свідчить про високий біотехнологічний потенціал штамів *Brevibacillus laterosporus* як можливих продуцентів широкого спектру антибіотичних факторів. [1,2,17]

Актуальність

Для підтримки чистоти води басейну на сьогодні більш розповсюдженими є хімічні препарати (AquaDoctor AC Mix, ALGA-D Algaecid, Anti ALGAS), але вони не є досить ефективними. Більш результативними є біопрепарати, тому наразі є актуальним пропонування виробництва біобезпечного препарату, що не є розповсюдженим в країні. Гарним прикладом є бактерії *Brevibacillus laterosporus*, що пригнічують ріст та розвиток мікроводоростей (таких ціанобактерій, як спіруліна, осцилаторії, мікроцистинові водорості).

Новизна.

Як продуцент запропоновано мутантний штам *Brevibacillus laterosporus* ВКПМ В – 10531, який продукує біомасу 7,4 г/л на порівняно дешевому поживному середовищі та пригнічує ріст і розвиток мікроводоростей.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Препарат Понд Трит – рідкий концентрат, що використовують для убереження води від різних видів водоростей. В складі препарату містяться бактерії, які очищують воду від мутності та роблять її прозорою.

[3]

Результат застосування:

- Очищення води басейну під час цвітіння води;
- Рівня донного осаду;
- Відновлення прозорості води;
- Зменшення кількості патогенних мікроорганізмів.

Засіб вноситься у водойму у вигляді готового розчину. Для визначення потрібної дози можна використовувати розрахункову таблицю:

Таблиця 1.1

Площадь водоёма в гектарах (10000 кв.м)	Стартовая доза: концентрат/готовый раствор (л)
1	0,2/40
2	0,4/80
3	0,6/120
4	0,8/160

В ідеалі при внесенні біопрепарату у водойму його потрібно рівномірно розподілити по периметру, на відстані 2-3 метра від берега. Через 2 тижні дана процедура повторюється. Якщо за цей час спостерігаються покращення в стані водойми, можна вносити дозу вдвічі меншу за стартову. Якщо ж результат ще не очевидний, допускається внесення

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 1</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акцшів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Безкорвайна К.І.</i>					1	2
<i>Перевір.</i>		<i>Воронцов О.О.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>						

препарату в дозі рівній стартовій. Оптимальна температура води для застосування Понд Тріт від +20°C до +35°C.

Рідкий концентрат Понд Тріт виготовлений в США компанією «BIO-GREENPLANET». Термін придатності 2 роки з дати виготовлення. Зберігати продукт необхідно в холодильнику у вигляді концентрату при температурі від +3°C до +6°C.

Ефективність препарату залежить від хімічного складу води, її температури і періоду застосування відповідно до рекомендованих виробником доз. Зазвичай бажаний результат спостерігається протягом двох місяців застосування.[4]



Рис. 1.1. Понд-Тріт [5]

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

В ході еволюції мікрободорості адаптувалися до несприятливих факторів зовнішнього середовища. Здатність мікрободоростей швидко розмножуватись пов'язана, в першу чергу, з їх стійкістю до екстремальних температур та концентрацій солей, слабким освітленням, малій кількості кисню. «Цвітіння води» призводить до погіршення її якості. Деякі види мікрободоростей при розпаді та гнитті складу біоплівки продукують специфічні нейро- та гепатоксини, які є серйозною загрозою для здоров'я людей.[6]

Існує кілька шляхів по припиненню росту водоростей в екосистемах один з актуальних - біотехнологічний.

Нині виділений ряд мікроорганізмів, що володіють альгіцидним ефектом. Бактерії – антагоністи можуть стати гарним джерелом для створення сучасних біологічних препаратів.

Серед мікроорганізмів, що продукують біологічно активні з'єднання різної направленості, особливе місце займають спороутворюючі грам-позитивні бактерії роду *Brevibacillus lsterosporus (BL)*. Зацікавленість цими бактеріями зумовлена відсутністю у них токсичності до теплокровних. [7]

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ</i>		
Змн.	Арк.	№ доцм.	Підпис	Дата			
Розроб.		Безкорвайна К.І.			Літ.	Арк.	Акцшів
Перевір.		Воронцов О.О.				1	10
Реценз.					<i>РОЗДІЛ 2</i>		
Н. Контр.					<i>Кафедра БТМ</i>		
Затверд.		Стабніков					

Порівняльна характеристика бактерій

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища		Тривалість культивування, год	Концентрація клітин, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація,				
<i>B. laterosporus</i> B-9844		5	96	8	Культивування проводять за температури 30° при обертанні мішалки 250 об/хв	Патент Российской Федерации № RU 2 382 075 С1 Штамм бактерій <i>Brevibacillus laterosporus</i> , подавляющий и предотвращающий развитие планктонных и биоплёночных форм микроскопических водоростей в водных системах/ Азизбеян Р.Р., Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М. Оpubл. 20.02.2010, Бюл. №5
	Дріжджовий екстракт	15				
	Гліцерин	11,				
	Лимонна кислота	7				
	Na ₂ SO ₄	4				
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,2				
	KCl	0,7				
	MgCl ₂ ×6H ₂ O	6				
	H ₂ O	0,4				
		2				
<i>B. laterosporus</i> ВКІПМ В-10531	Дріжджовий екстракт	5	48	7,4	Культивування проводять за температури 30° при обертанні мішалки 250 об/хв	Патент Российской Федерации № RU 2422511 С1 Штамм бактерій <i>Brevibacillus laterosporus</i> , продуцирующий широкий спектр биологически активных соединений/ Азизбеян Р.Р., Кузнецова Н.И., Кузин А.И.
	Сахароза	20				
	Лимонна кислота	11,				

	кислота	7				Опубл. 27.06.2011
	Na ₂ SO ₄	4				
	(NH ₄) ₂ H	4,2				
	PO ₄	0,7				
	KCl	6				
	MgCl ₂ ×6	0,4				
	H ₂ O	2				
<i>B. laterosporus</i> BKIM B-9405	Бакто - триптон	10	72	4,5	Культивування проводять за температури 30° при обертанні мішалки 250 об/хв	Патент Российской Федерации № RU 2323968 C1 Штамм бактерий <i>Brevibacillus laterosporus</i> , одавляющий и предотвращающий развитие микроскопических водорослей различных таксономических типов/ Азизбеян Р.Р., Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М., Николаенко М.А., Смирнова Т.А Опубл. 10.05.2008
	Дріжджовий екстракт	5				
	NaCl	10				

Продовження табл. 2.1

Вартість поживного середовища для культивування штамів

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>B. laterosporus B-9844</i>	Дріжджовий екстракт	5,0	700	3,5	https://www.systopt.com.ua
	Гліцерин	15	35,4	0,53	https://www.systopt.com.ua
	Лимонна кислота	11,7	51,6	0,60	https://www.systopt.com.ua
	Na ₂ SO ₄	4	90	0,36	https://prom.ua
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	90	0,45	https://prom.ua
	KCl	0,76	11,2	0,0085	https://prom.ua
	MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,42	16	0,0067	https://harkov.flagma.ua
Вартість 1 л середовища – 5,45 грн					

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>B. laterosporus</i> ВКПМ В-10531	Дріжджовий екстракт	5,0	700	3,5	https://prom.ua
	Сахароза	20,0	27	0,54	https://www.systopt.com.ua
	Лимонна кислота	11,7	51,6	0,60	https://prom.ua
	Na ₂ SO ₄	4	90	0,36	https://prom.ua
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	90	0,45	https://prom.ua
	KCl	0,76	11,2	0,0085	https://prom.ua
	MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,42	16	0,0067	https://harkov.flagma.ua
Вартість 1 л середовища – 5,01 грн					
<i>B. laterosporus</i> ВКПМ В-9405	Бакто -триптон	10	750	7,5	https://flagma.ua
	Дріжджовий екстракт	5	700	3,5	https://flagma.ua
	NaCl	10	5	0,05	https://prom.ua
Вартість 1 л середовища – 11,05 грн					

Продовження табл. 2.2

Умовна вартість 1г цільового продукту

Таблиця 2.3

Біологічний агент	Концентрація клітин, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість біомаси за год	Вартість 1л поживного середовища, грн	Умовна вартість 1г цільового продукту, г/л
<i>B. laterosporus</i> B-9844	8	96	0,08	5,45	0,68
<i>B. laterosporus</i> ВКПМ В-10531	7,4	48	0,15	5,01	0,67
<i>B. laterosporus</i> ВКПМ В-9405	4,5	72	0,06	11,05	2,45

За даними таблиці 2.3 ми визначили, що затрати на поживне середовище для культивування *B. laterosporus* ВКПМ В-10531 є достатньо малими. Відповідно вартість продукту буде меншою.

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

Морфолого – культуральні ознаки

Вегетативні клітини *Brevibacillus laterosporus* мають паличковидну форму з заокругленими кінцями (Рис.2.1), грампозитивні. На агаризованому середовищі штами утворюють плоскі, гладенькі колонії білого, бежевого кольору з ризоїдними краями (Рис.2.2). Розміром 2,4 x 1,2 мкм. Спори овальної форми завтовшки 1,2—2 x 0,7—1,2 мкм, розміщуються в середній роздутій частині клітини [8]. *B. laterosporus* раніше класифікували як *Bacillus laterosporus* є спороутворюючою бактерією, яка також може продемонструвати патогенність для комах. Спільно з *B. sphaericus* та *B. thuringiensis*, *B. laterosporus* утворює параспорульні тіла, які у цього виду можуть мати форму каное і служать для коливання спор [9].

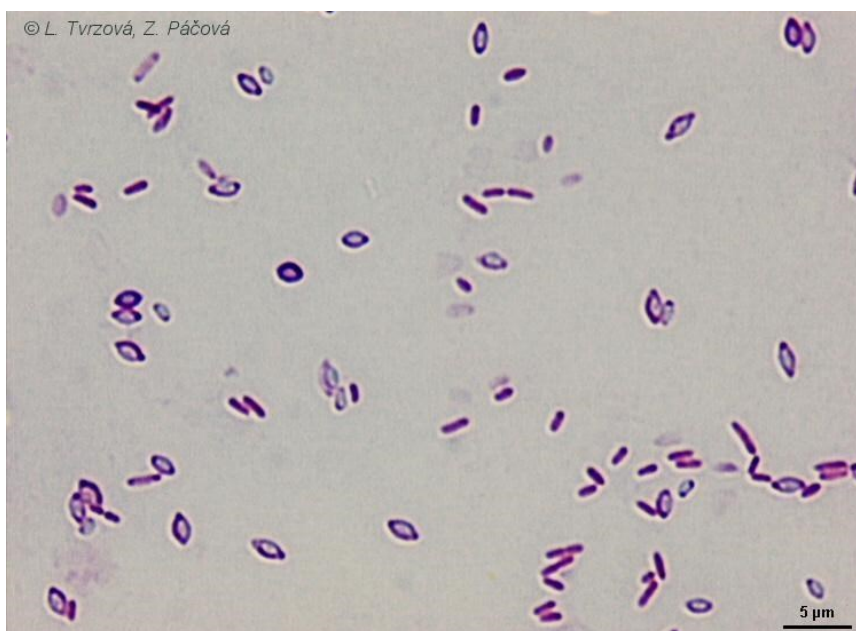


Рис.2.1 клітини *Brevibacillus laterosporus* [10]



Рис.2.2 Колонії *Brevibacillus laterosporus*[11]

На МПА утворює круглі складчасті колонії з фестончатим краєм пастоподібної консистенції, бежевого матового кольору.

На сусло – агарі утворює округлі складчасті колонії з рівним краєм, бежевого кольору, пастоподібної консистенції, а на картопляному агарі колонії світло – бежевого кольору, матові, ріст бактерій по штриху – ризоїдний, пастоподібної консистенції.[12]

Фізіолого – біохімічні ознаки

Brevibacillus laterosporus аеробна бактерія, що росте і розмножується за температури 20°- 40°C, рН 6,9 – 7,2, оптимальна температура 30°-37°C и рН 7,2.

B. laterosporus утворює каталазу. Гідролізує казеїн та желатину, не гідролізує крохмаль. Сечовину не розчепляє. Не зброджує сахарозу, арабінозу, ксилозу, лактозу. Зброджує глюкозу, мальтозу, фруктозу. Глюкозу зброджує без газу. Не утворює ацетоїну. Утворює лецитиназу та твін – естеразу. Росте за присутності лізоциму.[13]

Список речовин, які можуть *розищеплюватися* штамми *B. laterosporus*, постійно зростає. Репрезентативними прикладами є біодеградація полівінілового спирту до ацетату, знебарвлення різних текстильних азобарвників шляхом виробництва різноманітних ферментів, включаючи пероксидазу лігніну, *N*-деметилазу амінопіріну, NADH-DCIP редуктазу та малахіт-зелену редуктазу, біодеградація толуолу та фенолу, біосорбція токсичних металів з водних розчинів та детоксикація металів у системах стічних вод.[14]

Більшість відомих алгіцидних бактерій належать або до типу *Bacteroidetes*, або до гаммапротеобактерій (таких як *Alteromonas*, *Pseudomonas* та *Pseudoaltermonas*), але також повідомляється про алгіцидні альфапротеобактерії. Лише меншість є грампозитивними, такі як представники роду *Actinobacteria* та роду *Bacillus* (*Firmicutes*).[15]

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Brevibacillus laterosporus* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій.[16]

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacili*

Родина: *Paenibacillaceae*

Рід: *Brevibacillus*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Альгіцид - хімічний агент, призначений для знищення водоростей у воді басейну. Альгіциди можуть бути на основі QAC (четвертинних амонієвих сполук) або на основі полімерних сполук міді. Перші є ПАР і можуть викликати спінювання води, а другі зазвичай додають у басейн у некупальний сезон. До недавнього часу як альгіцид також використовувався сульфат міді, проте він токсичний і може викликати подразнення шкіри та знебарвлення волосся [17].

В Україні нараховують близько 400 тис. басейнів які потребують знезараження води. Знезараження відбувається переважно додаванням альгіцидного препарату [18].

Основні виробники препаратів, що містять біотехнологічне застосування знаходяться в Германії, Китаї, Італії. Це Barchemicals (Італія), Chemoform, Dinotec (Германія), Aquadoctor (Китай), Microzyme (США) [19-22].

Препарат Понд Трит (США) – рідкий концентрат, що використовують для очищення води від різних видів водоростей. Препарат має вигляд рідкого концентрату з титром клітин - 13,5 млрд КУО/мл. При використанні препарату містяться бактерії, які очищають воду від мутності та роблять її прозорою. Препарат має вигляд рідкого концентрату з титром клітин - 13,5 млрд КУО/мл.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3</i>		
<i>Розроб.</i>	<i>Безкорвайна К.І.</i>						
<i>Перевір.</i>	<i>Воронцов О.О.</i>						
<i>Реценз.</i>							
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков</i>						
					<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акцшів</i>
						1	4
					<i>Кафедра БТМ</i>		

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Розраховуємо кількість альгіцидного препарату, яку необхідно виробити в рік для усунення водоростей в басейнах. Доза препарату становить – 1:200. Застосовується 1 раз на місяць. В середньому об'єм басейну 348 м³. Отже, $1,74 \text{ м}^3 \times 12 = 20,8 \text{ м}^3$ потрібно в рік.

Розраховуємо 50% від потреби у зв'язку з конкуренцією, тоді:

$$20,8 \times 0,5 = 10,4 \text{ м}^3$$

За статистикою відомо, що щороку в Україні альгіцидні препарати купують 400 тис. людей. Отже, зробимо розрахунок потреби даного препарату в Україні на рік:

$$400 \text{ тис.} \times 10,4 \text{ м}^3 = 4,16 \text{ тис м}^3/\text{рік.}$$

Враховуючи, що виробництво біопрепарату в Україні майже відсутнє, а імпортується із за кордону, то ми хочемо забезпечити 20% від річних потреб в препараті на ринку, для цього нам потрібно отримати: $4,16 \text{ тис} \times 0,2 = 832 \text{ м}^3$ препарату.

Розрахунок потужності виробництва для культивування *Brevibacillus laterosporus*, щоб отримати 832 м³ препарату.

Оскільки маса клітини $3,7 * 10^{-13} \text{ г}$ [23], а титр клітин у культуральній рідині 2 млрд КУО/мл, то вихід біомаси (концентрація клітин у культуральній рідині) становить 7,4 мг/мл. Якщо потреба препарату в Україні 832 м³/рік, то розрахуємо об'єм культуральної рідини за рік:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 832 * 7,4 = 6\,156,8 \text{ м}^3$$

Окрім цього, нам необхідно врахувати втрати, які можуть виникнути в процесі виробництва. З урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{кр}}^{\text{річ}} = 6\,156,8 * 1,2 = 7\,388,16 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера

1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 330.

Ефективний фонд робочого часу $N_{ef} = 330 \times 24 = 7\,920$ год.

1. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{др} = 48 + 13 = 61 \text{ (год), де}$$

$T_{ф}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{др}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (4 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{ц} = N_{ef} / T_{цф} = 7\,920 / 61 = 129.8 = 130$$

4. Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{кр}^{ц} = V_{кр}^{річ} / n_{ц} = 7\,388 / 130 = 56,8 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом 100 м^3 з коефіцієнтом заповнення $K_z = 0,6$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для вирощування альгіцидного препарату використовують ферментери загальним об'ємом 100 м^3 . Коефіцієнт заповнення $K_{зап.} = 0,6$.

Отже, робочий об'єм ферментера:

$$V_{роб.} = V_{заг.} \times K_{зап.} = 100 \times 0,6 = 60 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 60 м^3 культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 60 \cdot 0,1 = 6 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування

бактерій в посівному апараті (інокуляторі) об'ємом 10 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для засіву посівного апарату (одержання 6 м^3 культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 6 \cdot 0,1 = 0,6 \text{ м}^3 \text{ (600 л) посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом 1000 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

600 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 600 \cdot 0,1 = 60 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для одержання 60 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.4}} = 60 \cdot 0,1 = 6 \text{ л посівного матеріалу}$$

Приготування такої кількості інокуляту здійснюють в інокуляторі об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

$$V_{\text{роб.5}} = 6 \cdot 0,1 = 0,6 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу альгіцидного препарату ферментері об'ємом 100 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в п'ять етапів.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування умов і способу культивування біологічного агента та підготовки поживного середовища

4.1.1. Вибір умов і способу культивування

Культивування мікроорганізмів, забезпечується складом поживного середовища, хімічними та фізичними факторами (температура, кислотність, аерація і т.д.). При цьому кількісні показники кожного з них неоднакові і визначаються особливостями метаболізму кожної групи бактерій.

Можна виділити методи культивування на твердих та в рідких середовищах; в аеробних, анаеробних чи мікроаерофільних умовах. Характеристики цього процесу встановлюють шляхом визначення таких показників як кількість клітин або їх біомаса.[24]

B. laterosporus ВКПМ В-10531 є аеробним штамом, оптимальна температура культивування якого 30° С, а оптимальне значення рН – нейтральне. Нажаль, за даних вимог можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому необхідно забезпечити асептичні умови. Це досягається стерилізацією комунікацій та обладнання, поживного середовища, аераційного повітря, піногасників. Для запобігання контамінації в ферментері подачею стерильного аераційного повітря створюється надлишковий тиск.[25]

Враховуючи наведені вище дані, культивування *B. laterosporus* ВКПМ В-10531 проводиться глибинним способом. В даному випадку мікроорганізм використовує розчинний у середовищі кисень. У зв'язку з низькою розчинністю кисню, для забезпечення росту аеробних бактерій в товщі середовища, потрібна постійна аерація. [24,25]

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата				
Розроб.		Безкорвайна К.І.			РОЗДІЛ 4	Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Воронцов О.О.					1	13
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков						

Примусову аерацію в ферментаторах поєднують із перемішуванням середовища за допомогою мішалок, які обертаються із частотою від десятків до тисяч обертів за хвилину. Це забезпечує максимальний контакт клітин із киснем повітря, із поживними речовинами, різко збільшується поверхність стикання клітин і дозволяє підтримувати максимальну швидкість утворення виводу і метаболітів із клітин.

Глибинний метод широко використовується для отримання біомаси мікроорганізмів (пресовані хлібопекарські дріжджі, кормових дріжджів) і різних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів (органічні кислоти, ферменти, антибіотики, амінокислот).[26]

Цей метод полягає у вирощуванні мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі. Технічно він більш досконалий, ніж поверхневий, оскільки легко піддається механізації та автоматизації. Крім цього, усі клітини культури знаходяться в однакових, легко відтворюваних умовах. В результаті вони рівномірно забезпечуються, поживними речовинами і киснем. Глибинне культивування дає можливість чітко дозувати вміст у поживному середовищі різних компонентів.

Весь процес культивування має проводитися в належних асептичних умовах.[27]

Глибинне культивування поділяється на періодичне та безперервне. Під періодичним та безперервним способом виробництва мається на увазі, насамперед, спосіб загрузки та вигрузки основного потоку середовища в ході ферментації. В чисто періодичному процесі загрузка поживного середовища та вигрузка готового продукту виробляються одноразово з безперервною або імпульсною подачею різних добавок, що підтримують рН середовище на потрібному рівні. При безперервному культивуванні загрузка поживного середовища та вигрузка продукту сумісні в часі.[28]

Культивування проводили за температури 30°C протягом 96 години з частотою обертання мішалки 250 об/хв.[29]

Так як об'єм культуральної рідини достатньо невеликий більш зручний спосіб культивування – періодичний.

4.1.2 Вибір типу ферментера

Біореактори (ферментери) – це обладнання для вирощування біологічних культур в контрольованих стабільних умовах. В апаратах створюється оптимальне поживне середовище для розмноження клітин та життєдіяльності мікроорганізмів. В пристроях здійснюється подача поживного середовища, насичення його киснем та відведення продуктів метаболізму.

В установах різного профілю ферментери використовують для аналітичних, досліджуваних, випробувальних, виробничих цілях.

В промисловості вони застосовуються в процесі утворення вакцин та сироваток, виробництва медичних препаратів, біологічно активних добавок, білків, полісахаридів, сиропів, пестицидів та ін. В лабораторних умовах ферментери використовують для виділення клітин з сировини звіриноного походження, культивування бактерій, дріжджів, контролю якості харчових продуктів.[30]

Розрізняють механічні, аерліфтні та газо-вихрові біореактори, а також аеробні (з подачею повітря або газових сумішей з киснем), анаеробні (безподачі кисню) та комбіновані аеробно-анаеробні.

Звичайний ферментер являє собою закритий циліндр, в якому механічно перемішується поживне середовище разом з мікроорганізмами. Через нього прокачують повітря, іноді насичене киснем. Температура регулюється з допомогою води або пари, пропускається по трубкам теплообмінника. Конструкція ферментера повинна дозволяти регулювати умови росту: постійну температуру, рН (кислотність або лужність) і концентрацію розчинного в середовищі кисню.[31]

Для кожного процесу ферментації розроблені різні конструкції ферментерів:

1. З підведенням енергії до газової фази:
 - барботражні;
 - апарати з дифузором;
 - трубчасті;
 - з форсунковим розподільником;
 - колонного типу;
2. З підведенням енергії до рідкої фази:
 - з самовсмоктуючою турбіною;
 - з турбоежекторними перемішувачами;
3. З комбінованим підведенням енергії:
 - з механічним перемішуванням;
 - з пневматичним перемішуванням;
 - з циркуляційним перемішуванням;[32]

Від умов культивування біологічного агента залежить вибір оснащення для ферментера.

У процесі культивування *B. laterosporus* ВКІМ В-10531 створюються аеробні умови, тому ферментер має бути оснащений барботером для подачі кисню, датчики pO_2 , для контролю аеробних умов, газоаналізатор, для контролю концентрації CO_2 .

Для кращої розчинності кисню, підвищенню аерації та гомогенізації культуральної рідини ферментер має бути оснащений мішалкою. Перемішування та аерацію посилюватимемо пневматичною мішалкою. Аерація посилюється з допомогою обертових дисків з отворами або придонних пропелерів. [33]

Для забезпечення сталої температури ферментер оснащується сорочкою та датчиками температури, а для контролю рівня рН культуральної рідини встановлюється датчик рН.

Культивування мікроорганізму для одержання бактеріальних добрив, засобів захисту рослин відбувається у виробничому ферментері об'ємом від 1 до 5 м³.

Ферментер з потрібним нам оснащенням може бути запропонований компанією «BioTechno Group». Дана компанія здійснює проектування та виробництво обладнання для біотехнологічних, фармацевтичних, хімічних та харчових виробництв, для любых стерильних та гігієнічних застосувань, в тому числі для чистих приміщень. Промислові ферментери компанії БІОТЕХНО передбачені для проведення культивування бактеріальних, дріжджових та грибних культур. Ферментери виготовляють за індивідуальних вимог замовника. [34]

4.1.3. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки *Brevibacillus laterosporus* є аеробом ефективного забезпечення мікроорганізмів розчиненим киснем є необхідним елементом процесу культивування [35].

Забір атмосферного повітря

Кількість мікроорганізмів в повітрі постійно змінюється вона залежить від пори року, часу доби, погоди, місцевості, тому оптимальний забір повітря здійснюється на висоті 20 – 30 м, де кількість часток відносно стабільна та найменша.

Забір повітря відбувається через повітрозбірник, який розташовується у зоні чистого повітря, віддаленої від зон технологічних шкідливих викидів або викидів систем витяжної вентиляції. Вхід повітря розміщується на висоті не менше 30 м від землі і закривається залізними ґратами. Повітря через повітрозабірну шахту під дією вентилятора потрапляє до фільтру грубого очищення [36].

Грубе очищення повітря

Фільтри попереднього очищення не тільки захищають компресори від забруднень, але й істотно знижують кількість контамінантів, які могли б потрапити на наступний ступінь очищення.

Попереднє грубе фільтрування повітря відбувається за допомогою використання набивних фільтрів, що складаються з волокнистих матеріалів. Фільтрування відбувається за рахунок того, що частинки рухаючись з певною швидкістю затримуються на поверхні волокна інерційним механізмом осадження.

Стабілізація термодинамічних показників повітря

Для стабілізації термодинамічних показників, повітря, після стадії фільтрування, стискається у компресорі так, що його температура підвищується з 15 – 25 °С на вході до 250 °С на виході з неї, а далі подається в теплообмінник і охолоджується. Охолоджена вода, що подається в теплообмінник, є оборотною.

Для стабілізації потоку повітря і попередження його пульсацій потрібно мати ланцюг часової затримки цю роль може виконувати ресивер. В ньому відбувається вирівнювання тиску в системі і забезпечення рівномірної подачі повітря в фільтр [37].

Попередня очистка повітря в головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від пилу та мікроорганізмів (розмір частинок більше 1 мкм) здійснюється в головному фільтрі. Головний фільтр представляє собою циліндричну ємність із сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщують фільтруючий матеріал. Заміну фільтрувальвіного матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну [36].

Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

Видалення контамінантів (розмір частинок більше 0,2 мкм) за допомогою мембрани засновано на ситовому ефекті. В якості індивідуального фільтруючого матеріалу використовується скловата типу ЦФД з діаметром волокна 2,5 – 3 мкм та діаметром пор 0,2 мкм. Пористість мембран досягає 80 %. Термостійкість скловати становить 400 °С. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$ [38].

4.1.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Для забезпечення безпеки життєдіяльності людини і тварини та запобіганню небажаних наслідків до дезінфікуючих засобів висувається ряд вимог:

- *Широкий спектр антимікробної дії.* Дезінфекційні засоби, наскільки це можливо, мають бути ефективними проти всіх мікроорганізмів. Антимікробна дія препаратів у певних межах не повинна зменшуватися при низьких температурах та змінах рН.
- *Агресивність.* Деззасобу бажано мати мінімальний показник корозійної активності, чи агресивності до інших матеріалів.
- *Не мати різкого запаху.*
- *Розчинність.* Деззасоби повинні легко розчинятись у воді або ж утворювати стійкі емульсії.
- *Безпека для людей і тварин.*
- *Стійкість.* Бути стійкими при зберіганні, використанні, придатними до транспортування.
- *Швидкий розпад у навколишньому середовищі до нешкідливих речовин.*
- *Активність* - не повинна знижуватися у присутності «твердої» води й органічних речовин.
- *Ціна й доступність.*
- *Не фарбувати та не забруднювати об'єкт дезінфекції.*

4.1.4.1 Класифікація миючих засобів за агрегатним станом:

1. *Порошкоподібні.* В основному їх використовують для очищення кахлю, емалі та інших поверхонь, яким не шкодить тертя.
2. *Пастоподібні.*
3. *Тверді миючі засоби.*
4. *Рідкі миючі засоби.* Найчастіше застосовуються на великих виробничих підприємствах. Ці концентрати дозволяють відмити забруднення будь-якої складності і гарантують при цьому відсутність пошкоджень на поверхні.

Якщо у Вас жирове або білкове забруднення (наприклад, масло, жир, нагар або кіптява), найбільш ефективними будуть лужні концентрати, рівень рН яких коливається від 8 до 14. До складу засобів цього виду входять поверхнево-активні речовини, луг, комплексоутворювачі, антикорозійні інгредієнти та ін. Концентрати з невисоким вмістом лугу використовуються для видалення так званих «легких» масляних і жирових плям. Від більш складних плям позбуваються за допомогою середньолужних складів. Найбільш агресивними для слизової оболонки і шкіри рук є сильнолужні засоби, до того ж вони і більш корозійні, але, в той же час, найбільш ефективні. При роботі з такими реагентами в обов'язковому порядку треба використовувати засоби індивідуального захисту: гумові рукавички, респіратор, окуляри. При додаванні до складу мийного засобу хлору, можна прибрати не тільки забруднення від жиру, але і розіновго виду бактерії, а також протеїнові відкладення, які сприяють небажаному проступанню блакитного або веселково-глянцевого кольору на поверхні.

З забрудненнями різного походження краще за все впораються нейтральні концентрати. Утримуючи в собі ПАР, комплексоутворювачі та інші компоненти, вони відмінно допомагають впоратися з забрудненнями на різних поверхнях, а саме: металевих, пластикових, дерев'яних, скляних,

фарфорових і ін. Нейтральний концентрат – це найбільш безпечний і високоякісний вид миючого засобу. [39]

ProGreen ДЕЗ-8 є висококонцентрованим одноступінчастим дезінфікуючим (миючим) засобом для твердих поверхонь. При використанні відповідно до інструкції ефективно знищуються бактерії, грибки та віруси.

Засіб дезінфікуючий з мийним ефектом PROGREEN DEZ-8 (діючі речовини: дидецилдиметиламонію хлорид 48 %, алкілдиметилбензиламоній хлорид 32%)

Концентрат є прозорою рідиною з жовтуватим відтінком і слабким запахом. Випускається у концентрованому вигляді, об'ємом від 0,1 літра до бочки ємністю 200 літрів. За бажанням замовника концентрат може бути розфасований у тару по 3, 5, 10 тощо. літрів. Термін зберігання ПРОГРІН ДЕЗ-8 – 5 років з дати виготовлення, у відкритому вигляді придатний протягом місяця.[40]

4.1.4.2 Дезінфікуючі засоби.

Дезінфекційний засіб "ДЕЗОлайт" з мийними властивостями (Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин: діючими речовинами засобу є комплекс четвертинних амонійних сполук – $13,0\pm 2\%$ в т.ч. алкілдиметилбензиламоній хлорид – $6,0-7,0\%$, дидецилдиметиламоній хлорид – $7,0\pm 8\%$; лютензол (неіонногенна ПАВ) – $3,0\pm 0,5\%$; функціональні домішки (етилендіамінтетраацетату – $3,0\pm 0,5\%$; натрій метасилікату 5-водного – $0,3\%$; запашка - $0,2\%$), вода – до 100%). Норма витрат готового розчину становить 100 мл/м^2 . Робочий розчин з концентрацією 0.5% на 10 л готують так: у промаркований скляний, емальований, пластмасовий посуд додають 50 мл засобу та 9950 мл теплої води. Готовий розчин зберігає свою активність протягом 28 діб.[41]

Дезинфікуючий засіб із мийним ефектом «Dezaldum 20» (діючі речовини: 16,5–19,75% алкілдиметилбензиламоній хлорид; 10,5–11,5% глутаровий альдегід). Норма витрат готового розчину становить 100 мл на 1 кв.м (згідно з методичними рекомендаціями щодо застосування дезінфікуючого засобу з мийним ефектом DEZALDUM 20). Робочий розчин з концентрацією 0.5% на 10 л готують так: у емальовані, скляні або пластмасові ємності додають 50 мл засобу та 9950 мл води кімнатної температури. Час знезараження становить 5 хвилин. Робочий розчин зберігається протягом 2 тижнів. [42]

Засіб дезінфекційний «Вернедор-Оксі» (діючі речовини: перекис водню – 12,5%, суміш четвертинних амонійних сполук (ЧАС) – 4,0%). Засіб має антимікробну активність відносно грамнегативних і грампозитивних бактерій (включаючи мікобактерії туберкульозу, збудників внутрішньолікарняних і анаеробних інфекцій), вірусів (всіх відомих патогенних вірусів людини, в т. Ч. Вірусів ентеральних і парентеральних гепатитів [А, В і С], ВІЛ, поліомієліту, аденовірусів, вірусів атипової пневмонії [SARS], пташиного грипу H5N1, свинячий грип, грип людини, герпесу і т.д.), патогенних грибів роду кандиди, трихофітон, цвілевих грибів. Можливість багаторазового використання робочих розчинів - до 39 діб (вручну). Використання коротких експозицій за різними режимами обробки. Економічність робочих розчинів - 15 мл / м². [43]

4.1.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для культивування термотолерантного аеробного мікроорганізму *Brevibacillus laterosporus* обрано періодичне глибинне культивування за таких умов: температура – 30±1 °С, інтенсивність аерації 1 л/л·хв, інтенсивність перемішування – 250 об/хв, корекцію рівня рН проводять при необхідності, після стерилізації до рН 6,8-7,0 6%-м розчином

HCl [44].

Розраховано, що для культивування продуцента у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 процес одержання посівного матеріалу буде проходити в чотири етапи.

Для вирощування *Brevibacillus laterosporus* обрано поживне середовище, яке наведено у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Компоненти ПС	Концентрація, г/л
Дріжджовий екстракт	0,5
Цукроза	12,0
Лимона кислота	1,17
Na ₂ SO ₄	0,4
діамонійфосфат (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42
KCl	0,0076
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,042

Для приготування його необхідно розділити на такі композиції (залежно від режиму стерилізації та можливого взаємного впливу певних компонентів):

Композиція I: дріжджовий екстракт, цукроза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II: лимонна кислота, сульфат натрію (Na₂SO₄), діамонійфосфат ((NH₄)₂HPO₄), хлорид калію (KCl) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв)

Композиція III: хлорид магнію (MgCl₂·6H₂O) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв)

Стерилізація середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах, відбувається в автоклаві, а для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу – відповідно у самих апаратах.

Вирощування інокуляту в колбах на качалці

Композиція I: дріжджовий екстракт, цукроза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II: лимонна кислота, сульфат натрію (Na_2SO_4), діамонійфосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), хлорид калію (KCl), (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Композиція III: хлорид магнію ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв.).

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 6 л

Композиція I: дріжджовий екстракт, цукроза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II: лимонна кислота, сульфат натрію (Na_2SO_4), діамонійфосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), хлорид калію (KCl), хлорид магнію ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв., рН – 4,5).

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 60 л

Композиція I: дріжджовий екстракт, цукроза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II: лимонна кислота, сульфат натрію (Na_2SO_4), діамонійфосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), хлорид калію (KCl), хлорид магнію ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв., рН – 4,5).

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 600 л

Композиція I: дріжджовий екстракт, цукроза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II: лимонна кислота, сульфат натрію (Na_2SO_4), діамонійфосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), хлорид калію (KCl), хлорид магнію ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв., рН – 4,5).

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 6000 л

Композиція I: дріжджовий екстракт, цукроза (режим стерилізації:

112°C, 30 хв).

Композиція II: лимонна кислота, сульфат натрію (Na_2SO_4), діамонійфосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), хлорид калію (KCl), хлорид магнію ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв., рН – 4,5).

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 60 000 л

Композиція I: дріжджовий екстракт, цукроза (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

Композиція II: лимонна кислота, сульфат натрію (Na_2SO_4), діамонійфосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), хлорид калію (KCl), хлорид магнію ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (режим стерилізації: 131°C, 40 хв., рН – 4,5).

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

На основі проведених розрахунків підбираємо обладнання, характеристику яких наводимо у вигляді таблиці 5.1 [45-47].

Таблиця 5.1

Обладнання для отримання альгіцидного препарату

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-5	Повітрозабірник	1	Обладнання металеву сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-6	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – базальтове волокно, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E = 80 %
ПА-18	Посівний апарат	1	Оснащений паровою сорочкою, пробовідбірником, барботером та трубою перетискування. Матеріал нержавіюча сталь. Об'ємом 60 л

<i>НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ</i>				
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата
Розроб.		Безкорвайна К.І.		
Перевір.		Воронцов О.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков		

РОЗДІЛ 5

<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрцшів</i>					
		1	2				
<i>Кафедра БТМ</i>							

Н-22	Насос	1	<p>Pump-200</p> <p>Виробник: Альфа-Лаваль, Данія</p> <p>Потужність 25 м³/год.</p> <p>Тип - відцентровий</p>
Фр-26	Ферментер	1	<p>Ферментер лінії LiFlus SP компанії «Biotron» (Південна Корея), об'єм 6,3 м³.</p>
Н-27, Н-28	Відцентров ий насос	2	<p>Насос відцентровий фірми SPRUT (Україна)</p>
	Компресор	1	<p>Гвинтовий електричний компресор Sessato CSL 10/8-200, робочий тиск 0,8 МПа</p>
	Теплообмін ник-охолоджувач	1	
	Теплообмін ник нагрівач	1	
	Ресивер	1	<p>Поверхня виготовлена з нержавіючих марок сталі, може бути шліфована або полірована, має зовнішнє антикорозійне покриття</p>
	Фільтри індивідуальної очистки	1	<p>Ступінь очищення, E= 99,9995%</p>

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3 Підготовка технологічного обладнання

ДР 2 Підготовка аераційного повітря

ДР 3. Підготовка титрувальних розчинів

ДР 3.1 Підготовка розчину 6% HCl

ДР 3.2 Підготовка та стерилізація розчину 6% NaOH

ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація розчину 6% NaOH для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6 л

ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація розчину 6% NaOH для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 л

ДР 3.2.3 Приготування та стерилізація розчину 6% NaOH для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 600 л

ДР 3.2.4 Приготування та стерилізація розчину 6% NaOH для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 6000 л

ДР 3.2.5 Приготування та стерилізація розчину 6% NaOH для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 60 м³

ДР 4. Підготовка поживних середовищ

ДР 4.1 Підготовка поживного середовища для вирощування в колбах на качалці

Вміст компонентів для приготування 0,6 л середовища наведено в табл. 6.1.

					НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата				
Розроб.		Безкоровайна К.І.			РОЗДІЛ 6	Літ.	Арк.	Акрцшів
Перевір.		Воронцов О.О.					1	13
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков						

Таблиця 6.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	0,5	0,3	I	0,15
Цукроза	12,0	7,2		
Вода		142,5 мл		
Лимона кислота	1,17	0,702	II	0,3
Na ₂ SO ₄	0,4	0,24		
діамонійфосфат (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42	0,252		
KCl	0,0076	0,00456		
Вода		298,8 мл		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,042	0,0252	III	0,15
Вода		149,9 мл		
Усього				0,6

ДР 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції I

Для приготування і стерилізації композиції I на технічних вагах зважують 0,3 г дріжджового екстрату та 7,2 г цукрози. Наважки поміщають у колбу об'ємом 200 мл, доливають 142,5 мл питної води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції II

Для приготування і стерилізації композиції II на технічних вагах зважують 0,702 г лимонної кислоти, 0,24 г Na₂SO₄, 0,252 г діамонійфосфату, 0,00456 г KCl. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500

мл, доливають 298,8 мл питної води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції III

Для приготування і стерилізації композиції III на технічних вагах зважують 0,0252 г хлорид магнію. Наважки поміщають у колбу об'ємом 200 мл, доливають 149,9 мл питної води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.1.5 Змішування композицій I,II,III

В колбу де міститься композиція II (Від ДР 4.1.2) асептично додають композиції I (Від ДР 4.1.1) та II (Від ДР 4.1.3). Ретельно перемішують. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.2 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 10 л. Враховуємо 600 мл від ДР 4.1

Вміст компонентів для отримання 6 л поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в 10 л інокуляторі

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	0,5	3	I	2
Цукроза	12,0	72		
Вода		1,925 л		
Лимона кислота	1,17	7,02	II	4
Na ₂ SO ₄	0,4	2,4		

діамонійфосфат (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42	2,52		
KCl	0,0076	0,0456		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,042	0,252		
Вода		3,58 л		
Конденсат		0,4 л		
Усього				6

ДР 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції I

У відтарований на технічних стаканчик вносять 3 г дріжджового екстракту та 72 г цукрози, переносять у колбу на 2 л та додають 1,9 л питної води, перемішують. Стерилізація в автоклаві при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв, 0,05 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 7,2 г лимонної кислоти, 2,4 г Na₂SO₄, 2,52 г (NH₄)₂HPO₄, 0,0456 г KCl та 0,252 г MgCl₂·6H₂O. Наважки переносять у реактор – змішувач об'ємом 5 л, додають 4 л води питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації). До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин HCl (від ДР 3.1) до рН 4,5. вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований інокулятор. Стерилізація при температурі 131°C, 40 хв, 0,15 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.3 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 100 л. Враховуємо 6 л від ДР 4.2

Вміст компонентів для отримання 60 л поживного середовища аналогічного складу наведено в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в 100 л інокуляторі

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	0,5	30	I	20
Цукроза	12,0	720		
Вода		17,25 л		
Конденсат		2 л		
Лимона кислота	1,17	70,2	II	40
Na ₂ SO ₄	0,4	24		
діамонійфосфат (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42	25,2		
KCl	0,0076	0,456		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,042	2,52		
Вода		35,8 л		
Конденсат		4 л		
Усього				60

ДР 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції I

На технічних терезах зважуємо 30 г дріжджового екстракту та 720 г цукрози. Наважки переносять у реактор – змішувач об'ємом 20 л, додають 17,25 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізація при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв, 0,05МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 70,2 г лимонної кислоти, 24 г Na₂SO₄, 25,2 г (NH₄)₂HPO₄, 0,456 г KCl та 2,52 г MgCl₂·6H₂O. Наважки переносять

у реактор – змішувач об’ємом 40 л, додають 35,8 л води питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації). До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин HCl (від ДР 3.1) до рН 4,5. вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований інокулятор. Стерилізація при температурі 131°C, 40 хв, 0,15 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР. 4.4 Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об’ємом 1 м³. Враховуємо 60 л від ДР 4.3

Вміст компонентів для приготування 600 л середовища наведено в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 л середовища, г	Композиція	Об’єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	0,5	300	I	200
Цукроза	12,0	7200		
Вода		172,5 л		
Конденсат		20 л		
Лимона кислота	1,17	702	II	400
Na ₂ SO ₄	0,4	240		
діамонійфосфат (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42	252		

КСІ	0,0076	4,56		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,042	25,2		
Вода		358 л		
Конденсат		40 л		
Усього				600

ДР 4.4.1 Приготування і стерилізація композиції I

На технічних терезах зважуємо 300 г дріжджового екстракту та 7200 г цукрози. Наважки переносять у реактор – змішувач об’ємом 200 л, додають 172,5 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів. Стерилізація при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв, 0,05МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 702 г лимонної кислоти, 240 г Na₂SO₄, 252 г (NH₄)₂HPO₄, 4,56 г КСІ та 25,2 г MgCl₂·6H₂O. Наважки переносять у реактор – змішувач об’ємом 400 л, додають 358 л води питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації). До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин НСІ (від ДР 3.1) до рН 4,5. Вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований інокулятор. Стерилізація при температурі 131°C, 40 хв, 0,15 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти [16].

ДР 4.5 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у ферментері об’ємом 10 м³. Враховуємо 600 л від ДР 4.4

Вміст компонентів для приготування 6 м³ середовища наведено в табл. 6.5.

Таблиця 6.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері 10 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6000 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	0,5	3000	I	2000
Цукроза	12,0	72000		
Вода		1725 л		
Конденсат		200 л		
Лимона кислота	1,17	7020	II	4000
Na ₂ SO ₄	0,4	2400		
діамонійфосфат (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42	2520		
KCl	0,0076	45,6		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,042	252		
Вода		3580 л		
Конденсат		400 л		
Усього				6000

ДР 4.5.1 Приготування і стерилізація композиції I

На технічних терезах зважуємо 3000 г дріжджового екстракту та 72000 г цукрози. Наважки переносять у реактор – змішувач об'ємом 2000 л, додають 1725 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізація при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв, 0,05 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.[48]

ДР 4.5.2 Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 7020 г лимонної кислоти, 2400 г Na₂SO₄, 2520 г (NH₄)₂HPO₄, 45,6 г KCl та 252 г MgCl₂·6H₂O. Наважки переносять у реактор – змішувач об'ємом 4000 л, додають 3580 л води

питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації). До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин HCl (від ДР 3.1) до рН 4,5. Вмикають перемішувач до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований інокулятор. Стерилізація при температурі 131°C, 40 хв, 0,15 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 4.6 Підготовка поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 100 м³. Враховуємо 6000 л від ДР 4.5

Вміст компонентів для приготування 60 м³ середовища наведено в табл. 6.6.

Таблиця 6.6

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у ферментері 100 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60000 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Дріжджовий екстракт	0,5	30000	I	20000
Цукроза	12,0	720000		
Вода		17250 л		
Конденсат		2000 л		
Лимона кислота	1,17	70200	II	40000
Na ₂ SO ₄	0,4	24000		
діамонійфосфат (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42	25200		
KCl	0,0076	456		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,042	2520		
Вода		35800 л		
Конденсат		4000 л		
Усього				60000

ДР 4.6.1 Приготування і стерилізація композиції I

На технічних терезах зважуємо 30 кг дріжджового екстракту та 720 кг цукрози. Наважки переносять у реактор – змішувач об'ємом 20000 л, додають 17250 л питної води (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Стерилізація при $t = 112^{\circ}\text{C}$, 30 хв, 0,05 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.[49]

ДР 4.6.2 Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 70200 г лимонної кислоти, 24000 г Na_2SO_4 , 25200 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 456 г KCl та 2520 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять у реактор – змішувач об'ємом 40000 л, додають 35800 л води питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації). До отриманого розчину при перемішуванні додають 6 %-й розчин HCl (від ДР 3.1) до рН 4,5. Вмикають перемішуючий пристрій до повного розчинення компонентів. Отриманий розчин перекачують насосом у попередньо простерилізований інокулятор. Стерилізація при температурі 131°C , 40 хв, 0,15 МПа. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП.5.1 Підтримання колекційної культури

Ліофілізовану культуру *B. laterosporus* зберігають при температурі 0 - $+4^{\circ}\text{C}$. Термін зберігання 6 місяців.

ТП 5.2 Одержання робочої культури

Ліофілізовану культуру відразу переводять до суспензії після відкриття ампули, додаючи до неї 1,0 мл фізіологічного розчину. Після ретельного перемішування відбирають 0,2 мл суспензії та методом виснажувального штриха пересівають на тверде агаризоване середовище (МПА) у чашки Петрі. Культивують у термостаті при $t = 30^{\circ}\text{C}$, 24 год.

Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.3 Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізолювані колонії з чашки Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). Культивують в термостаті при $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24 год). Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалці

Поживне середовище (Від ДР 4.1.4) розливають по 150 мл ($K_3 = 0,2$) у колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *B. laterosporus* (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (250 об/хв) при $t = 30^{\circ}\text{C}$ (48 год). Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 10 л перекачують поживне середовище (Від ДР 4.2). Охолоджують, вмикають перемішуючий пристрій і доводять стерильним 6%-м розчином NaOH (від ДР 3.2.1) рН до 7,0. Через засівну колбу вносять 6 л посівного матеріалу (Від ТП 5.4). Культивують до концентрації біомаси 7,4 г/л при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 250 об/хв і постійною аерацією впродовж 48 год. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 100 л перекачують поживне середовище (Від ДР 4.3). Охолоджують, вмикають перемішувачий пристрій і доводять стерильним 6%-м розчином NaOH (від ДР 3.2) рН до 7,0. Через засівну колбу вносять 6 л посівного матеріалу (Від ТП 5.5). Культивують до концентрації біомаси 7,4 г/л при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішувачого пристрою 250 об/хв і постійною аерацією впродовж 48 год. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.7 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 1 м³ перекачують поживне середовище (Від ДР 4.4). Вмикають перемішувачий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 3.2) рН до 7,0. Через трубу перетискування передають з інокулятора інокулят від ТП 5.6. Культивують до концентрації біомаси 7,4 г/л при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішувачого пристрою 250 об/хв і постійною аерацією впродовж 48 год. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 5.8 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 м³

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 10 м³ перекачують поживне середовище (Від ДР 4.5). Вмикають перемішувачий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 3.2) рН до 7,0. Через трубу перетискування передають з інокулятора інокулят від ТП 5.7. Культивують до концентрації біомаси 7,4 г/л при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішувачого пристрою 250 об/хв і постійною аерацією впродовж 48 год. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП 6 Виробничий біосинтез

ТП 6.1 Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом 100 м³ перекачують простерилізоване поживне середовище (від ДР 4.6). Вмикають перемішуючий пристрій та охолоджують. 6 %-м розчином NaOH (від ДР 3.2) доводять рН до 7,0. Через трубу перетискування передають з інокулятора інокулят від ТП 5.8. Культивують при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 250 об/хв і постійною аерацією впродовж 48 год. Проводять мікробіологічний контроль (Км) на відсутність сторонньої мікробіоти.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Контроль виробництва здійснюється з метою отримання якісного продукту, що відповідає наведеним вище вимогам [50]. Основні точки, параметри контролю та межі їх змін подані в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Таблиця точок контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1.1 <i>Забір повітря</i> Кт.1.1.1.1	Повітря з атмосфери, кількість частинок	Пропускна здатність повітрязабірника	Кожну операцію	2000 частинок /м ³
ДР 1.1.2. <i>Очистка повітря від механічних домішок</i> Кт 1.1.2.1	Повітря, ступінь чистоти повітря	Ефективність очистки повітря	Кожну операцію	E=80%
ДР 1.1.3. <i>Нагнітання повітря</i> Кт 1.1.3.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 1.1.4. <i>Стабілізація параметрів повітря</i> Кт 1.1.4.1	Температура та вологість повітря	Термометр, вологомір	Під час нагрівання	20 °С, 40-60%

<i>НУХТ БТЕК 04.02.41 КР ПЗ</i>				
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Безкоровайна К.І.</i>		
<i>Перевір.</i>		<i>Воронцов О.О.</i>		
<i>Реценз.</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков</i>		
<i>РОЗДІЛ 7</i>			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>
			1	10
<i>Кафедра БТМ</i>				

ДР 1.2.1. <i>Забір повітря</i> Кт 1.2.1.1	Повітря з атмосфери, кількість частинок	Пропускна здатність повітрязаб ірника	Кожну операцію	2000 частинок /м ³
ДР 1.2.5. <i>Підігрів повітря</i> Кт 1.2.5.1	Температура та вологість повітря	Термометр , вологомір	Кожну операцію	40-45 °С, 40%
ДР 1.2.6. <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i> Кт 1.2.6.1 Кмб 1.2.6.2	Повітря, вміст мікроорганізмів та часток	Метод визначення мікробної контамінації (проба повітря КУО/м3), седиментація	Кожної зміни, під час культивування	< 2 КУО/м3, max = 200 часток/м3 , E=95%
ДР 1.2.7. <i>Очищення повітря на індивідуальному фільтрі</i> Кт 1.2.7.1 Кмб 1.2.7.2	Повітря, ефективність очистки, вміст мікроорганізмів та часток	Проба повітря, часточки бруду	Безперервно при подачі повітря	E=99,999 %, max = 10 часток/м3 , не має життєздатних мікроорганізмів
Кт, Км 1.3.1 <i>Приготування і стерилізація композиції I</i>	Композиція I Тиск (температура), час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 1.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції II</i>	Композиція II Тиск (температура), час витримки,	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль	P = 0,15 МПа τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

<i>ції II</i>	стерильність	конт роль.	після стерилізації	робіоти
Кт, Км 1.4.1 <i>Пригот ування і стерилізація композиції I</i>	Композиція I Тиск (температура), час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05 \text{ МПа}$ $\tau = 30 \text{ хв,}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 1.4.2 <i>Пригот ування і стерилізація композиції II</i>	Композиція II Тиск (температура), час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль.	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15 \text{ МПа}$ $\tau = 30 \text{ хв,}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.4 <i>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культур	Годинник термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – після вирощування культури в колбах	$t = 30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C, } \tau = 96 \text{ год,}$ $\omega = 250 \text{ об/хв,}$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кх, Кт, Км 2.5 <i>Вирощування культури у інокуляторі</i>	Поживне середовище в інокуляторі рН Посівний матеріал,	Датчик рН годинник термометр технічний,	рН визначають після змішування всіх компонентів поживного середовища в інокуляторі,	$pH = 6,8-7,0$ $t = 30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C, } \tau = 96 \text{ год,}$ $\omega = 250 \text{ об/хв,}$

	тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культур и морфологічна відповідність організмів.	тахометр, виротомір, манометр, мікроскоп.	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично о весь час вирощування Мікроскопіювання – в кінці процесу вирощування культури в інокуляторі	1 л·л/ хв, Рнадл.= 0,02 МПа. відсутність сторонньої мікробіоти
--	--	--	---	--

7.1. Визначення концентрації біомаси

Гравіметричним (ваговим) аналізом називають метод кількісного хімічного аналізу, який базується на точному вимірюванні маси визначуваної речовини або її складових частин, виділених в хімічно чистому стані або у вигляді сполук відомого постійного складу.

Гравіметричний метод визначення біомаси, полягає в центрифугуванні рідкої культури протягом 30 хвилин, з наступним відділенням супернатанта, витримкою центрифугованої біомаси в сушильній шафі і зважуванням сухої маси бактерій на вагах з вирахуванням маси центрифужних пробірок. [51]

Методика визначення.

1. У чисті центрифужні пробірки ємністю 12 мл поміщають 10 мл досліджуваної суспензії клітин.

2. Пробірки центрифугують 30 хв при 3500 об/хв.
3. В пробірку додають 9 мл дистильованої води і центрифугують повторно
4. Пробу висушують безпосередньо в центрифужній пробірці

Пробірки зважують та на підставі різниці між масою вихідної пустої пробірки та масою пробірки заповненою висушеними клітинами, роблять висновок про концентрацію біомаси.

7.2. Мікробіологічний контроль

Контроль на відсутність сторонньої мікробіоти здійснюється:

1. Шляхом мікроскопії - шляхом перегляду мазків, приготовлених з суспензії розчиненого препарату та фарбування за Грамом. Мазки повинні бути позитивні поліморфні палички з можливою біфуркацією на одному або двох та закінчується обміном у вигляді скупчень або окремих клітин (Рис.6.1).
2. Мікробіологічний метод - посівом на м'ясний пептонний агар, м'ясний пептоновий агар з 5% глюкозою та агарове середовище Сабуро. Висіяти 0,5 мл культуральної рідини у пробірки (2 пробірки з живильним середовищем).

Інокулят розподіляється по всій поверхні живильного середовища струшування пробірки. Посіви на МПА, агар середовище Сабуро інкубують при температурі 37°C (спочатку в горизонтальному положенні (протягом 2 днів), а потім - у вертикальному положенні. Результати посівів враховують через 48 годин, 72 години та через 8 днів. Посіви на агарі середовища Сабуро інкубують при температурі (22 ± 1) °C протягом 8 днів [35].

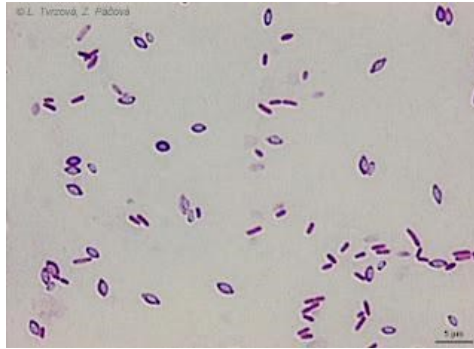


Рис.7.1. Забарвлення по Граму грампозитивні клітини Bacillus laterosporus

Після інкубації посівів протягом зазначеного періоду на поживних речовинах середовища МПА не повинні виявляти ріст чужорідних мікроорганізмів твердої агарової середовища Сабуро - грибковий ріст. У разі виявлення на посівах сторонніх мікроорганізмів контроль повторюють двічі. При відсутності росту мікроорганізмів при повторному висіві вважається, що досліджувана культуральна рідина відповідає вимогам. У випадку росту чужорідних мікроорганізмів під час пересіву зразків, принаймні в одній пробірці, серія відсутня [36].

7.3 Визначення концентрації джерела вуглецю.

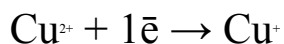
Для визначення вмісту цукрів в харчових продуктах широко застосовують хімічні методи, засновані на здатності карбонільних груп цукрів взаємодіяти з різними окислювачами з подальшим визначенням об'ємними методами залишку окислювача або відновленої цукрової речовини.

Найбільш поширені перманганатний (метод Бертрана), фериціанідний і йодометричний методи визначення цукрів. Ці методи дають високу точність результатів визначення, але трудомісткі і вимагають багато часу.[52]

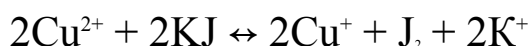
Прискорений йодометричний метод визначення масової частки цукру (метод Шорля) відрізняється простотою, високою точністю визначення і

можливістю визначення вмісту цукру в досить широких межах концентрації (від 0,3 до 88,2 мг в 30 см³ розчину).

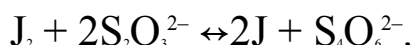
Принцип методу полягає в наступному. Під час кип'ятіння точної кількості рідини Фелінга з досліджуваним розчином, що містить відновні цукри, останні відновлюють йони двовалентного Купруму (Cu²⁺) до купрум(I)оксиду за схемою



Потім на двовалентну мідь, що залишилася, діють KI. В цьому разі іон йоду окиснюється, а двовалентна мідь відновлюється:



Молекулярний йод, що виділяється, титрують розчином тіосульфату натрію:



Для визначення кількості двовалентного Купруму, що відновився цукром, проводять контрольний дослід, в якому замість досліджуваного розчину, що містить цукор, беруть дистильовану воду. Визначають кількість тіосульфату натрію, еквівалентну усій кількості двовалентного Купруму, що приймав участь у досліді. Для цього визначають різницю об'ємів тіосульфату натрію, витраченого на титрування I₂ в контрольному і досліджуваному розчині. За знайденою величиною (різницею двох об'ємів), вираженою в см³ 0,1 н розчину тіосульфату натрію за таблицею 6.7 знаходять еквівалентну кількість цукру у певному об'ємі досліджуваного розчину.

Техніка визначення – в конічну колбу на 200...300 см³ вносять піпеткою 30см³ досліджуваного розчину і додають піпеткою бо з бюретки 10 см³ 6,925%-ного розчину купрум(II)сульфату і 10 см³ лужного розчину сегнетової солі (калій-натрій тартрат), доводять суміш протягом 2 хв. до

кипіння, кип'ятять рівно 2 хв., швидко охолоджують до кімнатної температури, додають 3 г калій йодиду, розчиненого в 10 см³ дистильованої води, 10 см³ 25%-ної сірчаної кислоти і відразу титрують 0,1 н розчином тіосульфату натрію до світло-жовтого забарвлення. Потім додають 2 см³ індикатору (1%-ний розчин крохмалю) і продовжують титрувати до зникнення синього забарвлення. Аналогічно проводять контрольний дослід, в якому замість 30 см³ досліджуваного розчину беруть таку ж кількість дистильованої води. Різницю між об'ємом витраченого на титрування Na₂S₂O₃ в контрольному досліді (V₁) і об'ємом в досліді з витяжкою цукру (V₂) множать на поправку до титру розчину тіосульфату натрію. За даною величиною визначають еквівалентну кількість Na₂S₂O₃, яка дорівнює еквівалентній кількості відновлених Cu²⁺-йонів.[53]

7.3 Концентрація джерела азоту

Амінний азот включає в себе азот амінокислот і пептидів. Існує кілька способів визначення амінного азоту. Найбільш простий і зручний так званий мідний спосіб.

В основу методу покладено здатність амінокислот утворювати розчинні сполуки з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слаболужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді Cu (PO₄)₂ в зворотному буферному розчині. Для відділення розчинних мідних з'єднань від нерозчинного ортофосфата міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

У мірну колбу на 50 см³ піпеткою вносять 5-10 см³ досліджуваного розчину, додають 3-4 краплі тимолфталейну і по краплях 1 н розчин

гідроксиду натрію до появи блідо-блакитного забарвлення. До слаболужного розчину з циліндра при помішуванні доливають 30 см³ суспензії фосфату міді, вміст колби доводять водою до мітки, перемішують і фільтрують через щільний фільтр. Фільтрат повинен бути абсолютно прозорим.

Потім 10 см³ фільтрату піпеткою переносять в конічну колбу, додають 0,5 см³ оцтової кислоти і 10 см³ розчину йодит калію. Після перемішування виділився йод титрують з мікробюретки 0,01 н розчином тіосульфату натрію, додаючи в кінці титрування 1-2 краплі розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення. Кількість витраченого на титрування тіосульфату натрію, помноженого на 0,28, дає вміст амінного азоту в 10 мл фільтрату, що відповідає 2 мл культуральної рідини.[54]

7.4 Визначення кількості КУО

Кількість КУО визначають методом послідовних розведень з подальшим висівом на агаризоване середовище. [55]

1. Досліджуваний матеріал в невеликій кількості вносять до пробірки з рідким поживним середовищем, перемішують,
2. Потім краплю живильного середовища переносять в другу пробірку і т.д.
3. Вміст кожної пробірки виливають в стерильні чашки Петрі, після посіви поміщають в термостат.

ВИСНОВКИ

1. Препарат Понд Трит – рідкий концентрат, що використовують для убереження води від різних видів водоростей.
2. Була проведена порівняльна характеристика та обрано кращий продуцент. Взявши до уваги дані обрано біологічний агент *B. laterosporus* ВКІМ В-10531.
3. Обрані умови та спосіб культивування *B. laterosporus* ВКІМ В-10531 – культивування глибинним способом в періодичних умовах.
4. Виконані розрахунки щодо потреби препарату та потужності його виробництва.
5. Складений опис технологічної схеми, що включає в себе підготовку до виробничого процесу та сам процес культивування, а також специфікація обладнання.
6. Описані методи контролю виробництва таких параметрів: концентрація біомаси, концентрація азоту в поживному середовищі, визначення кількості КУО.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zubasheva M.V., Ganushkina L.A., Smirnova T.A., and Azizbekyan R.R.. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *Brevibacillus laterosporus* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2010. – Vol. 46. – No. 8. – P. 755–762.
2. Буценко, Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посібник / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 323 с.
3. Біопрепарат “Понд-Тріт”. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://greenhol.ua>
4. Понд-Тріт. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.agricola.in.ua>
5. Біопрепарат “Понд-Тріт”. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua>
6. Патент Российской Федерации № RU 2382075 C12N1/20 Штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, подавляющий и предотвращающий развитие планктонных и биоплёночных форм микроскопических водорослей в водных экосистемах./ Азизбекян Р.Р., Оpubл. 20.02.2010.[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://i.moscow>
7. Патент Российской Федерации № RU 2701502 C12N1/20 Кристаллообразующий штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus* с широким спектром антагонистической активности и его применение./ Кузнецова Н.И., Азизбекян Р.Р., Кузин А.И., Николаенко М.А. Оpubл. 26.09.2019.[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://i.moscow>

8. Європейський гнилець (гнилець відкритого розплоду) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://agroua.net>
9. Viviane Zahner, Leon Rabinovitch, Phylip Suffys, Nooman Momen. Genotypic Diversity among *Brevibacillus laterosporus* Strains. *American Society for Microbiology*. DOI: 10.1128/AEM.65.11.5182-5185.1999
10. *Brevibacillus laterosporus* [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://microbiology-micro.blogspot.com>
11. Патент України на винахід №117885. Штам *bacillus amiloliquefaciens* mb b-7571 з альгіцидною активністю / Авдєєва Л.В., Хархота М.А., Рибальченко Н.П. Опубл. 10.07.2017
12. Патент Российской Федерации № RU 2 3 2 3 9 6 8 C1. Штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, подавляющий и предотвращающий развитие микроскопических водорослей различных таксономических типов / Азизбекиян Р.Р., Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М., Николаенко М.А., Смирнова Т.А. Опубл. 10.05.2008 Бюл. №13
13. Luca Ruiu, *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. *NCBI*. 05.09.2013. doi: [10.3390/insects4030476](https://doi.org/10.3390/insects4030476)
14. Nils Meyer, Arite Bigalke, Anett Kaulfuß, Georg Pohnert Strategies and ecological roles of algicidal bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 41, Issue 6, November 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux029>
15. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. I перероб. / Т.П. Пирог. – К. :НУХТ, 2010. – 301с.
16. Desjardine, K., Pereira, A., Wright, H., Matainaho, T., Kelly, M., and R. J. Andersen. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure

- elucidation and synthesis // J. Nat. Prod. – 2007. – V. 70 (12). – P. 1850-1853.
17. Baoyu, T., Jinki, Y., Lihui, L., Chunyan, W., Ning, L., Zhang, K.Q. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 74. – N. 2. – P. 372–380.
18. Пирог, Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. – К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
19. Сорокулова, И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 13–15.
20. Похиленко В. Д., Перельгин В. В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – №. 2-3. – С. 20-41.
21. Dong Z. et al. Exploring the Metabolomic Responses of *Bacillus licheniformis* to Temperature Stress by Gas Chromatography/Mass Spectrometry //Journal of microbiology and biotechnology. – 2018. – Т. 28. – №. 3. – С. 473–481.
22. Бактерии. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://shgpi.edu.ru>
23. Концевая, И. И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов / И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 44 с.
24. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курсової роботи для здобувачів освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» осв.-проф. прогр. «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова,

- природоохоронна» ден. форми навч. / уклад.: Т.П. Пирог, В.О. Красінько, С.М. Тетеріна. – К.: НУХТ, 2020. – 55 с.
25. Способи культивування мікроорганізмів.[Електронний ресурс].
Режим доступу: <https://studfile.net>
26. В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.
Біотехнологія: Підручник/ Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.:
Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.
27. Микробиологические подходы к процессам культивирования культур микроорганизмов.[Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://cyberleninka.ru>
28. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Получение бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе и изучения некоторых её свойств/ ВЕСТНИК ОГУ №10, октябрь 2012
29. Ферментёры/Биореакторы.[Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://xn--80ac2aleg3a.xn--p1ai>
30. Свистунов А.И. Классификация способов ферментации и ферментеров. *Науч. журн. «Вестник НГИЭИ»* 2013. с. 109-114
31. Промышленный ферментер 1000 – 2000 л. [Електронний ресурс].
Режим доступу: <https://biotechno.ru>
32. Поводзинський В.М. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://studfile.net>
33. Загальна біотехнологія. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<http://dspace.mnau.edu.ua>
34. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals //Journal of applied microbiology. – 2006. – Т. 101. – №. 3. – С. 514–525.
35. Seifan M., Samani A. K., Berenjian A. New insights into the role of pH and aeration in the bacterial production of calcium carbonate (CaCO₃)

- //Applied microbiology and biotechnology. – 2017. – Т. 101. – №. 8. – С. 3131–3142.
36. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2012. – 318 с.
37. Лиморенко А.П. Разработка технологии глубинного способа культивирования микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* для производства пробиотиков: Дис.докт.биол.наук: 03.00.23. – Москва, 2002
38. Класифікація миючих засобів. <https://spicetech.com.ua>
39. ProGreen ДЕЗ-8 <http://www.progreen.com.ua>
40. Prom.ua. Засіб дезінфекції ДЕЗОлайт. <https://prom.ua>
41. Засіб дезінфікуючий для поверхонь DEZALDUM 20 5л. <https://atma.ua>
42. Вернедор 1 л. <https://prom.ua>
43. Пат. 2422511 RU. Штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, продуцируючий широкий спектр біологічно активних сполучень / Н. И. Кузнецова, Р.Р. Азизбеян, А.И. Кузин, М.А. Николаенко // Биотехнология. – 2007. – № 4. – С. 18–24.
44. Осипова, И.Г., Сорокулова, И.Б., Терешкина, Н.В., Григорьева, Л.В. Изучение безопасности бактерий рода *Bacillus*, составляющих основу некоторых пробиотиков // Ж. микробиол. – 1998. – № 6. – С. 68–70.
45. Технологічні аспекти одержання пробіотиків / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Ю. М. Дорошко // Наукові праці НУХТ. – 2014. – Т. 20. – 4. – С. 69–77

46. Skrypnyk, I. N. Modern sporeforming probiotics in clinical practice / I.N. Skrypnyk, G.S. Maslova // Modern gastroenterology. – 2009. – № 3 (47). – P. 81–90
47. Закоморний Д. М., Поводзинський В. М., Шибецький В. Ю. Класифікація та аналіз роботи ферментерів з механічними перемішуючими пристроями в аеробних процесах біотехнології // Технічні науки. Scientific Journal «ScienceRise». – 2015. №5/2(10). – С.24–27.
48. Morikawa, M. Beneficial Biofilm Formation by Industrial *Bacillus subtilis* and Related Species // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2006. – Vol.101. – No.1. – P. 1–8.
49. Hong HA, Khaneja R, Tam NM, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract // Research in Microbiology. – 2009. – V. 160 (2). – P. 134–43.
50. Munakata N. et al. Action spectra in ultraviolet wavelengths (150-250 nm) for inactivation and mutagenesis of *Bacillus subtilis* spores obtained with synchrotron radiation // Photochemistry and photobiology. – 1986. – Т. 44. – №. 3. – С. 385–390.
51. Гравіметричний метод аналізу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://udhtu.edu.ua>

52. Визначення цукрів. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://docs.google.com>
53. Визначення масової частки цукру. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cpo.stu.cn.ua>
54. Дослідження вмісту амінного азоту. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ni.biz.ua>
55. Получение чистой культуры сапрофитных бактерий/ И. А. Тарасова, М. В. Ковальская.

ДОДАТКИ

Додаток 1

1. Культивирование штамма.

В качестве питательных использовали NBY, ASC, SG, YM среды следующего состава

25 (мас. %):

среда NBY:

питательный бульон «Difco»	0,8;
дрожжевой экстракт «Difco»	0,3;
вода	остальное,

30

среда YM

гидролизные дрожжи	4,5;
вода	остальное

35

среда ASC:

дрожжевой экстракт «Difco»	0,5;
сахароза	2,0;
лимонная кислота	1,17;
Na ₂ SO ₄	0,4;
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,42;
KCl	0,076;
MgCl ₂ ·6H ₂ O	- 0,042.
вода	- остальное

40

среда SG:

сукцинат натрия	0,5;
глицерин	1,5;
MgSO ₄	0,02;
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5;

45

Стр.: 5

Додаток 2

вода

остальное

Для приготовления агаризованных питательных сред в жидкие среды добавляли агар-агар (2,0 мас. %).

5

2. Культурально-морфологические признаки.

При культивировании на агаризованной среде NBY через 48 часов при температуре 28-30°C штамм образует округлые колонии диаметром 3-5 мм светлого кремового цвета с гладкой поверхностью и неровным краем. Через 72-96 часа роста на питательной среде NBY штамм образует споры.