

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
(підпис) (ім'я та прізвище)

«___» лютого 2023 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«___» лютого 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Біосинтез нізину *Lactococcus lactis*

Виконала: здобувачка 5 курсу, групи 1

СИНЯК Аліна Ігорівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович
(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 – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 20 22 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СИНЯК Аліни Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез нізину *Lactococcus lactis*

керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, доц., к.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 781-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Lactococcus lactis*, цільовий продукт: нізин, об'єм ферментера 10 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика нізину. 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 біосинтезу нізину. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва нізину – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва нізину – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика нізину	01.11.2022 – 09.11.2022	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	10.11.2022 – 15.11.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	16.11.2022 – 25.11.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	26.12.2022 – 02.01.2023	
5	Специфікація обладнання	02.01.2023 – 05.01.2023	
6	Опис технологічної схеми біосинтезу нізину	05.01.2023 – 11.01.2023	
7	Контроль виробництва	12.01.2023 – 15.01.2023	
8	Охорона довкілля	15.01.2023 – 17.01.2023	
9	Оформлення пояснювальної записки	17.01.2023 – 20.01.2023	
10	Виконання графічної частини проекту	20.01.2023 – 31.01.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Аліна СИНЯК _____
(ім'я та прізвище)

Юрій КАРЛАШ _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці біотехнології синтезу нізину штамом *Lactococcus lactis* LD2. Потужність виробництва розрахована для використання нізину в якості харчового консерванту, та становить 76,553 кг/рік, дану кількість нізину отримують культивуванням *Lactococcus lactis* LD2 в ферментері об'ємом 10 м³ за 90 трудоднів.

Біотехнологія отримання нізину передбачає періодичне культивування глибинним способом з постійною подачею стерильного повітря до культуральної рідини та внесенням підживлювального розчину джерела вуглецю. Допоміжні роботи включають: (санітарну підготовку виробництва, підготовку повітря для аерації, приготування титрувальних розчинів, підживлювального розчину глюкози та приготування і стерилізацію поживних середовищ), технологічний процес включає: (отримання посівного матеріалу і виробничий синтез нізину).

Курсовий проект складається з вступу, восьми розділів та списку використаної літератури (59 найменувань). Графічна частина проекту складається із технологічної схеми – 1 аркуш (A1) та апаратурної схеми -1 аркуш (A1). Загальний обсяг роботи – 90 сторінок, 1 додаток, 7 рисунків та 14 таблиць.

Ключові слова: *Lactococcus lactis* LD2, біосинтез, нізин, дробне внесення глюкози.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НІЗИНУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	21
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	23
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	23
3.2. Розрахунок потужності виробництва	25
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	26
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	26
3.5. Біосинтез цільового продукту.....	30
3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	30
3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	31
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	36
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	36
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	37
4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	38
4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	41
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	45
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ НІЗИНУ	48
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	62
7.1. Карта постадійного контролю виробництва	62

7.2. Мікробіологічний контроль	67
7.3. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю	68
7.4. Визначення концентрації цільового продукту.....	69
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	71
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	71
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	73
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів.....	73
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	78
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	79
Список використаної літератури	82

ВСТУП

В сучасному світі виробникам необхідно турбуватися про якість та тривалість зберігання реалізованої продукції, щоб в сучасних жорстких конкуруючих умовах отримувати більше прибутку. Так як за якість продукції, яка виходить з заводу, відповідальний виробник може бути впевнений, то за можливість контамінації під час транспортування та зберігання на прилавках ні, і в разі виявлення таких ознак він може понести репутаційні втрати, що погано вплине на його прибуток. Одним із методів подовження терміну зберігання продуктів є використання консервантів, і серед даних речовин велику частину ринку займає нізин.

Нізин виробляється за допомогою бактерій і володіє бактеріоцидною та бактеріостатичною дією, тобто він входить до класу бактеріоцинів, у 1969 році ФАО/ВООЗ визнав даний антимікробний пептид, як харчовий консервант, а у 1988 році Управлінням з продовольства і медикаментів США його було схвалено для використання в харчових продуктах, і вже десятиліттями його використовують в якості харчового консерванту у більш ніж 50 країнах світу [1].

Нізин є природнім антимікробним пептидом, який знаменитий своїм широким спектром антимікробної дії проти грампозитивних бактерій, а також проявляє антимікробну активність щодо грамнегативних бактерій, а саме *Listeria monocytogenes* і *Staphylococcus aureus* [2], через що він широко використовується в молочній і м'ясопереробній промисловості завдяки своїм видатним характеристикам вищої антимікробної ефективності та меншу токсичність порівняно з іншими хімічними консервантами [3].

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№	Підпи	Да	ВСТУП	Літер	Арку	Аркунів
Розробн	Синяк А. І.						7	92
Керівник	Каппаш Ю.							
Н. контр								
Консульт								
Зав	Стабніков					Кафедра БТМ		

Тому нині є актуальним пошук нових методів і технологій для підвищення виходу нізину та подальшого зниження вартості виробництва, одним із цих методів є використання *Lactococcus lactis* LD2 для надсинтезу нізину (15 367 МО/мл), з використанням більш дорогого поживного середовища, але меншою умовною вартістю 1 МО [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА НІЗИНУ

Нізін (Nisin) – це поліциклічний антибактеріальний пептид, що виробляється грампозитивними бактеріями виду *Lactococcus lactis*. За класифікацію його відносять до бактеріоцинів I класу, підкласу А (тобто це лантибіотик який містить подовжені пептиди з позитивним зарядом) [5].

Термін «лантибіотик» походить від антибіотика, що містить лантіонін, оскільки він містить характерні посттрансляційно модифіковані амінокислоти, лантіонін з тіоефірним містком і 3-метиллантіонін, а також ненасичені 2,3-дидегідроаланін і 2,3-дідегідробутирин.

Даний тип антибіотиків має поліциклічні структури, які є дуже важливими для мембранних властивостей бактеріоцину. Вчені припускають що ці кільцеві структури зберігають жорсткість пептиду, а також захищають бактеріоцин від протеолітичних ферментів і термічної денатурації [6].

Нині, відомо декілька видів нізину природного походження, які можна отримати за допомогою *Lactococcus lactis*, а саме: нізін А, Z, F Q [7]. Серед них найбільш вивченим варіантом нізину є нізін А, тому в подальшому для опису фізико-хімічних властивостей будемо використовувати даний вид нізину, на рис.1 зображено його хімічну структуру.

Коротко розглянемо які відмінності в інших видах нізину по відношенню до найбільш вивченого (Нізін А). Нізін Z найбільш споріднений до першого варіанту, і має лише одну відмінність: у положенні 27 замість амінокислотного залишку гістидину знаходиться аспарагін, за протимікробними властивостями вони схожі, але нізін Z має вищу швидкість дифузії та розчинність в умовах нейтрального рН [8].

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№	Підпи	Да					
Розробн	Синяк А. І.				Літер	Аркв	Арквшів		
Керівник	Карпаш Ю.					9	92		
Н. контр					РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА Кафедра БТМ				
Консульт									
Зав	Стабніков								

Нізин F містить дві амінокислотні заміни в позиціях 27 і 30, а саме аспарагін та валін замість гістидину і ізолейцину, відповідно. Даний вид проявляє найкращі показники активності по відношенню до штамів *Staphylococcus aureus*, однак активність по відношенню до інших штамів гірша, на сьогодні він мало вивчений тому його майже не використовують [9].

Нізин Q має 4 відмінні від наявних у нізині A амінокислотні залишки на позиціях 15, 21, 27 і 30, а саме валін, лейцин, аспарагін і валін замість аланіну, метіоніну, гістидину та ізолейцину, відповідно. Даний вид нізину також має високу антибактеріальну дію по відношенню до грампозитивних бактерій, відмінність даного типу нізину полягає в кращій стійкості до окиснення (тобто, спостерігається вищий рівень активності в окисних умовах, на відміну від нізину A), що пояснюється наявністю тільки одного залишку метіоніну в структурі нізину Q (нізини A та Z містять два залишки метіоніну в центральній області, які впливають на пороутворення).

Через більшу стійкість до окислення даний вид нізину є гарною альтернативою нізину A в якості харчового консерванту, але через недостатню вивченість та складність отримання (необхідно розробляти генно-модифіковані організми, які здатні його синтезувати), даний вид поки не використовують.

Властивості нізину A [10]:

- Зовнішній вигляд – білий порошок;
- Хімічна формула – $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$;
- Молярна маса – 3354,12 Да;
- Т(кипіння) - 2966 °С;
- Розчинний у воді та нерозчинний у неполярних розчинниках (при зниженні рівня рН розчинність збільшується і навпаки при збільшенні рівня рН, 57 мг/мл при рН 2 та 0,25 мг/мл при рН від 8 до 12) [11, 12];
- При взаємодії з етанолом утворює кристали;
- Ізоелектрична точка – 8,5 [13].

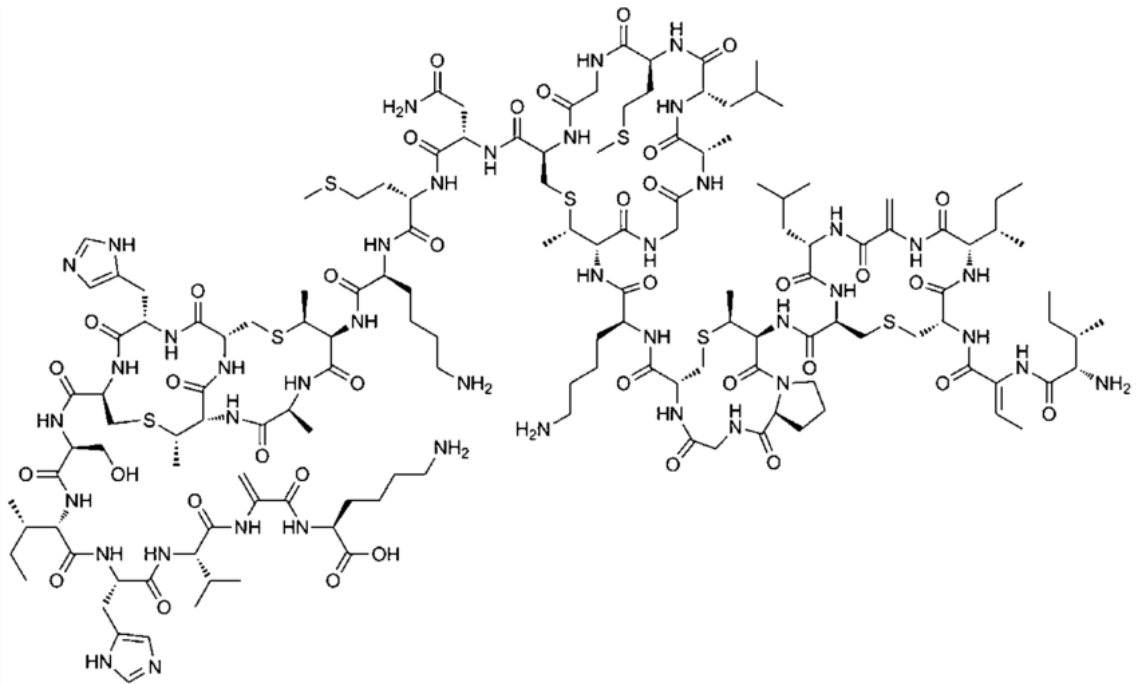


Рис. 1.1. Хімічна структура нізину А

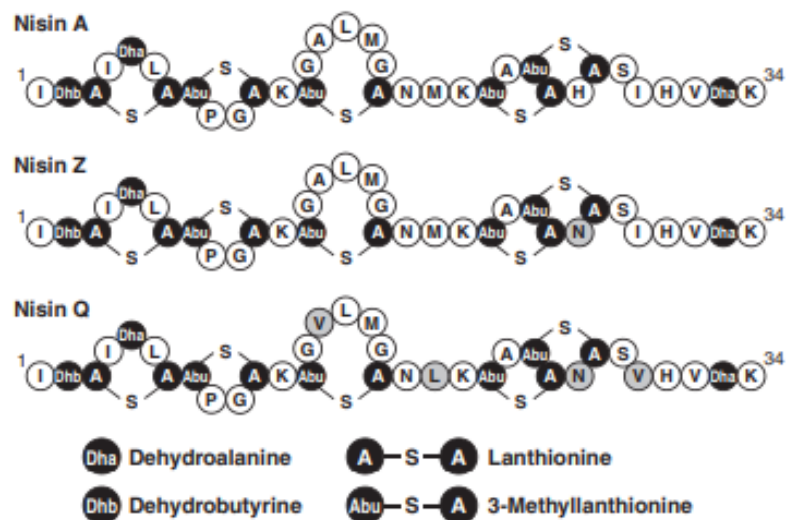


Рис. 1.2. Відмінність амінокислотних залишків в структурі нізину у різних видів

Механізм дії нізину

Нізін проявляє антимікробну дію проти широкого спектру грампозитивних бактерій; однак він має невеликий вплив або зовсім не впливає на грамнегативні бактерії, дріжджі або гриби. Грамнегативні бактерії стійкі до нізину, оскільки їх клітинні стінки набагато менш проникні, ніж у грампозитивних бактерій.

Дія нізину на вегетативні клітини може бути як бактерицидною, так і бактериостатичною в залежності від його концентрації, кількості бактерій, фізіологічного стану бактерій і конкретних умов середовища. Подвійна діяльність включає знищення клітин у вегетативному стані та контроль за розростанням спор [14].

Механізм дії нізину полягає в наступному:

1. Нізин перешкоджає цитоплазматичній мембрані чутливих видів шляхом зв'язування з аніонними фосfolіпідами, особливо ліпідом II, який є важливим елементом у формуванні клітинної стінки.
2. Згодом нізин проникає і вбудовується в мембрану, утворюючи іонний канал(пору).
3. Це забезпечує відтік внутрішньоклітинних компонентів, таких як АТФ, і низькомолекулярних розчинених речовин, таких як катіони калію, протони та амінокислоти.

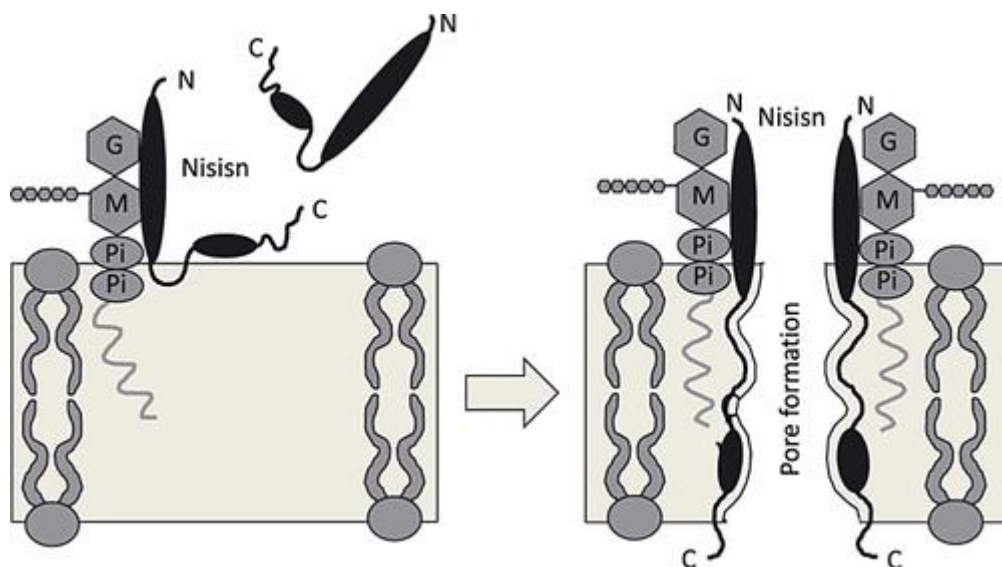


Рис. 1.3. Схематичне зображення механізму дії нізину

Сфера застосування

Нізин вперше був ідентифікований у 1928 році в кисломолочних культурах, після вивчення властивостей даної речовини його продавали в Англії як антимікробний засіб і у 1969 році Об'єднана продовольча та сільськогосподарська організація/Всесвітня організація охорони здоров'я (ФАО/ВООЗ) схвалила нізин як безпечну харчову добавку. В даний час нізин

ліцензовано в більш ніж 50 країнах, і він зробив значний вплив у харчовій промисловості як природний біоконсервант для різних типів харчових продуктів. У Сполучених Штатах (США) нізін був схвалений Управлінням з харчових продуктів і медикаментів у 1988 році, і йому було присвоєно загалом безпечне позначення для використання в плавлених сирах. Він ефективний проти кількох патогенних грампозитивних бактерій, таких як *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* та *Clostridium tyrobutyricum* [15], а також у поєднанні з хелаторами, (наприклад етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)) він ефективний проти деяких патогенних грамнегативних бактерій *Pseudomonas fluorescens* та *Salmonella enterica* (дія хелатуючих агентів дозволяє зв'язати двовалентні іони магнію та кальцію ліпополісахаридів (ЛПС) і дестабілізувати даний шар, таким чином, нізін може транспортуватися через шар ЛПС і створювати пори в цитоплазматичній мембрані, спричиняючи втрату рушійної сили протонів і витік внутрішньоклітинних поживних речовин) [16].

Хоча нізін проявляє антибіотичні властивості, в якості лікарських засобів на сьогодні його не використовують. Проте через довге використання його в якості альтернативного біоконсерванту та підтвердженій безпеці впродовж великого проміжку часу вчені почали визначати додаткові можливі сфери застосування. Так, вчені вирішили дослідити можливість використання нізину для лікування інфекційних захворювань які мають резистентність до звичних ліків (розглядання нізину в даній сфері відбулось завдяки його сильному та широкому спектру дії, низькій ймовірності сприяння розвитку резистентності бактерій та низькій клітинній цитотоксичності). В результаті досліджень (*invitro*) було встановлено що він виявляв бактерицидну дію проти великої групи грампозитивних бактерій, включаючи метицилінорезистентний золотистий стафілокок, ентерекоки та *Streptococcus pneumoniae* [17], він виявляє активність проти резистентного мікроорганізма *Staphylococcus aureus* [18], посилює активність ципрофлоксацину та ванкоміцину при комбінованому застосуванні [19], високобактерицидний проти *Clostridium*

difficile, не всмоктується шлунково-кишковим трактом і не має невибіркової активності проти всієї кишкової флори або всіх анаеробів [20].

Загалом, дослідження продемонстрували, що нізин має потенціал як терапевтичний засіб проти певних інфекційних збудників і хворобливих станів в якості альтернатив звичайним антибіотикам, але через малу кількість досліджень його не використовують.

Науковці не зупинилися на визначенні властивостей нізину по відношенню до інфекційних захворювань, а й розглядали можливість його використання при боротьбі з раком (через властивість деяких антимікробних пептидів проявляти цитотоксичну дію на ракові клітини і, таким чином, мати терапевтичний потенціал). В ході проведених досліджень (*invitro* та на мишах) було виявлено наступні результати: нізин знижує пухлиноутворення HNSCC шляхом індукції переважного апоптозу, зупинки клітинного циклу та зменшення клітинної проліферації в клітинах HNSCC [21], комбінація нізину та доксорубіцину зменшує виявлення пухлини при канцерогенезі шкіри [22]. З вище описаного можна зробити висновок що при більшій кількості досліджень та встановленні точного механізму дії на ракові клітини, можливо в майбутньому його будуть використовувати в якості протипухлинного препарату.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Даний антимикробний пептид виробляється штамми *Lactococcus lactis* [23], тому більше детально розглянемо декілька штамів даного мікроорганізму, які представлені в порівняльній характеристиці продуцентів нізину (таблиця 2.1).

Lactococcus lactis F44 – генно-модифікований штам, в який було ампліфіковано гени стійкості до кислот з метою збалансування оптимального рівня рН для росту і підтримання активності нізину [24]. Даний штам проявляє непогані показники синтезу нізину (5 563 МО/мл), але має найбільший час культивування (24 год) що в порівнянні з *Lactococcus lactis* F44А та *Lactococcus lactis* LD2 на 10 та 6 годин більше, відповідно.

Lactococcus lactis F44А – генно-модифікований штам, у якого толерантність до кислот була підвищена через надмірну експресію гену *asnH* [25]. Отриманий штам характеризується найменшим часом культивування (14 год), в порівнянні з іншими продуцентами, але проявляє найгіршу здатність до синтезу нізину (5 346 МО/мл), даний показник менше в 1,04 та 2,87 рази, по відношенню до *Lactococcus lactis* F44 та *Lactococcus lactis* LD2, відповідно.

Lactococcus lactis LD2 – даний штам було отримано на основі *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 (даний штам зазвичай використовується для промислового виробництва нізину) який був мутований за допомогою діетилового естеру сульфатної кислоти, отриманий продуцент здібний до надсинтезу нізину [4], та проявляє найкращі показники концентрації продукту (15 367 МО/мл), та середній час культивування в порівнянні з *Lactococcus lactis* F44 (на 6 год більше) та *Lactococcus lactis* F44А(на 4 год менше).

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ					
Зм	Арк.	№	Підпи	Ла	РОЗДІЛ ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА	2.	Літер	Аркв	Арквшів	
Розробн	Синяк А І								15	92
Керівник	Карпаш Ю									
Н контр										
Консульт										
Зав.	Стабніков						Кафедра БТМ			

Розглянувши наведені дані в табл. 2.1, не можна визначити оптимального продуцента, так як враховуючи різну здатність до синтезу у даних штамів необхідно порівняти вартість поживного середовища який вони використовують (табл. 2.2).

Порівнявши вартість поживних середовищ для культивування вище зазначених мікроорганізмів, можна дійти висновку що *Lactococcus lactis* F44 має найменшу вартість 1 л поживного середовища (48,886 грн/л), трохи більшу вартість має *Lactococcus lactis* F44A (49,336 грн/л), *Lactococcus lactis* LD2 має найбільшу вартість поживного середовища (95,63 грн/л), але враховуючи що дані продуценти мають різні показники концентрації отриманих даних не вистачає для підсумкового вибору продуцента, тому розглянемо умовну вартість 1 МО нізину (табл. 2.3).

Згідно даних наведених в табл. 2.3, найменшу умовну вартість 1 МО нізину має *Lactococcus lactis* LD2 (0,0062 грн/МО), значно більший даний показник у *Lactococcus lactis* F44 (0,0087 грн/МО), та найбільшу вартість представляє *Lactococcus lactis* F44A (0,0093 грн/МО).

Підсумовуючи, не зважаючи на значно більшу вартість 1 л поживного середовища (95,63 грн/л) *Lactococcus lactis* LD2, має найменший показник умовної вартості 1 МО нізину, в порівнянні з іншими мікроорганізмами та найкращий показник кількості утвореного нізину за годину (731,76 МО/год), з чого можна зробити висновок, що даний штам є найкращим в порівнянні з іншими, і в подальшому ми будемо використовувати даний мікроорганізм.

Порівняльна характеристика продуцентів нізину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Активність нізину, МО/мл*	Тривалість культивування, год	Умови культивування	Література
<i>Lactococcus lactis</i> F44	Сахароза– 15 Дріжджовий екстракт– 15 Кукурудзяний екстракт – 3 Пептон– 15 КН ₂ РО ₄ – 20 Цистеїн – 2,6 NaCl– 1,5 MgSO ₄ × 7H ₂ O– 0,15	5563	24	30 °С рН 6 Культивування при постійній аерації Починаючи з 6 години вносять підживлювальний розчин сахарози кожні 2 год	Zhang J., Caiyin Q., Feng W. Enhance nisin yield via improving acid-tolerant capability of <i>Lactococcus lactis</i> F44. <i>Scientific Reports</i> . 2016, 6(1). doi:10.1038/srep27973
<i>Lactococcus lactis</i> F44A	Сахароза– 20 Дріжджовий екстракт– 15 Кукурудзяний екстракт – 3 Пептон– 15 КН ₂ РО ₄ – 20 Цистеїн – 2,6 NaCl– 1,5 MgSO ₄ × 7H ₂ O– 0,15	5346	14	30 °С рН 5,5 Культивування при постійній аерації Починаючи з 6 години вносять підживлювальний розчин сахарози кожні 2 год	Hao P., Liang D., Cao L., Qiao B. Promoting acid resistance and nisin yield of <i>Lactococcus lactis</i> F44 by genetically increasing D-Asp amidation level inside cell wall. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> . 2017, 101(15): 6137–6153. doi:10.1007/s00253-017-8365-7
<i>Lactococcus lactis</i> LD2	Глюкоза – 500 Дріжджовий екстракт – 24,1 Пептон– 28,6 NaCl – 5,9 КН ₂ РО ₄ – 10 MgSO ₄ × 7H ₂ O – 0,2	15 367	21	37 °С рН 6,8 Вміст розчиненого кисню 30 % Синтез відбувався в ферментері з робочим об'ємом 10 л Початкова конц. глюкози 6 г/л, кінцева 0,2 г/л	Jiang L., Liu Y., Yan G., Cui Y. Aeration and fermentation strategies on nisin production. <i>Biotechnology Letters</i> . 2015, 37(10): 2039–2045. doi:10.1007/s10529-015-1886-1

Примітка: * –1 МО/мл нізину дорівнює 0,025 мкг/ мл [26].

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
Lactococcus lactis F44, *Lactococcus lactis* F44A та *Lactococcus lactis* LD2**

Продуцент	Компонент поживного середовища	г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джере ло інформації (1 – 9)*
<i>Lactococcus lactis</i> F44	Сахароза	15	90	1,35	1
	Дріжджовий екстракт	15	1 100	16,5	2
	Кукурудзяний екстракт	3	90	0,27	3
	Пептон	15	1 200	18	4
	KH ₂ PO ₄	20	31	0,62	5
	Цистеїн	2,6	4 620	12,012	6
	NaCl	1,5	80	0,12	7
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,15	93	0,014	8
Вартість 1 л середовища – 48,886 грн					
<i>Lactococcus lactis</i> F44A	Сахароза	20	90	1,8	1
	Дріжджовий екстракт	15	1 100	16,5	2
	Кукурудзяний екстракт	3	90	0,27	3
	Пептон	15	1 200	18	4
	KH ₂ PO ₄	20	31	0,62	5
	Цистеїн	2,6	4 620	12,012	6
	NaCl	1,5	80	0,12	7
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,15	93	0,014	8
Вартість 1 л середовища – 49,336 грн					
<i>Lactococcus lactis</i> LD2	Глюкоза	500	68	34	9
	Дріжджовий екстракт	24,1	1 100	26,51	2
	Пептон	28,6	1 200	34,32	4
	NaCl	5,9	80	0,472	7
	KH ₂ PO ₄	10	31	0,31	5
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2	93	0,018	8
	Вартість 1 л середовища – 95,63 грн				

Примітка: * – Ціни вказано станом на червень 2022 р.

- <https://www.systopt.com.ua/item-saharoza>
- <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- <https://flagma.ua/uk/kukuruzny-ekstrakt-liker-csl-o5053522.html>
- <https://www.systopt.com.ua/item-pepton-fermentatyvnyj>
- <https://soda.kiev.ua/p18394377-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
- https://aksci.com/item_detail.php?cat=G143&gclid=Cj0KCQjw-pCVBhCFARIsAGMxhAdIFULFaZMS_TMxcKjoOp1ukuiz2gy1MLrbaJX_nSsqWrEQH4pHotUaAssYEALw_wcB
- <https://prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>
- <https://ukrchemgroup.com/ua/p783600334-sulfat-magniyamagnij-sernokislyj.html>
- <https://prom.ua/ua/p68866409-glyukoza-pischevaya.html>

**Умовна вартість 1 МОнізину, синтезованого при культивуванні
Lactococcus lactis F44, *Lactococcus lactis* F44A та *Lactococcus lactis* LD2**

Біологічний агент	Активність нізину, МО/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного нізину, МО/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 МО нізину, грн/МО
<i>Lactococcus lactis</i> F44	5563	24	231,79	48,886	0,0087
<i>Lactococcus lactis</i> F44A	5346	14	381,85	49,336	0,0092
<i>Lactococcus lactis</i> LD2	15 367	21	731,76	95,63	0,0062

Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Дано:

Концентрації нізину – 15 367 МО/мл (384,175 мкг/мл = 0,384175 г/л);

Біомаса – 6,5 г/л.

Кількість вуглецю потрібна для синтезу нізину

Концентрації нізину – 0,384175 г/л

$M(C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7) = 3\,354$ г/моль;

$M(C_{143}) = 1\,716$ г/моль;

$$\frac{N(C_{143}) \times C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7}{M(C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7)} = \frac{1\,716 \times 0,384175}{3\,354} = 0,1965 \text{ г}$$

Кількість вуглецю потрібна для синтезу біомаси

В біомасі кількість вуглецю ставить 50 %, отже:

$$6,5 / 2 = 3,25 \text{ г}$$

Розраховану вище кількість необхідно збільшити в двічі, беручи до уваги холосте окислення, на яке іде приблизно половина вуглецю:

$$3,25 \times 2 = 6,5 \text{ г}$$

Кількість азоту потрібна для синтезу нізину

Концентрації нізину – 0,384175 г/л

$M(C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7) = 3\,354$ г/моль;

$M(N_{42}) = 588$ г/моль;

$$\frac{M(N_{42}) \times C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7}{M(C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7)} = \frac{588 \times 0,384175}{3\ 354} = 0,0673 \text{ г}$$

Кількість азоту потрібна для синтезу біомаси

В біомасі кількість азоту ставить 10 %, отже:

$$6,5 \times 0,1 = 0,65 \text{ г}$$

Підсумовуючи на синтез біомаси та нізину необхідно $6,5 + 0,1965 = 6,6965$ г вуглецю та $0,65 + 0,0673 = 0,7173$ г азоту. Дізнавшись необхідну кількість вуглецю та азоту для синтезу біомаси та нізину розрахуємо яку кількість даних речовин ми отримуємо з нашого поживного середовища.

Визначення вмісту азоту

Дано:

Дріжджовий екстракт – 24,1 г/л

Згідно статті [27] вміст азоту в дріжджовому екстракті становить 10 % = 0,1, отже:

$$24,1 \times 0,1 = 2,41 \text{ г}$$

Визначення вмісту вуглецю

Дано:

$C_6H_{12}O_6 = 40$ г/л;

$M(C_6H_{12}O_6) = 180$ г/моль;

$M(C_6) = 72$ г/моль;

Відсоткове співвідношення вуглецю:

$$\frac{M(C_6) \times C_6H_{12}O_6}{M(C_6H_{12}O_6)} = \frac{72 \times 40}{180} = 16$$

Провівши перевірочний розрахунок поживного середовища можна зазначити що кількість вуглецю та азоту, які наявні в нашому середовищі знаходиться в надлишку, тобто необхідна кількість елементів для синтезу біомаси та цільового продукту задовольняється.

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

Lactococcus lactis LD2 – типовий вид роду *Lactococcus*. Має клітини сферичної або еліптичної форми розмірами 0,5-1,2 * 0,5-1,5 мкм, які можуть бути розміщені поодиноці, парами або короткими ланцюжками. Грампозитивні, нерухливі, спор і капсул не утворюють [28]. На агаризованих середовищах утворюють гладенькі опуклі блискучі колонії сірого кольору [29].

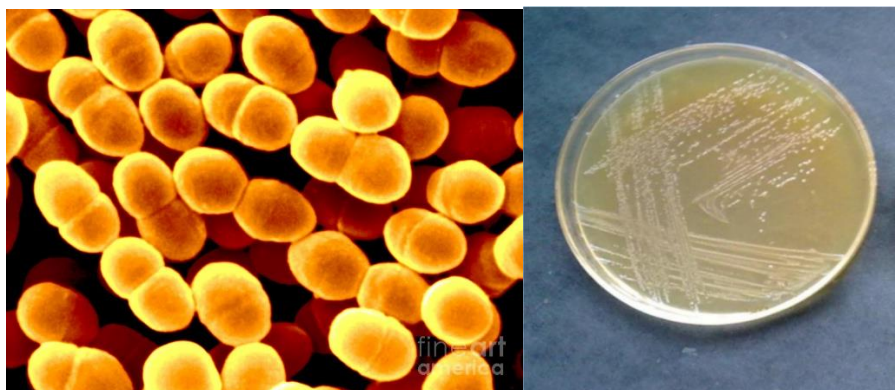


Рис. 2.1. Морфологічні (ліворуч) та культуральні (праворуч) ознаки *Lactococcus lactis* LD2

Lactococcus lactis LD2 – гомоферментативні молочнокислі бактерії (зброджування вуглеводів супроводжується, в основному, утворенням L(+)-молочної кислоти без виділення вуглекислого газу), хемоорганогетеротрофи, факультативні анаероби з метаболізмом бродильного типу, каталазо- та оксидазопозитивні. Оптимальний діапазон температур росту – від 30 до 37 °C (може рости й за 10 °C, але не за 45 °C), найсприятливіший для росту рівень рН – від 6,0 до 7,0. Для нормальної життєдіяльності потребує екзогенного внесення амінокислот (є ауксотрофом) [28].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Таксономічний статус *Lactococcus lactis* LD2 наведено згідно з [30].

Домен	<i>Bacteria</i>
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Bacilli</i>
Порядок	<i>Lactobacillales</i>

Родина *Streptococcaceae*
Рід *Lactococcus*
Вид *Lactococcus lactis*
Штам *Lactococcus lactis* LD2

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Нізин вперше був ідентифікований у 1928 році в кисломолочних культурах, після вивчення властивостей даної речовини його продавали в Англії як антимікробний засіб і у 1969 році Об'єднана продовольча та сільськогосподарська організація/Всесвітня організація охорони здоров'я (ФАО/ВООЗ) схвалила нізін як безпечну харчову добавку. В даний час нізін ліцензовано в більш ніж 50 країнах, і він зробив значний вплив у харчовій промисловості як природний біоконсервант для різних типів харчових продуктів. У Сполучених Штатах (США) нізін був схвалений Управлінням з харчових продуктів і медикаментів у 1988 році, і йому було присвоєно загалом безпечне позначення для використання в плавлених сирах. Він ефективний проти кількох патогенних грампозитивних бактерій, таких як *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* та *Clostridium tyrobutyricum* [15], а також у поєднанні з хелаторами, (наприклад етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)) він ефективний проти деяких патогенних грамнегативних бактерій *Salmonella enterica* та *Pseudomonas fluorescens* (дія хелатуючих агентів дозволяє зв'язати двовалентні іони магнію та кальцію ліпополісахаридів (ЛПС) і дестабілізувати даний шар, таким чином, нізін може транспортуватися через шар ЛПС і створювати пори в цитоплазматичній мембрані, спричиняючи втрату рушійної сили протонів і витік внутрішньоклітинних поживних речовин) [16].

Хоча нізін проявляє антибіотичні властивості, в якості лікарських засобів на сьогодні його не використовують. Проте через довге використання його в якості альтернативного біоконсерванту та підтвердженій безпеці впродовж великого проміжку часу вчені почали визначати додаткові можливі сфери застосування.

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№	Підпи	Ла	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ	Літер	Аркв	Арквшів
Розробн	Синяк А. І.						23	92
Керівник	Карпаш Ю.							
Н. контр								23
Консульт							Кафедра БТМ	
Зав	Стабніков							

Так, вчені вирішили дослідити можливість використання нізину для лікування інфекційних захворювань які мають резистентність до звичних ліків (розглядання нізину в даній сфері відбулось завдяки його сильному та широкому спектру дії, низькій ймовірності сприяння розвитку резистентності бактерій та низькій клітинній цитотоксичності). В результаті досліджень (*invitro*) було встановлено що він виявляв бактерицидну дію проти великої групи грампозитивних бактерій, включаючи метицилінорезистентний золотистий стафілокок, ентерекоки та *Streptococcus pneumoniae* [17], він виявляє активність проти резистентного *Staphylococcus aureus* [18], посилює активність ципрофлоксацину та ванкоміцину при комбінованому застосуванні [19], високобактерицидний проти *Clostridium difficile*, не всмоктується шлунково-кишковим трактом і не має невибіркової активності проти всієї кишкової флори або всіх анаеробів [20].

Загалом, дослідження продемонстрували, що нізин має потенціал як терапевтичний засіб проти певних інфекційних збудників і хворобливих станів в якості альтернатив звичайним антибіотикам, але через малу кількість досліджень його не використовують.

Науковці не зупинилися на визначенні властивостей нізину по відношенню до інфекційних захворювань, а й розглядали можливість його використання при боротьбі з раком (через властивість деяких антимікробних пептидів проявляти цитотоксичну дію на ракові клітини і, таким чином, мати терапевтичний потенціал). В ході проведених досліджень (*in vitro* та на мишах) було виявлено наступні результати: нізин знижує пухлиноутворення HNSCC шляхом індукції переважного апоптозу, зупинки клітинного циклу та зменшення клітинної проліферації в клітинах HNSCC [21], комбінація нізину та доксорубіцину зменшує виявлення пухлини при канцерогенезі шкіри [22]. З вище описаного можна зробити висновок що при більшій кількості досліджень та встановленні точного механізму дії на ракові клітини, можливо в майбутньому його будуть використовувати в якості протипухлинного препарату.

Підсумовуючи всю вище наведену інформацію найоптимальнішим варіантом використання нізину нині є застосування його в якості харчового консерванту через велику кількість досліджень та гарний результат впродовж тривалого результату.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Згідно звіту Європейського агентства з безпеки харчових продуктів нізин можна використовувати в якості консерванту в певних продуктах, а саме в сирах (зрілих, плавлених, маскарпоне), сирній продукції та термічно обробленій м'ясній продукції [31]. Враховуючи інформацію яка зазначалась раніше, а саме що з самого початку його було дозволено для використання у плавлених сирах, та складність підрахунку кількість продукції в інших нішах його застосування ми будемо розглядати використання нізину в якості консерванту для плавлених сирів.

За даними державної служби статистики України за 2020 рік було вироблено 30 621,3 т плавленого сиру [32]. Також враховуючи визначений максимальний допустимий рівень нізину в плавленому сиру який становить 12,5 мг/кг [31], щоб забезпечити весь вироблений плавлений сир в 2020 році консервантом потрібно:

$$30\,621\,300\text{ кг} \times 12,5\text{ мг/кг} = 382\,766\,250\text{ мг (нізину)} = 382,8\text{ кг}$$

Але враховуючи конкуренцію на ринку та неможливість забезпечити 100 % використання саме нашого товару, для подальших розрахунків доцільно обрати 20 % від потреби 2020 року, отже:

$$382,8\text{ кг} \times 20\% = 76,553\text{ кг}$$

Розрахувавши необхідну кількість консерванту, та враховуючи що синтез нізину відбувається мікробним шляхом, за допомогою *Lactococcus lactis* LD2 який синтезує 15 367 МО/мл (1 МО/мл = 0,025 мкг/мл) визначимо яку кількість культуральної рідини необхідно отримати:

$$15367\text{ МО/мл} \times 0,025\text{ мкг/мл} = 384\text{ мкг/мл} = 0,384\text{ мг/мл} = 0,384\text{ кг/м}^3$$

$$76,553\text{ кг} / 0,384\text{ кг/м}^3 = 199,3\text{ м}^3$$

Крім того, після отримання культуральної рідини на певних етапах будуть відбуватися втрати продукту через виділення та очищення його у розмірі 40%. Тому ці втрати необхідно враховувати, а загальний об'єм культуральної рідини з їх урахуванням виглядатиме наступним чином:

$$199,3 / (1 - 0,4) = 332,2 \text{ м}^3$$

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

Після визначення необхідної кількості культуральної рідини за рік необхідно провести розрахунок кількості культуральної рідини на добу, кількість робочих трудоднів приймемо 90, так як після закінчення виробництва нізину це дає нам можливість економічно вигідніше використовувати наше обладнання для інших потреб, аніж виготовляти один продукт протягом року.

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{332,2}{90} = 3,691 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Кількість продукту за цикл ($V_{пц}$) становитиме:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,3 * 3,691 * 28}{24} = 5,598 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

де $T_{цф} = 28$ годин, цикл роботи ферментера, який складається з тривалість виробничого біосинтезу (21 год) та часу підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість проведення нестерильних операцій $K_1 = 1,3$.

5 598 л культуральної рідини ($V_{пц}$) можна отримати у ферментері, з геометричним об'ємом, що становитиме:

$$V_r = \frac{V_{пц}}{K_{зап}} = \frac{5\,598}{0,6} = 9\,330 \text{ л}$$

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_r = 10 \text{ м}^3$.

Проведемо уточнення коефіцієнта заповнення $K_{зап} = \frac{V_{пц}}{V_r} = \frac{5\,598}{10\,000} = 0,56$,

дане значення задовольняє наші потреби, тому залишаємо його незмінним.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Результатом виробничого циклу є $V_{пц} = 5\,598$ л культуральної рідини. При отриманні культуральної рідини необхідно враховувати втрати КР у результаті

краплиносу через колектор відпрацьованого повітря (E_{ϕ}), що становитимуть 10%.

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

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{5\,598}{1 - 0,1} = 6\,220 \text{ л}$$

Розрахунок розчину підживлення та початкового об'єму культуральної рідини (за правилом хреста)

Концентрація розчину підживлення (глюкози) – 500 г/л

Початкова концентрація глюкози в ПС – 6 г/л

Кінцева концентрації глюкози в КР – 0,2 г/л

500 6-0,2= 5,8 частин – розчину підживлення
0,2

6 460-0,2 = 499,8 частин – початкове поживне середовище
(500- 0,2 = 499,8; 6 – 0,2 = 5,8)

Співвідношення розчину підживлення до початкового об'єму культуральної рідини $C_{\text{пв}} = 499,8:5,8 = 86,2$

Початковий об'єм поживного середовища $V_{\text{псп}} = V_{\text{псл}}/(1+1/C_{\text{пв}}) =$
 $= 5\,623/(1+1/86,2) = 5\,559 \text{ л}$

Об'єм розчину підживлення $V_{\text{рп}} = V_{\text{псп}}/C_{\text{пв}} = 5\,559/86,2 = 64 \text{ л}$

Перевірка $V_{\text{псл}} = V_{\text{псп}} + V_{\text{рп}} = 5\,559 + 64 = 5\,623 \text{ л}$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для ферментера

Робочий об'єм ферментера складається з суми об'єму посівного матеріалу (ПМ) $V_{\text{пм1}}$ та об'єму поживного середовища (ПС) $V_{\text{псл}}$.

Посівний матеріал готується в посівному апараті (ПА), де об'єм його має дорівнювати 3 % від об'єму поживного середовища, що подається у ферментер:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{псл}} + V_{\text{пм1}}, \text{ тоді } V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{псл}}$$

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{псл}} + X_{\text{пм1}} \times V_{\text{псл}}$$

$$V_{\text{псл}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 5\,792 / (1 + 0,03) = 5\,623,3 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{псл}} = 5\,792 - 5\,623,3 = 168,7 \text{ л}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для посівних апаратів

Посівний матеріал готується у посівному апараті з робочим об'ємом $V_{роб2}$

$$V_{роб2} = V_{пм1}/(1-E_{пм}) = 168,7/(1-0,13) = 193,9 \text{ л}$$

де $E_{пм} = 0,13$ – втрати культуральної рідини під час вирощування посівного матеріалу в посівному апараті через процес краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації середовища.

Для одержання посівного матеріалу потрібно мати наступну кількість посівного матеріалу який становить 10% від об'єму поживного середовища $V_{пс2}$ та наступний об'єм поживного середовища $V_{пс2}$.

$$V_{пс2} = V_{роб2}/(1+X_{пм2}) = 193,9/(1+0,1) = 176,3 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 193,9 - 176,3 = 17,6 \text{ л}$$

Для визначення орієнтовного геометричного об'єму посівного апарата $V_{па1}$ використовується $V_{роб2}$ та $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{па1} = V_{роб2} / K_{зап} = 193,9/0,6 = 323 \text{ л}$$

Отже, таку кількість посівного матеріалу *Lactococcus lactis* LD2 можливо отримати при культивуванні в посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{па} = 0,3 \text{ м}^3$. Тоді справжній коефіцієнт заповнення буде становити

$$K_{зап2} = V_{роб2} / V_{па} = 193,9/300 = 0,64, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок ПС та ПМ для інокулятора

Посівний матеріал для посівного апарата $0,3 \text{ м}^3$ готується в інокуляторі з роб. об'ємом $V_{роб3}$

$$V_{роб3} = V_{пм3}/(1-E_{пм3}) = 17,6/(1-0,05) = 18,53 \text{ л ,}$$

де $E_{пм3} = 0,05$ – це втрати КР за рахунок краплевиносу частини КР під час аерації середовища при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі.

Для отримання посівного матеріалу $V_{пс4}$ необхідно мати подальший об'єм поживного середовища $V_{пс3}$ та кількість посівного матеріалу, що дстановить 10% від об'єму поживного середовища $V_{пс3}$

$$V_{пс3} = V_{роб3}/(1+X_{пм3}) = 18,53 / (1+0,1) = 16,85 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 18,53 - 16,85 = 1,68 \text{ л}$$

Для визначення орієнтовного геометричного об'єму інокулятора $V_{\text{ін1}}$ використовується $V_{\text{роб4}}$ та $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення = 0,6;

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{роб3}} / K_{\text{зап}} = 18,53 / 0,6 = 30,8 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Lactococcus lactis* LD2 можна отримати при культивуванні в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін1}} = 30$ л. Тоді справжній коефіцієнт заповнення становитиме

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{ін}} = 18,53 / 30 = 0,61, \text{ що дозволено.}$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб

Кількість посівного матеріалу, який готується в колбах на качалці $V_{\text{пм3}} = 1,68$ л. Втратами при культивуванні в колбах можна знехтувати, затим що вони малі.

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{пм3}} = 1,68 \text{ л}$$

Для отримання посівного матеріалу необхідно мати подальший об'єм поживного середовища $V_{\text{пс4}}$ та кількість посівного матеріалу, яка складає 10% від об'єму поживного середовища $V_{\text{пс4}}$

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 1,68 / (1 + 0,1) = 1,53 \text{ л}$$

Об'єм посівного матеріалу

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 1,68 - 1,53 = 0,15 \text{ л}$$

Для культивування застосовуємо колби з об'ємом $V_{\text{кол}} = 0,75$ л та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап}} = 0,2$

Кількість колб

$$N_{\text{к}} = V_{\text{роб5}} / V_{\text{кол}} \times K_{\text{зап}} = 1,68 / 0,75 \cdot 0,2 = 11,2 \text{ колб}$$

Підсумовуючи можна зазначити, що процес одержання посівного матеріалу для синтезу нізину у ферментері об'ємом 10 м^3 і з коефіцієнтом заповнення 0,6 відбуватиметься у три етапи.

Таблиця 3.1.

Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, V _г , л	Коефіцієнт заповнення, K _{зап} , частка	Робочий об'єм ферментера, V _{роб} , л	Об'єм поживного середовища, V _{пс} , л	Об'єм посівного матеріалу, V _{пм} , л
1	0,750× 12 колб	0,2	1,68	1,53	0,15
2	30	0,61	18,53	16,85	1,68
3	300	0,64	193,9	176,3	17,6
4	10 000	0,62	5 792	5 623,3	168,7

3.5. Біосинтез цільового продукту

3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом *Lactococcus lactis* LD2 є глюкоза, катаболізм якої відбувається шляхом гліколізу (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса, рис. 3.2). Спершу глюкоза піддається фосфорилуванню глюкокіназою (КФ: 2.7.1.2) з використанням молекули АТФ, у результаті чого утворюється глюкозо-6-фосфат, який за участі глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ: 5.3.1.9) трансформується у фруктозо-6-фосфат. Сформована сполука фосфорилується за участі АТФ АТФ-залежною фосфофруктокіназою (КФ: 2.7.1.11) з формуванням фруктозо-1,6-дифосфату, що надалі піддається розщепленню фруктозо-біфосфатною альдолазою класу II (КФ: 4.1.2.13), внаслідок чого утворюються діоксіацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат – сполуки, які можуть переходити одна в одну за участю тріозофосфатізомерази (КФ: 5.3.1.1). У подальші реакції гліколітичного шляху вступає гліцеральдегід-3-фосфат, який окиснюється до 1,3-дифосфогліцерату (при цьому виділяється 2 молекули НАДН) за участю гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ: 1.2.1.12). Далі від 1,3-дифосфогліцерату відщеплюється один залишок фосфатної кислоти під дією 6-фосфогліцераткінази (КФ: 2.7.2.3) – виділяється АТФ та утворюється 3-фосфогліцерат, котрий ізомеризується в 2-фосфогліцерат за участі 2,3-біфосфогліцератзалежної фосфогліцератної мутази (КФ: 5.4.2.12). 2-фосфогліцерат надалі під дією енолази (КФ 4.2.1.11) переходить у фосфоенолпіруват, що за підтримки піруваткінази (КФ 2.7.1.40)

трансформується у піруват з виділенням АТФ. Утворений піруват залучається до циклу трикарбонових кислот.

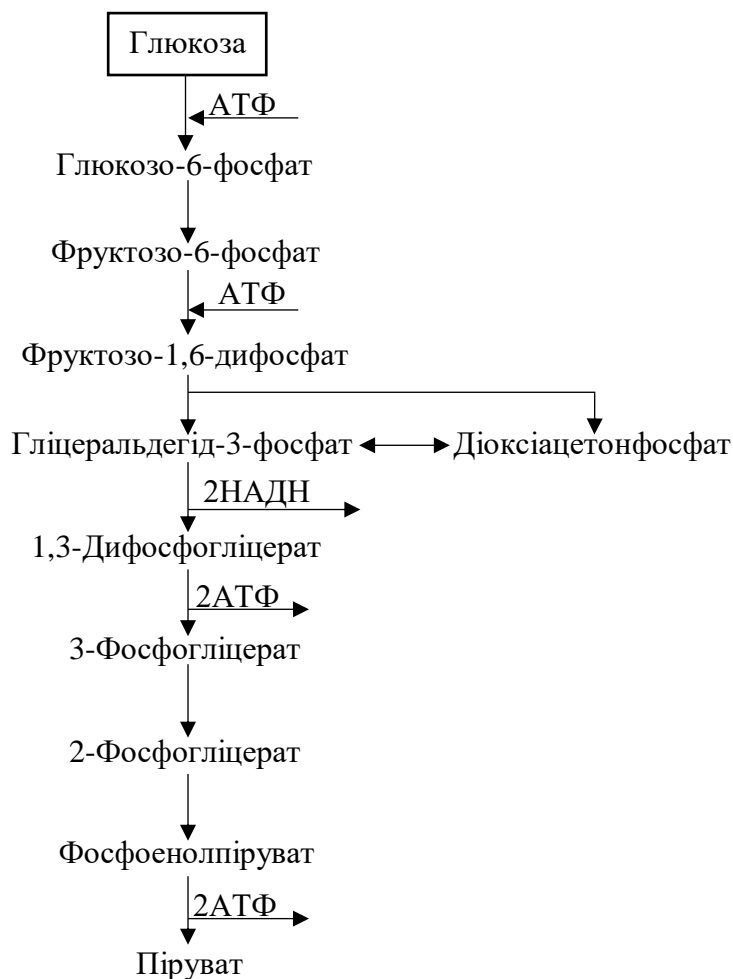


Рис. 3.1. Катаболізм глюкози в *Lactococcus lactis* LD2

Ферменти: 1 – Глюкокіназа (КФ: 2.7.1.2); 2 – Глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ: 5.3.1.9); 3 – АТФ-залежна фосфотруктокіназа (КФ: 2.7.1.11); 4 – Фруктозобісфосфатна альдолаза, клас II (КФ: 4.1.2.13); 5 – Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ: 1.2.1.12); 6 – Фосфогліцераткіназа (КФ: 2.7.2.3); 7 – 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератна мутаза (КФ: 5.4.2.11); 8 – Енолаза (КФ: 4.2.1.11); 9 – Піруваткіназа (КФ: 2.7.1.40); 10 – Тріозофосфатізомераза (КФ: 5.3.1.1).

3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Початковими сполуками для синтезу нізину є (додаток 1): фруктозо-6-фосфат (синтез ароматичних амінокислот – гістидину, триптофану, фенілаланіну та тирозину), фосфоенолпіруват (триптофан, фенілаланін, тирозин), 3-

фосфогліцерат (гліцин, цистеїн, серин,), піруват (валін, лейцин, аланін,), 2-оксоглутарат (глутамат, аргінін, пролін, глютамін) та оксалоацетат (аспартат, аспарагін, лізин, треонін, метіонін, ізолейцин). Спочатку з амінокислотних залишків будується пропептид нізину.

Ароматичні амінокислоти синтезуються зі спільного попередника – фруктозо-6-фосфату, з якого під дією транскетолази (КФ: 2.2.1.1) утворюються ксилулозо-5-фосфат і еритрозо-4-фосфат, з яких далі синтезуються гістидин та інші ароматичні амінокислоти відповідно. Ксилулозо-5-фосфат під дією рибулозофосфат-3-епімерази (КФ: 5.1.3.1) перетворюється на рибулозо-5-фосфат, котрий далі ізомеризується в рибозо-5-фосфат за участі рибозо-5-фосфат-ізомерази А (КФ: 5.3.1.6). До утвореної сполуки додається спочатку пірофосфатний залишок (рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ: 2.7.6.1)), потім – молекула АТФ (АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ: 2.4.2.17)), в результаті чого утворюється 1-(5-фосфо-рибозил)-АТФ. Далі від цієї речовини під дією фосфорибозил-АТФ пірофосфогідролази (КФ: 3.6.1.31) відщеплюються два залишки фосфорної кислоти – утворюється 1-(5-фосфо-рибозил)-АМФ, який піддається низці перетворень ферментами фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазолкарбоксамідриботидізомеразою (КФ: 5.3.1.16) та субодиницею імідазолгліцеролфосфатсинтази HisH (КФ: 4.3.2.10), внаслідок чого утворюється D-еритро-імідазол-гліцерофосфат. Далі ця речовина піддається дії низки ферментів: імідазолгліцеринфосфатдегідратази (КФ: 4.2.1.19) (утворюється імідазол-ацетолфосфат), гістидинол-фосфатамінотрансферази (КФ: 2.6.1.9) (утворюється гістидинолфосфат), гістидинолфосфатази (КФ: 3.1.3.15) (утворюється гістидинол) та гістидинолдегідрогенази (КФ: 1.1.1.23) (утворення гістидину).

Шлях біосинтезу триптофану, фенілаланіну і тирозину починається з еритрозо-4-фосфату та фосфоенолпірувату, які конденсуються під дією 3-дезоксид-7-фосфогептулонатсинтази (КФ: 2.5.1.54) з утворенням 2-дегідрод-3-дезоксид-D-арабіно-гептонат-7-фосфату, який внаслідок дії ферментів 3-дегідрохінатсинтази (КФ: 4.2.3.4), 3-дегідрохінатдегідратази I (КФ: 4.2.1.10) та

та шикіатдегідрогенази (КФ: 1.1.1.25) перетворюється на шикіат. Останній за участі шикіаткінази (КФ: 2.7.1.71), 3-фосфошикіат-1-карбоксивінілтрансферази (КФ: 2.5.1.19) і хоризматсинтази (КФ: 4.2.3.5) перетворюється на хоризмат, з якого утворюються антранілат (дія компонента антранілатсинтази II (КФ: 4.1.3.27)) і префенат (дія хоризматмутази (КФ: 5.4.99.5)), з котрих синтезуються триптофан і фенілаланін з тирозином відповідно. Антранілат за участі антранілатфосфорибозилтрансферази (КФ: 2.4.2.18), фосфорибозилантранілатізомерази (КФ: 5.3.1.24) та індол-3-гліцеролфосфатсинтази (КФ: 4.1.1.48) перетворюється на індол-3-гліцеролфосфат, з якого під дією триптофансинтази (КФ: 4.2.1.20) синтезується **триптофан**. З префенату в результаті впливу префенатдегідратази (КФ: 4.2.1.51) утворюється фенілпіруват, котрий піддається трансамінуванню за участі трансамінази ароматичних амінокислот (КФ: 2.6.1.57), в результаті чого синтезується **фенілаланін**. Одна частина фенілаланіну використовується для побудови пропептиду нізину, інша – піддається гідроксилюванню за участі фенілаланін-4-гідроксилази (КФ: 1.14.16.1), внаслідок чого утворюється **тирозин**.

Аланін утворюється безпосередньо з пірувату трансамінуванням за участі аланінсинтезуючої трансамінази (КФ: 2.6.1.66). Також піруват є попередником біосинтезу валіну та лейцину: під дією ацетолактатсинтази (КФ: 2.2.1.6), кетолово-кислотної редуктоізомерази (КФ: 1.1.1.86) та дигідроксокислотної дегідратази (КФ: 4.2.1.9) піруват перетворюється на 3-метил-2-оксобутаноат, з якого в подальшому синтезуються **валін** (за участі амінокислотної трансферази з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42)) і альфа-ізопропілмалат (під дією 2-ізопропілмалатсинтази (КФ: 2.3.3.13)). З останнього за участі (R)-2-метилмалатдегідратази (КФ: 4.2.1.35) утворюється 3-ізопропілмалат, котрий за допомогою 3-ізопропілмалатдегідрогенази (КФ: 1.1.1.85) перетворюється на 2-оксоізокапроат, з якого за допомогою амінотрансферази з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42) синтезується **лейцин**.

Амінокислоти глутаматної родини утворюються з 2-оксоглутарату. Безпосередньо з цієї сполуки амінуванням утворюється **глутамат**, одна частина якого включається в пропептид нізину, інша – використовується для синтезу **аргініну, проліну та глутаміну**.

Ще однією важливою для біосинтезу компонентів пропептиду нізину є оксалоацетат, оскільки ця речовина є попередником амінокислот аспартатної родини: аспартату, аспарагіну, лізину, треоніну, метіоніну та ізолейцину. Першою реакцією в даному метаболічному шляху є трансамінування оксалоацетату за участі цитоплазматичної аспартатамінотрансферази (КФ: 2.6.1.1) з утворенням **аспартату**, який може одразу використовуватися для побудови ланцюга пропептиду нізину або піддаватися дії аспарагінінсинтази (КФ: 6.3.5.4) чи аспартаткінази (КФ: 2.7.2.4) з утворенням **аспарагіну** (одразу включається в поліпептидний ланцюг) чи 4-фосфо-L-аспартату (залучається для синтезу інших амінокислот родини). З 4-фосфо-L-аспартату під дією аспартат-напівальдегіддегідрогенази (КФ: 1.2.1.11) утворюється L-аспартат-4-напівальдегід, котрий у подальшому або перетворюється на **лізин**, або, за участі гомосеринкінази (КФ: 2.7.1.39), на гомосерин, який далі частково перетворюється на **треонін** (під впливом треонінсинтази (КФ: 4.2.3.1)), частково – на O-сукциніл-L-гомосерин (під впливом гомосерин-O-сукцинілтрансферази (КФ: 2.3.1.46)). O-сукциніл-L-гомосерин за участі цистатіонін-гама-синтази (КФ: 2.5.1.48) переходить у цистатіонін, який за допомогою цистеїн-S-кон'югат бета-ліази (КФ: 4.4.1.13) перетворюється в гомоцистеїн, з якого за участі 5-метилтетрагідрооптеройлтриглутамат-гомоцистеїнметилтрансферази (КФ: 2.1.1.14) утворюється **метіонін**. Частина утвореного треоніну, яка безпосередньо не застосовується для синтезу пропептиду нізину, дезамінується треоніндегідратазою (КФ: 4.3.1.19) з утворенням 2-оксобутаноату, з якого під дією великої субодиниці ацетолактатсинтази I/II/III (КФ: 2.2.1.6) утворюється (S)-2-ацето-2-гідроксибутаноат, який вступає у дві послідовні реакції за участі редуктоізомеразі кетолової кислоти (КФ: 1.1.1.86) та дигідроксикислої дегідратази (КФ: 4.2.1.9), результатом яких є утворення (S)-3-метил-2-

оксопентаноату. Утворена речовина піддається трансамінуванню за участі аміотрансферази амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42), внаслідок чого утворюється **ізолейцин**.

Після утворення пропептиду нізину відбувається дегідратація залишків серину та треоніну (під впливом білка біосинтезу нізину NisB), формування метиллантіоніну (під дією білка біосинтезу нізину NisC), транспортування утвореної сполуки (за допомогою нізинтранспортувального АТФ-зв'язувального білка NisT) та розщеплення кінцевої лідерної послідовності (за участі пептидрозщеплювальної серинпротеази NisP).

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Lactococcus lactis LD2 є факультативним анаеробом, який зазвичай вирощується при безкисневих умовах, але науковцями було встановлено що використання аеробного способу культивування призводить до активації іншого метаболічного шляху (використання кисневих умов культивування викликає підвищення активності НАДН-оксидази) за якого відбувається збільшений синтез нізину.

Враховуючи властивості нізину по відношенню до рівня рН вчені намагаються створити модифіковані штами *Lactococcus lactis*, які будуть більш стійкі до кислого середовища та здатні до надсинтезу нізину, але нині відомі модифіковані штами по відношенню до кислого середовища поступаються за показниками синтезу нізину стандартним штамам. Так і в нашому випадку, обраний генно-модифікований штам вирощується при стандартних для даного виду показниках рівня рН та температури, а саме *Lactococcus lactis* LD2 є мезофільним нейтрофілом, так як оптимальний рівень рН становить 6,8, а температура – 37 °С. Отже в нашому випадку необхідно передбачити виробничий синтез в асептичних умовах, так як при даних показниках, можуть рости більшість відомих мікроорганізмів і можливість контамінації знаходиться на високому рівні.

Також з метою зменшення ризику контамінації процес виробничого синтезу нізину буде відбуватись глибинним методом, використовуючи періодичний спосіб культивування, так як максимальний синтез цільового продукту відбувається в стаціонарній фазі росту *Lactococcus lactis*.

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№	Підпи	Да				
Розробн	Синяк А І				РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ	Літер	Аркв	Арквшів
Керівник	Карпаш Ю.						36	92
Н контр					Кафедра БТМ³⁶			
Консвль								
Зав.	Стабніков							

Використовуючи стандартне культивування та метод дробного внесення джерела вуглецю в статті [4] було встановлено що використовуючи культивування з внесенням підживлювального розчину глюкози концентрацією 500 г/л синтез нізину збільшується (початкова концентрація глюкози становить 6 г/л, кінцева концентрація глюкози становить 0,2 г/л), отже слід передбачити приготування та стерилізацію підживлювального розчину глюкози на виробничий біосинтез.

З огляду на вище наведені умови виробничого синтезу (необхідність аерації та культивування глибинним методом) необхідно передбачити встановлення барботера, для подачі в товщу культуральної рідини стерильного аераційного повітря, та встановлення перемішуючого пристрою над барботером для інтенсифікації процесу аерації (найоптимальніше буде використовувати турбінну мішалку закритого типу, через менший руйнівний вплив на клітини продуцента).

Розглянувши вищенаведену інформацію, можна зробити висновок що процес виробничого синтезу нізину буде відбуватись в асептичних умовах, глибинним методом, з періодичним способом культивування, при постійному внесення стерильного аераційного повітря, з внесенням підживлювального розчину глюкози та при постійному перемішуванні.

Для проведення процесу культивування в наведених умовах найбільш доцільно буде використовувати ферментер вироблений під замовлення, в якому буде встановлений всі необхідні датчики, а саме датчик температури, рівня рН та аерації, а також який обладнаний рубашкою для регулювання температури, барботер та ротаметр.

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Як зазначалось раніше в основному біологічний синтез нізину культивування *Lactococcus lactis* LD2 відбувається в анаеробних умовах, але в статті [4] було визначено що у даного штаму надсинтез цільового продукту відбувається в аеробних умовах, тому для отримання посівного матеріалу та виробничого синтезу нізину, необхідно передбачити для підтримання аеробних

умов культивування підготовку стерильного атмосферного повітря. Для одержання готового стерильного повітря потрібно передбачити такі стадії:

- забір атмосферного повітря (у найвищій точці $H = 17$ м);
- очищення повітря на тканих сітках з високолегованих сталей від пилу;
- пропускання повітря через компресор де відбувається його стиснення та нагрівання повітря до 200°C ;
- подача повітря на теплообмінник задля охолодження стисненого повітря (конденсування вологи);
- видалення вологи в ресивері;
- стабілізування тиску й нагрів до 30°C ;
- подача повітря в головний фільтр, задля його очищення до ступеню $E=95\%$;
- очищення в індивідуальних фільтрах, що встановлюються перед посівними апаратами та ферментером, зі ступенем очищення $E=99,995\%$.

4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Задля унеможливлення забруднення культуральної рідини сторонніми речовинами, а також з метою забезпечення належної мікробіологічної чистоти виробництва необхідною є його санітарна підготовка, а саме: підготовка мийних і дезінфікуючих засобів, обробка ними виробничих приміщень та обладнання. При цьому підлогу потрібно мити та дезінфікувати щодня, тоді як стіни, вікна та двері – щомісяця, а обладнання – після кожного циклу виробництва. Для дезінфекції необхідно обрати декілька засобів, щоб уникнути виникнення в мікроорганізмів стійкості. Змінювати дезінфікуючий засіб слід кожні 10-14 діб. Оскільки об'єкти дезінфекції (стіни, підлога, вікна) займають чималу площу, то бажано, щоб засіб для їх обробки одночасно володів як дезінфікуючими, так і мийними властивостями. Для обробки ємнісного обладнання використовуються лише мийні засоби, адже таке обладнання піддається стерилізації насиченою парою.

Для миття обладнання здебільшого використовують **каустичну соду** (діюча речовина – натрію гідроксид) – безбарвну гігроскопічну кристалічну речовина без запаху, яка розчинна у воді з виділенням тепла у великій кількості. Ця речовина – лужної природи (завдяки чому є ефективною проти органічних забруднень), не схильна до самозаймання (однак, ємності можуть вибухнути при нагріванні). Може викликати екзему, опіки шкіри, тому працівникам під час роботи з каустичною содою необхідно дотримуватися всіх правил безпеки: носити окуляри з захистом від хімічних бризок, респіратор, гумові рукавички та чоботи. До недоліків каустичної соди можна віднести те, що вона зумовлює корозію металів. При цьому, каустична сода є зручним у транспортуванні та зберіганні, доступним засобом. Концентрація робочого розчину – 2 %, його температура – від 50 до 60 °С [33].

Для вибору дезінфікуючих засобів проведемо порівняння трьох відомих дезінфектантів, із яких оберемо два найкращих.

Одним із поширених дезінфікуючих засобів є **Полідез** – водний розчин полігексаметиленгуанідину гідрохлориду (ПГМГ-ГХ). До складу засобу також входять: алкілдиметилбензиламонію гідрохлорид (четвертинна амонійна сполука) – 1,5 %, допоміжні компоненти – барвник, ароматизатор і вода, коректор рН. Поєднується з водою у будь-якому співвідношенні, проявляє дезінфікуючу дію грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, вірусів тощо. Окрім дезінфікуючої дії, проявляє також і мийну, а саме видаляє механічні, жирові, білкові забруднення. Не спричинює ушкоджувальної дії на матеріали обробки, добре змивається, не фіксує білкові забруднення на оброблюваній поверхні, не має знебарвлювальної здатності. Вибухобезпечний, незаймистий. Не сумісний з аніонними ПАВ, за присутності органічного забруднення дещо втрачає дезінфікувальну можливість. Під час приготування робочих розчинів засобу працівникам необхідно використовувати гумові рукавички, захисні окуляри (ПО-2, 3), спецодяг. Біодеградабельний, задля утилізації необхідно розвести водою 1:1 або 1:10. Термін придатності – 2 роки, за зберігання в

складських приміщеннях при температурі не нижче 0 °С. Концентрація робочого розчину – 0,5 % [34].

Непоганими мийними та дезінфікуючими властивостями володіє **Ексан Про Дез** – слабколужний водний розчин, до складу якого входять ПАР, антибактеріальні та протибактеріальні добавки, етанол, ялицева олія. Засіб володіє високою емульгувальною, знежирувальною, мийною здатністю. Призначений для миття поверхонь, стійких до промивання, але чутливих до лугів. ПАР, які є складовими засобу – біодеградабельні. Працювати з розчином необхідно в гумових рукавичках. Термін придатності – 12 місяців, за зберігання в критих складських приміщеннях. Концентрація робочого розчину – 1,5 % [35].

Також розглянемо **Мікробак форте** – водний розчин четвертинних амонійних сполук, який має в своєму складі N-(3-амінопропіл)-N-додecilпропан-1,3-діамін, бензил-С12-18-алкілдиметиламоній хлорид і допоміжні речовини. Змішується з водою у різних співвідношеннях, біодеградабельний. Не пошкоджує оброблювані поверхні та має виражену мийну здатність (але при цьому несумісний з аніонними ПАР та милами). Обробку поверхонь методом зрошення – у захисному одязі, окулярах, респіраторі, методом протирання – без засобів індивідуального захисту. Термін придатності засобу – 12 місяців за зберігання в добре провітрюваних приміщеннях, термін придатності робочих розчинів – 14 діб при кімнатній температурі у щільно закритій тарі. Концентрація робочого розчину – 0,5 % [36].

Порівняльну характеристику дезінфекційних засобів наведено в табл. 4.2:

Порівняння дезінфікуючих засобів

Назва дезінфікуючого засобу	Діючі речовини	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л дезінфекційного засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн
Полідез	ПГМГ-ГХ, алкілдиметилбензиламонію гідрохлорид	0,5	74 [16]	0,37
Ексан Про Дез	ПАР, етанол, ялицева олія	1,5	69,48 [18]	1,04
Мікробак форте	бензалконію хлорид, додецилбіспропілентриамін	0,5	523,37 [17]	2,62

Враховуючи, що вартість 1 л робочого розчину засобу Мікробак форте значно перевищує вартість робочих розчинів інших дезінфікуючих засобів (щонайменше в 2,5 раза), використовувати його для дезінфекції не є доцільним, тому обираємо засоби Полідез і Ексан Про Дез. До того ж, різна природа діючих речовин у цих препаратах забезпечить максимальну ефективність процесів дезінфекції виробничих приміщень.

Отже, для миття обладнання будемо використовувати розчин каустичної соди (2 %), для дезінфекції та миття приміщень – розчини засобів Полідез (0,5 %) та Ексан Про Дез (1,5 %).

4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

З метою надсинтезу нізину під час виробничого біосинтезу за допомогою *Lactococcus lactis* LD2 використовують поживне середовище наступного складу (г/л):

Глюкоза – 6;

Дріжджовий екстракт – 24,1;

Пептон – 28,6;

NaCl – 5,9;

KH₂PO₄ – 10;

MgSO₄ × 7H₂O – 0,2.

Далі готують підживлючий розчин глюкози із концентрацією $C_{\text{пр}} = 500$ г/л, який закачують у виробничий ферментер, коли вихідна концентрація глюкози майже використана (протягом 4 годин культивування). Глюкозу подають у ферментер зі змінною швидкістю подачі для підтримки її концентрації на рівні 0,2 г/л протягом усього процесу ферментації [4].

Для вирощування посівного матеріалу *Lactococcus lactis* LD2 використовують поживне середовище наступного складу (г/л):

Глюкоза – 23;

Дріжджовий екстракт – 24,1;

Пептон – 28,6;

NaCl – 5,9;

KH_2PO_4 – 10;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2.

Приготування та стерилізація поживного середовища для качалочних колб

На стадії отримання посівного матеріалу з качалочних колб необхідно приготувати 1,53 л поживного середовища, зважаючи на його невеликий об'єм поділ компонентів буде відбуватись наступним чином: термолабільні речовини – глюкоза, дріжджовий екстракт та пептон будуть готуватись та стерилізуватись в одній колбі об'ємом 1 л (Композиція А). Солі магнію сульфату та натрію хлориду готуються разом в колбі об'ємом 500 мл (Композиція Б), а монофосфат калію (Композиція В) готується окремо з метою унеможливлення випадіння осаду нерозчинних солей. Стерилізація компонентів буде проходити в автоклаві при відповідних температурних режимах: для композиції А – 112 °С, 30 хв; композиції Б та В при 131 °С, 50 хв.

Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора

Через більший об'єм поживного середовища необхідного на дану стадію вирощування посівного матеріалу (16,85 л), для даної стадії буде доцільно об'єднати солі в одну композицію та необхідно передбачити приготування титрувальних агентів для пониження рівня рН до 4,0 перед стерилізацією

композиції (щоб не утворився нерозчинний осад солей, розчин підкислюють 6% хлоридною кислотою) та підвищення рівня рН до 6,8 перед внесення посівного матеріалу (для створення оптимальних умов росту біологічного агента, розчин підлужують 6% натрій гідроксидом).

Композиція А – глюкоза, дріжджовий екстракт та пептон (112 °С, 30 хв);

Композиція Б – натрій хлорид, сульфат магнію та монофосфат калію (131°С, 50 хв).

Приготування та стерилізація композиції А буде відбуватись в окремому реакторі, в той час як, приготування композиції солей відбувається в реакторі, а стерилізація в посівному апараті де буде відбуватись вирощування посівного матеріалу.

Приготування та стерилізація поживного середовища для посівного апарату

Для даного етапу отримання посівного матеріалу необхідно приготувати 176,3 л поживного середовища, поділ компонентів та умови стерилізації буде використовуватись як і на попередній стадії, а саме:

Композиція А – глюкоза, дріжджовий екстракт та пептон (112 °С, 30 хв);

Композиція Б – натрій хлорид, сульфат магнію та монофосфат калію (131°С, 50 хв).

Приготування та стерилізації композиції А буде відбуватись в окремому реакторі-змішувачі, в той час як приготування композиції Б буде в реакторі, а стерилізації в посівному апараті.

Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера

Зважаючи на великий об'єм поживного середовища 5,6 м³, для його приготування та стерилізації доцільно буде використовувати установку безперервної стерилізації з продуктивністю 5 м³/год.

Всі компоненти поживного середовища будуть готуватися в реакторі-змішувачі після розчинення компонентів вони подаються в установку

безперервної стерилізації, де поступово буде відбуватись стерилізація за температури 130 °С.

Також для надсинтезу нізину ми використовуємо підживлювальний розчин глюкози який під час виробничого біосинтезу буде вноситись частинами. Для його приготування та стерилізації будемо використовувати реактор-змішувач об'ємом 0,63 м³, стерилізація буде відбуватись за стандартного для термолабільних речовин температурного режиму (112 °С, 30 хв).

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

Позиція	Назва	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний метал. сіткою, що сприяє вилученню забруднювальних частинок
ФГО-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр сітчастий («Технофільтр», Україна), корпус – із високолегованої сталі, фільтруючий матеріал – гофровані ткани сітки з високолегованих сталей. Клас очищення – G2/G3. Продуктивність – до 1100 м ³ /год, стартовий опір – 50 Па. [37].
К-3	Компресор	1	Компресор Tidy 50 гвинтовий («Dalgakiran», Україна). Максимальний тиск – 7 бар, продуктивність – до 6400 л/хв, потужність – 37 кВт. [38].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник ОРЕКС-3-ST («ОПЕКС», Україна) з нержавіючої сталі. Робочий тиск становить від 6 до 40 бар [39].
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер («Dalgakiran», Україна) з нержавіючої сталі об'ємом 500 л [40].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Паровий калорифер з нержавіючої сталі («ОПЕКС», Україна), продуктивність за повітрям – до 400 л/хв [41].
ФТО-7	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр кишенькового типу («Технофільтр», Україна), корпус – із оцинкованої або нержавіючої сталі, фільтруючий матеріал – поліестер з мікрОВОЛОКНОМ. Клас очищення: G4/F9. Продуктивність – до 800 м ³ /год, стартовий опір – 55 Па. [42].
Р-8	Реактор-змішувач	2	Реактор сталевий об'ємом 5 л («Amar», Індія) з перемішуючим пристроєм та паровою сорочкою. Діаметр – 0,152 м, висота – 0,310 м [43].
ІФ-9 ІФ-15 ІФ-27	Фільтр індивідуальний	3	Фільтр НЕРА («Технофільтр», Україна), корпус – із пластику, алюмінію, оцинкованої або нержавіючої сталі, фільтруючий матеріал мікроскловолокло. Продуктивність – до 1000 м ³ /год, кінцевий опір – 650 Па, стартовий опір – 250 Па. Клас очищення: E10-12/H13/H14/U15-17[44].

НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№	Підпи	Ла
Розробн		Синяк А. І.		
Керівник		Карпаш Ю.		
Н. контр				
Консульт				
Зав		Стабніков		
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літер	Аркв
				45
			Аркшів 92	
			45 Кафедра БТМ	

Продовження табл. 5.1

I-10	Інокулятор	1	Ферментер об'ємом 30 л («Solaris Biotech», Італія) з нержавіючої сталі з барботером, перемішуючим пристроєм, паровою сорочкою, ротаметром, датчиками рН і температури [45].
Д-11 Д-13 Д-19 Д-24	Дозатор об'ємний	7	Лічильник-дозатор поліпропіленовий. Продуктивність становить від 10 до 400 л/хв [46].
P-12	Реактор-змішувач	2	Реактор стал. об'ємом 25 л («Єврохіммаш», Україна) з паровою сорочкою та лопатевою мішалкою. Діаметр – 0,35 м, висота – 0,65 м, споживана потужність – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [47].
P-14	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий об'ємом 10 л («Єврохіммаш», Україна) з паровою сорочкою та лопатевою мішалкою. Діаметр – 0,25 м, висота – 0,5 м, споживана потужність – 0,75 кВт частота обертання мішалки – 100 об/хв [47].
ПА-16	Апарат посівний	1	Ферментер об'ємом 300 л («Solaris Biotech», Італія) з нержав. сталі з барботером, перемішуючим пристроєм, паровою сорочкою, ротаметром, датчиками рН і температури [45].
ДЗ-17	Дозатор об'ємно-ваговий	1	Дозатор ДВ-06 («Артмаш», Україна). Границі дозування – від 200 г до 50 кг, гарантована точність зважування – 1 кг, дискретність – 0,005 г [48].
ДЗ-18 ДЗ-23	Дозатор об'ємно-ваговий	2	Дозатор автоматичний АД-500-2БП («Український завод вагів», Україна). Границі дозування – від 60 до 500 кг, споживана потужність – 0,3 кВт, похибка дозування – 1 %, дискретність – 0,2 кг [49].
P-20	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий об'ємом 6,3 м ³ («Єврохіммаш», Україна) з паровою сорочкою та лопатевою мішалкою. Діаметр – 1,8 м, висота – 6,0 м, споживана потужність – 7,5 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [47].
Н-21	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий («Vaterpass», Україна). Робочий тиск – до 7 бар, максимальна продуктивність – до 100 м ³ /год [50].

УБС-22	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації з продуктивністю 5 м ³ /год («Bioengineering AG», Швейцарія) [51].
--------	-------------------------------------	---	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Закінчення табл. 5.1

P-25	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий об'ємом 630 л («Єврохіммаш», Україна) з лопатевою мішалкою та паровою сорочкою. Діаметр – 0,9 м, висота – 2,79 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв, споживана потужність – 2,2 кВт [47].
H-26	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний PTL17 («Гарфло», Швеція). Тиск на виході – до 4 бар, частота обертання – 100 об/хв, продуктивність – 648 л/год [52]
Фр-28	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 10 м ³ («Solaris Biotech», Італія) з нержавіючої сталі з барботером, перемішувачем, ротаметром, паровою сорочкою, датчиками рН і температури [45].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ НІЗИНУ

В технологічній схемі виробництва нізину культивуванням *Lactococcus lactis* LD2 наявні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря для аерації, приготування титрувальних розчинів, підживлювального розчину глюкози та приготування і стерилізація поживних середовищ) і технологічний процес (виробничий синтез нізину та отримання посівного матеріалу). Технологічна та апаратурна схеми процесу виробництва нізину наведені на графічній частині роботи.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1. Підготовка мийних та дезінфекційних засобів

ДР 1.1.1. Приготування 2% розчину каустичної соди

У переносну ємність для приготування мийних розчинів об'ємом 12 л вносять 200 г каустичної соди зваженої на технічних вагах і доливають питну воду для досягнення об'єму 10 л, розчин перемішують та одержують готовий до застосування 2% робочий розчин Каустичної соди.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину засобу «Полідез»

У переносну ємність для приготування мийних та дезінфекційних розчинів об'ємом 12 л вносять 240 мл «Полідез» і доливають питну воду температурою (30-40 °С) для досягнення об'єму 10 л, розчин перемішують та одержують готовий до застосування 0,5 % робочий розчин Полідезу.

ДР 1.1.3. Приготування робочого розчину засобу «Ексан Про Дез»

У переносну ємність для приготування мийних та дезінфекційних розчинів об'ємом 12 л вносять 160 мл «Ексан Про Дез» і доливають питну воду температурою (30-40 °С) для досягнення об'єму 10 л, розчин перемішують та одержують готовий до застосування 1,5 % робочий розчин Ексан про дез.

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ					
Зм	Арк.	№	Підпи	Ла	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
Розробн	Синяк А І							Літер	Аркв	Арквшів
Керівник	Карпаш Ю.								48	92
Н. контр								Кафедра БТМ ⁴⁸		
Консульт										
Зав.	Стабніков									

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

До початку роботи працівники повинні пройти санітарно-гігієнічну підготовку: миття рук господарським або туалетним милом та дезінфекцію 76%-им етиловим спиртом. Також обов'язковою умовою є наявність медичного халату та шапочки.

ДР1.2.1. Генеральне прибирання

1 раз на місяць проводять генеральне прибирання, для прибирання витрата готового дезінфекційного розчину становить 200 мл/м².

ДР1.2.2. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання приміщень відбувається способом протирання поверхні з використанням мийних розчинів розчинів (*від ДР 1.1.2, ДР 1.1.3*) прибирання проводиться 1 раз на добу, витрата розчинів становить 100 мл/м².

ДР1.3. Підготовка обладнання

ДР1.3.1. Миття обладнання

Миття обладнання проводять вручну, при використанні 2 % розчину каустичної соди (*від ДР 1.1.1*). Температура миючого засобу 70-80 °С.

ДР1.3.2. Технічний огляд обладнання

Після етапу миття, обладнання проходить технічний огляд, який складається з: *загального технічного огляду, перевірки на герметичність, пробного пуску, налаштування параметрів.*

ДР1.3.3. Перевірка на герметичність

Під час даної стадії в першу чергу проводять перевірку інокуляторів, посівних апаратів та основного ферментера. Для цього у апарат, де герметично затягнута вся арматура, починає подаватись аераційне повітря до набору надлишкового тиску у 0,1-0,2-МПа. Надалі прохід повітря перекривається та фіксуються покази манометра продовж 40-60 хв. За умови, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа – апарат є герметичним. Якщо дані показники перепаду тиску перевищує 0,01 МПа проводять перевірку і шукають місце розгерметизації за допомогою метода омилення: на місця опорних з'єднань апарату наносять мильний розчин та очікують певний проміжок часу, у місцях розгерметизації

виникають невеликого розміру бульбашки, операція займає 30-40 хв. Якщо знаходиться місце розгерметизації, то його затягують з'єднувальною арматурою. За потреби операцію повторюють, якщо це не дало бажаних результатів то замінюють прокладки з'єднань.

ДР 1.3.4 Стерилізація

Після проходження всіх перевірок обладнання стерилізують подачею гострої пари в апарат за температури 131 °С, упродовж 1,5 год.

ДР 2. Підготовка повітря для аерації під час вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу

ДР 2.1. Забір повітря

Атмосферне повітря забирають на висоті 17 м за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (ПЗ-1).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря

Далі повітря проходить через фільтр грубого очищення (ФГО-2), для відокремлення великих часток пилу й бруду розміром до 1 мкм, ступінь очищення повітря становить 90% після проходження фільтру.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Після грубого очищення, повітря надходить до в компресор (К-3) для стиснення до тиску 2,5 МПа з збільшенням температури повітря до 150 °С.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Після стиснення повітря, необхідно видалити з нього надлишкову вологу, тому воно подається до теплообмінника (Т-4) де відбувається процес охолодження до 15 °С з подальшим направленням до ресиверу (Рс-5) де видаляється зайва волога ($W=60\%$) і зменшуються пульсації тиску від роботи компресора.

ДР 2.5. Нагрів повітря

З метою зменшення ймовірності утворення конденсату на головному фільтрі та індивідуальних фільтрах, що встановлені безпосередньо на ферментаційній апаратурі, повітря подають до теплообмінника (Т-6), де його нагрівають до 30 - 40 °С.

ДР 2.6. Тонке очищення повітря на головному фільтрі

Далі нагріте повітря проходить через головний фільтр очищення (ФТО-7), де ступінь очищення має бути не менше $E=95\%$.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

До початку аерації поживного середовища повітря пропускають через фільтри індивідуального очищення (ІФ-9, ІФ-15, ІФ-27) з метою досягнення ступеня очищення $E=99,995\%$.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів для зміни рівня рН поживного середовища

ДР 3.1. Приготування 6% розчину хлоридної кислоти

На стадії отримання посівного матеріалу необхідно приготувати 386 мл 6 % розчину хлоридної кислоти, для цього в колбу об'ємом 1 л наливають 322 мл питної води та при постійному перемішуванні вносять 64 мл 36%-ї хлоридної кислоти, яка попередньо відміряна мірним циліндром.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6-% розчину гідроксиду натрію

На стадії отримання посівного матеріалу необхідно приготувати 386 мл 6% розчину гідроксиду натрію. За допомогою технічних ваг формують наважку кристалічного їдкого натру, масою 23 г, отриману наважку вносять в колбу об'ємом 1 л та вносять 386 мл води питної. Вміст колби розчиняють та після повного розчинення їдкого натрію дану колбу закривають ватно-марлевым корком й поміщають в автоклав де проводять стерилізацію впродовж 50 хв, при 131°C (0,15 МПа).

ДР 4. Приготування підживлювального розчину глюкози

ДР 4.1. Приготування та стерилізація підживлювального розчину глюкози

На виробничий біосинтез потрібно приготування 64 л 50 % розчину глюкози. В реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-25) за допомогою об'ємно-вагового дозатора (ДЗ-23) вносять 32 кг глюкози та за допомогою лічильника (Д-

24) додають 32 л води. Для повного розчинення глюкози в сорочку реактора подають глуху пару, нагріваючи розчин до 40 °С при постійному перемішуванні (50 об/хв). Після розчинення глюкози, за допомогою гострої пари проводять стерилізацію при тиску 0,05 МПа (112 °С) впродовж 30 хв.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах на качалці

При отриманні посівного матеріалу в колбах на качалці необхідно приготувати 1,53 л поживного середовища. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1,53 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	23	35,19	А	0,815
Дріжджовий екстракт	24,1	36,87		
Пептон	28,6	43,76		
Вода		700 (мл)	Б	0,21
NaCl	5,9	9,03		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2	0,31		
Вода		200 (мл)	В	0,505
КН ₂ РО ₄	10	15,3		
Вода		490 (мл)		

ДР 5.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 35,19 г глюкози, 24,1 г дріжджового екстракту та 43,76 г пептону, зважені компоненти поміщають в колбу об'ємом 1,5 л та додають попередньо відміряну за допомогою мірного циліндра питну

воду в кількості 700 мл. Вміст колби перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевым корком і поміщають в автоклав, де на протязі 30 хв проводиться стерилізація при 112 °С (0,05 МПа).

ДР 5.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 9,03 г хлориду натрію та 0,31 г сульфату магнію, зважені компоненти додають в колбу об'ємом 0,5 л та вносять попередньо відміряну за допомогою мірного циліндра питну воду в кількості 200 мл. Вміст колби перемішується до повного розчинення, закривається ватно-марлевым корком і поміщається в автоклав, де на протязі 50 хв проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа).

ДР 5.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах важать 15,3 г монофосфату калію, зважений компонент додають у колбу об'ємом 2 л та вносять попередньо відміряну за допомогою мірного циліндра питну воду в кількості 490 мл. Вміст колби перемішується до повного розчинення, далі закривається ватно-марлевым корком і розміщується в автоклаві, де протягом 50 хв проводять стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа).

ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Під час отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л потрібно приготувати 16,85 л поживного середовища, оскільки стерилізація буде відбуватись гострою парою, то потрібно необхідно зменшити кількість внесеної води із-за утворення конденсату (10%). Тому кількість води, що необхідна для приготування поживного середовища становитиме 13,9 л. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 16,85 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	23	387,55	А	7,3
Дріжджовий екстракт	24,1	406,09		
Пептон	28,6	481,91		
Вода		6 (л)		
Конденсат		0,6 (л)		0,6
NaCl	5,9	99,42	Б	8,15
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,2	3,37		
KH ₂ PO ₄	10	168,5		
Вода		7,9 (л)		
Конденсат		0,8 (л)		0,8

ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 387,55 г глюкози, 406,09 г дріжджового екстракту та 481,91 г пептону, зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-8) та вносять 6 л питної води. В сорочку реактора подають глуху пару, нагріваючи до 50 °С, та вмикають перемішувач (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, і на протязі 30 хв проводять стерилізацію гострою парою при 112 °С (0,05 МПа).

ДР 5.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 99,42 г хлориду натрію, 3,37 г сульфату магнію та 168,5 г монофосфату калію, зважені компоненти переносять в колбу об'ємом 2 л та додають попередньо відміряну за допомогою мірного циліндра питну воду в кількості 1,4 л. Вміст колби перемішують до повного розчинення,

після розчинення солей розчин подають в інокулятор об'ємом 30 л (I-10), через лічильник подають 6,5 л питної води та вносять 6 % розчин хлоридної кислоти для зменшення рівня рН до 4,0 (від ДР 3.1), вмикається перемішувач (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, і на протязі 50 хв проводиться стерилізація гострою парою при 131 °С (0,15 МПа).

ДР 5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 300 л

При отриманні посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 300 л необхідно приготувати 176,3 л поживного середовища, оскільки стерилізація буде відбуватись гострою парою, належить зменшити кількість внесеної води із-за утворення конденсату (10%). Тому кількість води, що необхідна для приготування поживного середовища становитиме 145 л. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.3.

Поділ компонентів на композиції для стерилізації поживного середовища на стадію вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 300 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 176,3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Глюкоза	23	4 054,9	А	36,3
Дріжджовий екстракт	24,1	4 248,8		
Пептон	28,6	5 042,2		
Вода		23 (л)		
Конденсат		2,3 (л)		2,3
NaCl	5,9	1 040,2	Б	125,5
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2	35,26		
KH ₂ PO ₄	10	1 763		
Вода		122 (л)		
Конденсат		12 (л)		12,2

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 4 054,9 г глюкози, 4 248,8 г дріжджового екстракту та 5 042,2 г пептону, зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 40 л (Р-12) та за допомогою лічильника (Д-11) вносять 23 л питної води. В сорочку реактора подають глуху пару, нагріваючи до 50 °С, і вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, та на протязі 30 хв проводять процес стерилізації гострою парою при 112 °С (0,05 МПа).

ДР 5.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1 040,2 г хлориду натрію, 35,26 г сульфату магнію та 1 763 г монофосфату калію, зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-14) та за допомогою лічильника (Д-13) вносять 7 л питної води. В сорочку реактора подають глуху пару, нагріваючи до 50 °С, та вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв), після розчинення солей розчин подають в посівний апарат об'ємом 300 л (ПА-16), через лічильник подають 110 л питної води та вносять 6 % розчин хлоридної кислоти для зменшення рівня рН до 4,0 (від ДР 3.1), вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для рівномірного розподілу компонентів, та на протязі 50 хв проводять стерилізацію гострою парою при 131 °С (0,15 МПа).

ДР 5.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу нізину в ферментері об'ємом 10 м³

Під час синтезу нізину в ферментері об'ємом 10 м³ потрібно приготувати 5559 л поживного середовища, оскільки стерилізація буде відбуватись гострою парою в установці безперервної стерилізації (УБС-22), також необхідно зменшити кількість внесеної води через утворення конденсату (20%). Тому кількість води, що необхідна для приготування поживного середовища становитиме 4 335 л. Поділ компонентів на композиції та їх кількісний вміст наведено в табл. 6.4.

Поділ компонентів на композицій для стерилізації поживного середовища на стадію виробничого біосинтезу нізину в ферментері об'ємом 10 м³

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5 559 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, м ³
Глюкоза	6	33,35	А	4,756
Дріжджовий екстракт	24,1	135,522		
Пептон	28,6	160,826		
NaCl	5,9	33,178		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2	1,125		
КН ₂ РО ₄	10	56,233		
Вода		4,335 (м ³)		
Конденсат		867 (л)		0,867
Підживлюючий розчин	500	32		64
Всього				5 623

ДР 5.4.1. Приготування композиції А

Об'ємно-ваговими дозаторами (ДЗ-17, ДЗ-18) зважують 33,74 кг глюкози, 160,826 кг пептону, 135,522 кг дріжджового екстракту, 33,178 кг хлориду натрію, 1,125 кг сульфату магнію та 56,233 кг монофосфату калію, зважені компоненти поміщають в реактор об'ємом 6,3 м³ (Р-20) та за допомогою лічильника (Д-19) вносять 4,335 м³ питної води. Задля повного розчинення компонентів, вмикається перемішувач, та в сорочку реактора подають глуху пару нагріваючи розчин до температури 50 °С.

ДР 5.4.2. Стерилізація композиції А

Приготований розчин компонентів (від ДР 5.4.1) відцентровим насосом (Н-21) подають в установку безперервної стерилізації (УБС-22) в якій відбувається стерилізація поживного середовища гострою парою протягом 5 хв при 131 °С (0,15 МПа).

ТП 6. Отримання посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційна культура *Lactococcus lactis* LD2 зберігається на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) за температури 5 °С. Кожні 4 місяці проводиться пересів культури в суворо асептичних умовах.

ТП 6.2. Отримання робочої культури

Задля отримання ізолюваних колоній в суворо асептичних умовах, бактеріологічною петлею культуру *L. lactis* LD2 розсівають методом виснажувального штриха на чашки Петрі з агаризованим м'ясо-пептонним середовищем. Чашки Петрі ставлять в термостат, інкубують протягом 12 год при 37 °С.

ТП 6.3. Отримання посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах

Ізолювані колонії, (від ТП 6.2), в суворо асептичних умовах, пересіваються бактеріологічною петлею у пробірки з агаризованим м'ясо-пептонним середовищем (для засіву однієї пробірки використовується одна ізолювана колонія). Для пересіву відбираються колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Інкубують в термостаті при 37 °С протягом 12 год.

ТП 6.4. Отримання посівного матеріалу в колбах на качалці

В асептичних умовах до колби із стерильною композицією вносяться стерильні композиції А (від ДР 5.1.1) Б (від ДР 5.1.2) вміст колби перемішується для рівномірного розподілу компонентів та розливається по 127 мл в дванадцять стерильних качалочних колб об'ємом по 750 мл. В асептичних умовах до пробірки з робочою культурою *L. lactis* LD2 вносять 5 мл фізіологічного розчину для суспендування клітин. Отриману суспензію за допомогою піпетки вносять у колбу з одержаним стерильним поживним середовищем, для однієї колби використовують суспензію одержану з однієї пробірки.

Посівний матеріал вирощується в колбах на качалці (150 об/хв) впродовж 12 год при 37 °С. Після завершення культивування, відбирається проба для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси

($C_{\text{біомаси}} = 3,25$ г/л). Отриманий посівний матеріал з 12 колб в асептичних умовах об'єднують в одній стерильній засівній колбі об'ємом 2 л.

ТП 6.5. Отримання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В асептичних умовах в інокулятор об'ємом 30 л з стерильною композицією Б, самоплином вносять стерильну композицію А (від ДР 5.2.1) та 6 % розчин гідроксиду натрію для збільшення рівня рН до 6,8 (від ДР 3.2), помістивши компоненти поживного середовища вмикають перемішуючий пристрій задля рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вноситься посівний матеріал (від ТП 6.4).

Посівний матеріал вирощують в інокуляторі протягом 12 год при 37 °С, при постійному перемішуванні (150 об/хв) та зі швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 1 л/(л·хв). Протягом культивування кожні 4 год, а також після завершенню культивування, відбирається проба для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}} = 3,25$ г/л).

ТП 6.6. Отримання посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 300 л

До посівного апарату об'ємом 300 л з стерильною композицією Б вносять стерильну композицію А (від ДР 5.3.1) та 6 % розчин гідроксиду натрію для збільшення рівня рН до 6,8 (від ДР 3.2), помістивши компоненти поживного середовища вмикається перемішуючий пристрій для рівномірного розподілу компонентів. Після перемішування вносять посівний матеріал (від ТП 6.5).

Посівний матеріал вирощують в посівному апараті протягом 12 год при 37 °С, за постійного перемішування (150 об/хв) та зі швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 1 л/(л·хв). Протягом культивування кожні 4 год, а також після завершенню культивування відбирається проба для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}} = 3,25$ г/л).

ТП 7. Виробничий синтез нізину

ТП 7.1. Виробничий біосинтез нізину в ферментері об'ємом 10 м³

В ферментер об'ємом 10 м³ (Фр-28) з установки безперервної стерилізації подають стерильну композицію А (від ДР 5.4.2). Після внесення композиції при допомозі труби перетискування вноситься посівний матеріал (від ТП 6.6).

Під час виробничого синтезу починаючи з 5 години культивування через кожні 4 год вносять стерильний підживлювальний розчин глюкози (від ДР 4.1).

Вирощування *L. lactis* LD2 відбувається до досягнення кінцевої концентрації біомаси (6,5 г/л) та концентрації нізину (15 367 Од/мл), впродовж 21 год при температурі 37 °С за постійного перемішування (150 об/хв) та зі швидкістю подачі стерильного аераційного повітря 1 л/(л·хв).

Протягом виробничого синтезу кожні 7 год, а також після завершення культивування, відбираються проби культуральної рідини для визначення концентрації джерел вуглецю та азоту, нізину та біомаси для проведення мікробіологічного контролю.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю виробництва

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю біосинтезу нізину

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
Кх, Кт 1.1.1. Приготування робочого розчину каустичної соди	Розчин каустичної соди Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2%
Кх 1.1.2. Приготування робочого розчину Полідез	Розчин Полідез Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 0,5%
Кх 1.1.3. Приготування робочого розчину Ексан Про Дез	Розчин Ексан Про Дез Концентрація	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 1,5%
Кх, 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень	Підлога, зовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кх, Км 1.2.2. Геренальне прибирання приміщень	Підлога, стіни, двері, вікна, зовні апаратура. Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду КУО < 300/см ²
Кт 1.3.1. Миття та технічний огляд обладнання	Мийний розчин , обладнання, температура розчину, тривалість, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	t = 70°C, τ = 1 год
Кт 1.3.3. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,2 МПа, τ = 30 хв

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ							
Зм	Арк.	№	Підпи	Да	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА			Літер	Аркв	Арквшів		
Розробн	Синяк А І									62	92 62	
Керівник	Каппаш Ю							Кафедра БТМ				
Н. контр												
Консульт												
Зав.	Стабніков											

Продовження табл. 7.1

Кт 1.3.4. Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$P = 0,2 \text{ МПа}$, $t = 131^\circ\text{C}$, $\tau = 1,5 \text{ год}$
Кт 1.1 Забір атмосферного повітря	Повітрозабірник Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	$H = 17 \text{ м}$
Кт 1.2 Очистка від грубих домішок	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	$E = 90\%$
Кт 1.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	$P = 0,35-0,5 \text{ МПа}$, $t = 120-250^\circ\text{C}$
Кт 1.4 Охолодження і видалення зайвої вологи	Охоложене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	$t = 25-35^\circ\text{C}$, $W = 60\%$
Кт 1.4 Охолодження і видалення зайвої вологи	Охоложене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	$t = 25-35^\circ\text{C}$, $W = 60\%$
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	$t = 40-50^\circ\text{C}$, $W = 50\%$
Кт 1.6 Очищення у головному фільтрі	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	$E = 95\%$
Кт, Км 1.7 Очищення в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	$E = 99,999\%$, $KУО \leq 1$
Кт, Кх, Км 3.1 Приготування розчину соляної кислоти для виробничого біосинтезу	Розчин соляної кислоти Концентрація, стерильність	Фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Визначення концентрації та проведення мікробіологічного контролю проходить після приготування розчину	$C = 6\%$, відсутність мікробіоти

<p>Кт, Кх, Км 3.2. <i>Приготування і стерилізація розчину натрію гідроксиду для виробничого біосинтезу</i></p>	<p>Розчин натрію гідроксиду Тиск, температура, час, концентрація, стерильність</p>	<p>Манометр, температура, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, температура, тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15$ МПа, $t = 131$ °С, $\tau = 40$ хв, $C = 6\%$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Кх, Км 4.1. <i>Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози</i></p>	<p>Підживлювальний розчин глюкози Тиск, температура, час, концентрація, стерильність</p>	<p>Манометр, температура, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль</p>	<p>Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, температура, тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,05$ МПа, $t = 112$ °С, $\tau = 30$ хв, $C = 50\%$, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вироцуння інокуляту у колбах на качалках</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,1$ МПа, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти</p>

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 5.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i></p>	<p>Композиція В Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.2.1, 5.3.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 і посівному апараті об'ємом 300 л</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура, тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.2.2, 5.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температура, тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,1 МПа, t = 121 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.4.1, 5.4.2 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері 10 м³</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А в УВС</i></p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти</p>

Кт, Км 6.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Lactococcus lactis</i> LD2 температура, мік- робиологічна чистота	Холодильник, мікробіологічний контроль	Температура – безперервно при зберіганні, мік- робиологічний контроль – кожні 3-4 місяці	$t = 2 - 4 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 3 - 4$ місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Lactococcus lactis</i> LD2 на чашках Петрі температура, мік- робиологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 12$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 <i>Вирощування культури на щільному середовищі</i>	Робоча культура <i>Lactococcus lactis</i> LD2 у пробірках температура, мікробіологічна чистота	Термостат, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 12$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.4 <i>Вирощування культури у колбах на качалках</i>	Посівний матеріал температура, час, рН, швидкість перемішування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рН і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 12$ год, $w = 150$ об/хв, $\text{pH} = 6,8-7,0$ $\text{Cб} = 3,25$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.5, 6.6 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л та посівному апараті об'ємом 300 л</i>	Посівний матеріал Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО ₂ , ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і	$t = 37 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\tau = 12$ год, $\text{pH} = 6,8 - 7,0$, $\text{pO}_2 = 20 - 30\%$, $w = 150$ об/хв $\text{Cб} = 3,25$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

			мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування	
Кт, Км, Кх 7.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 м ³	Культуральна рідина Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, концентрація нізину мікробіологічна чистота	Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО ₂ , ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль	Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси, нізину і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування	t = 37 °С, τ = 12 год, рН = 6,8 – 7,0, рО ₂ = 20 – 30%, w = 150 об/хв Сб = 3,25 г/л, Сн = 15367 Од/мл, відсутність сторонньої мікробіоти

7.2. Мікробіологічний контроль

Санітарні умови виробництва в біотехнологічній промисловості визначають якість, а у певних випадках й придатність та безпечність продукції. Мікробіологічний контроль на різних етапах виробничого процесу дає змогу відслідкувати санітарний стан виробництва та, за потреби, коригувати заходи з підтримання належного рівня чистоти [53].

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом висіву зразка на чашку Петрі методом виснажувального штриха та мікроскопіюванням. Для аналізу мікробіологічної чистоти культуральну рідину розсівають на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром задля виявлення бактерій (інкубують протягом 1 доби за температури 37 °С), на чашки з сусло–агаром для виявлення дріжджів і грибів (інкубують упродовж 7 діб за температури 30 °С). Біологічний агент *Lactococcus lactis* LD2 утворює гладенькі опуклі блискучі колонії сірого кольору [54].

Мікроскопіювання здійснюють з використанням препарату «роздавлена крапля» наступним чином: на знежирене предметне скельце наносять краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем та мікроскопіюють, використовуючи об'єктив зі збільшенням 40х. Клітини *Lactococcus lactis* LD2 –

сферичної або еліптичної форми розмірами 0,5-1,2 * 0,5-1,5 мкм; можуть бути розміщені поодиноці, парами або короткими ланцюжками; грампозитивні, нерухливі, спор і капсул не утворюють [54].

Також здійснюється контроль стерильності поживного середовища: відбирається проба простерилізованого поживного середовища об'ємом 20 мл, висівається 0,1 мл з цієї кількості на чашки Петрі з сусло-агаром (СА) – задля виявлення грибів та дріжджів, з м'ясо-пептонним агаром (МПА) – задля виявлення бактерій. Чашки з посівами загортаються у папір і поміщаються у термостат для інкубації при температурі 37 °С впродовж 1 доби (чашки з МПА) та за 30 °С протягом 5 діб (чашки з СА). На поверхні поживних середовищ не має бути виявлено ознак росту будь-яких мікроорганізмів [54].

7.3. Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Джерелом вуглецю у поживному середовищі є глюкоза. Концентрацію глюкози вимірюють глюкозооксидазним методом, який полягає в окисненні глюкози глюкозооксидазою з утворенням пероксиду водню, який, у свою чергу, окиснює ортотолуїдин з утворенням забарвленої сполуки, оптичну густину якої визначають на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 625 нм. Для аналізу використовують супернатант, отриманий після центрифугування проби культуральної рідини об'ємом 20 мл за 10000 g протягом 10 хв. Після визначення оптичної густини забарвленого розчину визначають концентрацію глюкози за калібрувальним графіком, побудованим за стандартними розчинами глюкози [55].

Джерелами азоту в поживному середовищі є дріжджовий екстракт і пептон. Азот у цих компонентах в основному представлений у вигляді амінокислот – амінного азоту. Метод, заснований на декарбоксилюванні амінокислот з нінгідрином, є доволі точним, оскільки, на відміну від більшості методів не залежить від вмісту в суслі пептидів. Нінгідрин окислює - амінокислоти при рН 2,5 до діоксиду вуглецю, альдегіду, аміаку. Вміст амінного азоту розраховується за кількістю діоксиду вуглецю, що виділяється.

У реакційну колбу (1) послідовно додають 30 см³ супернатанту, 600 мг буферного цитратного розчину (рН 2,5) та одну краплю піногасника. Для видалення діоксиду вуглецю, який міститься в цій суміші, колбу витримують 10 хв на киплячій водяній бані, струшуючи колбу кожні 2 хв. Надалі колба переноситься у водяну баню з температурою 0 °С, витримується 5 хв і вноситься до неї 1-1,5 г нінгідрину [56].

В іншу колбу (2) наливається 25 см³ 0,1 зв. розчину гідроксиду барію, закривається колба шліфованою пробкою, надалі колби з'єднують трубками. Колбу з реакційною сумішшю ставиться на киплячу водяну баню і включається мембранний насос. Після початку фарбування суміші витримується колба в лазні 20 хв, потім знімаються трубки і вимикається насос.

Діоксид вуглецю, який виділяється в результаті окислення α -амінокислот і кількісно еквівалентний амінному азоту сусли, в колбі (1) вступає в реакцію з гідроксидом барію. Методом зворотного титрування гідроксиду барію, що залишився, розраховується кількість α -амінного азоту [43].

Плоскодонну колбу місткістю 300 см³ переливають вміст колби (1). Дану колбу обполіскують дистильованою водою, звільненої від діоксиду вуглецю. Невикористаний гідроксид барію відтитровується 0,1 н. розчином НСІ, використовуючи як індикатор фенолфталеїн [56].

Вміст амінного азоту в середовищі (А, мг/дм³):

$$A = \frac{(a - b - c) \cdot 700}{g} - e$$

де а – обсяг 0,1 н. розчину НСІ, що пішов на титрування 25 см³ 0,1 н. розчину гідроксиду барію, см³; b – обсяг 0,1 зв. розчину НСІ щодо поправки на реактиви, см³; с – обсяг 0,1 зв. розчину НСІ, що пішов на зворотне титрування, см³; g - обсяг проби, см³; e – кількість азоту аспарагінової кислоти, мг/см³.

7.4. Визначення концентрації цільового продукту

Концентрацію нізину визначають наступним чином: відбирають пробу культуральної рідини об'ємом 0,5 мл, центрифугують за 8000 g на протязі 5 хв

для відділення біомаси. Отриманий супернатант поміщають у пробірку, в яку згодом додають 0,5 мл 0,02 М розчину хлоридної кислоти. Паралельно з цим, готують поживне середовище для висіву: до 26 мл розплавленого м'ясо-пептонного агару додають 0,4 мл Твіну-20; отримане поживне середовище охолоджують до температури 45 °С, після чого в нього вносять культуру *Micrococcus flavus* в кількості 1 % від об'єму суміші; засіяне середовище розливають у чашки Петрі. Після застигання поживних середовищ у кожній чашці Петрі пробурюють 8 лунок діаметром 7 мм. У кожен з лунок вносять 0,08 мл підкисленого супернатанту з пробірки, після чого чашки Петрі поміщають у термостат та інкубують за 30 °С протягом 24 год. Після інкубації вимірюють діаметр зон пригнічення росту культури *M. flavus* навколо лунок. Далі визначають активність нізину за калібрувальним графіком залежності активності нізину від діаметра зони пригнічення росту, побудованим за стандартними розчинами нізину концентрацією від 25 до 200 МО/мл. За отриманим значенням активності нізину обчислюють його концентрацію, виходячи з того, що 1 МО активності відповідає 0,025 мкг нізину [57].

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Технологія одержання нізину *Lactococcus lactis* LD2 включає доферментаційні допоміжні роботи:

- 1) санітарну підготовку виробництва;
- 2) стерилізацію обладнання та комунікацій;
- 3) підготовку стерильного аераційного повітря;
- 4) приготування і стерилізація титрувальних агентів;
- 5) приготування та стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу;
- 6) приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу нізину;

ферментаційні технологічні процеси:

- 1) підготовка посівного матеріалу;
- 2) виробничий біосинтез нізину.

Доферментаційні допоміжні роботи

Санітарна підготовка виробництва

Даний етап – місце емісії рідких відходів. Під час генерального і щоденного прибирань приміщень застосовують такі дезінфекційні та мийні засоби як каустична сода та «Ексан Про Дез». Миття резервуарів обладнання проводиться за допомогою СІР-мийки та застосуванні мийного засобу Полідез. Відпрацьовані дезінфекуючі та мийні засоби, промивна вода зливають у каналізацію.

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№	Підпи	Да					
Розробн		<i>Синяк А. І.</i>			РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літер	Аркв	Арквшів	
Керівник		<i>Каплай Ю.</i>					72	92	
Н. контр									71
Консульт							Кафедра БТМ		
Зав		<i>Стабніков</i>							

Приготування і стерилізація титрувальних агентів

Даним етапом передбачено приготування 6%-го розчину соляної кислоти, приготування та стерилізацію 6%-го розчину натрію гідроксиду. Розчин соляної кислоти подається задля підкислення середовища (рН 4,0-4,5) в інокулятор та посівний апарат перед його стерилізацією, а розчин натрію гідроксиду – задля підлужнення середовища (рН 6,8-7,0) під час отримання посівного матеріалу в інокуляторі та посівному апараті, тому що процес ферментації має проходити за нейтрального значення рН (7,0) [4]. Оскільки на цьому етапі виробництва рідкі відходи можуть утворюватися тільки при умові невідповідності титрувальних розчинів рівням асептики та нормативним показникам, тому *відходи титрувальних агентів у загальному об'ємі рідких відходів не враховуються.*

Приготування та стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу нізину

Цей етап – можливе місце емісії твердих відходів. Можливим на цьому етапі є невідповідність сировини нормативним показникам. У цьому випадку проводиться відбракування. Тому відходи можуть бути у якості пакувальних матеріалів різних видів сировини для приготування поживних середовищ.

Ферментаційні технологічні процеси

Підготовка посівного матеріалу

Оскільки продуцент нізину – *L. lactis* LD2 є факультативним анаеробом, то постає необхідність у безперервній подачі стерильного повітря в процесі біосинтезу. Того, під час культивування *L. lactis* LD2 утворюються достатньо великі об'єми відпрацьованого повітря. *Цей етап – місце емісії газоповітряних відходів.*

Відходи від посівного матеріалу не враховуються, оскільки при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі на посівному апараті, він безпосередньо направляється до виробничого ферментера.

Виробничий біосинтез нізину

Під час виробничого біосинтезу залишається необхідність у безперервній подачі стерильного повітря. Через це на даному етапі на виході із ферментера утворюються великі об'єми відпрацьованого повітря. *Цей етап – місце емісії газоповітряних відходів.*

Основною метою виробничого біосинтезу є отримання культуральної рідини, компонентом якої є антибіотик нізін. Пізніше від ферментера культуральна рідина направляєється до спеціального збірника, тому *рідкі відходи на цьому етапі не враховуються.*

8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Виробництво нізину здійснюється протягом 90 днів (3 місяці). З ціллю забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня, тобто 90 разів. Так само, раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (оброблюються підлога, вікна, стіни, тощо), себто 3 рази. Обладнання обробляється розчинами каустичної соди (2%) та Полідезу (0,5%), кількості робочих розчинів за весь період виробництва яких складають по 1 л кожен. Для обробки підлоги, вікон, стін та дверей використовуються робочі розчини «Ексан Про Дез» (1,5%), кількість за весь період виробництва якого складає відповідно 0,15 л. Узагальнена характеристика рідких відходів наведена у табл. 8.1.

Характеристика рідких відходів виробництва нізину

Назва рідких відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
2% розчин каустичної соди	Каустична сода – NaOH	1	II
0,3% розчин Полідез	Полігексаметиленгуанідин гідрохлорид, алкілдиметилбензиламоній хлорид, допоміжні компоненти – лужний компонент в перерахунку на гідроксид натрію, барвник, ароматизатор і вода	1	IV
0,5 % розчин «Ексан Про Дез»	ПАР, гліцерин, ізопропанол, антимікробна добавка, віддушка	0,15	IV
	Усього:	2,15	

З метою зменшення об'ємів мийних та дезінфікуючих розчинів, які зливаються після проведення санітарної підготовки виробництва у каналізацію, рекомендують до застосування СІР-мийку. Завдяки даній технології процес миття проходить у десятки разів швидше, а також є можливість повторного використання мийних та дезінфікуючих розчинів після їх фільтрування.

Для утилізації стічних вод виробництва нізину пропонується використати УЗВ-фітореактор SBR-BIOPLATO, який працює наступним чином. Вода на SBR-фітоочищення подається по трубопроводу 1 в приймальну камеру 2, в якій акумулюється і усереднюється протягом певного періоду, а за допомогою проціджувача 3 вилучається сміття та грубі (по гранулометричному складу) покидьки і адсорбовані домішки. Включенням насосного агрегату 4, вода, акумульована і усереднена за певний період часу, подається на очищення в одну із двох паралельних технологічних ліній SBR-фітоочищення (А або Б) шляхом відповідного переключення регулятора подачі 5, який приводиться в дію системою з процесорним управлінням 6. Вода потрапляє у аеротенк-біофлотатор 7, в якому за рахунок інтенсивного газонасичення за допомогою системи аерації

8 активно проходить процес флотації гідрофобних частинок забруднень з утворенням флотаційного шару.

Саме за рахунок процесу флотації провадиться процес підвищення редокс-потенціалу води, що сприяє зв'язуванню та переведенню у зважений стан розчинених синтетичних та великої кількості органічних забруднювачів. До флотошламу, що збирається у верхній частині аеротенкабіофлотатора, надходить осад з освітлювача по транспортному трубопроводу 11 і по П- подібному регенераційному трубопроводу автоматичного відведення промивної води і осаду 14. До такого комплексного флотошламу додається розчин мікроорганізмів-ензимів з бокс-дозатора 9 за допомогою розпилювача введення розчину біодеструктора 10 по поверхні його поверхні.

Склад мікроорганізмів біодеструкторів-ензимів підібраний таким чином, що здатен розкласти органічні та синтетичні складові забруднень шляхом мікробного синтезу. Результатом біологічних реакцій є знезараження флотошламу від найпростіших, умовно-патогенної і патогенної мікрофлори. Крім того, проходить процес ферментації, за рахунок чого підвищується біологічна цінність елементів, перетворюючи їх в біомінеральне добриво за рахунок біохімічних, структурних і мікробіологічних перетворень. Мінералізований, знезаражений флотошламу відводиться відповідним пристроєм 12. Він нездатний до пептизації, але придатний для використання у вигляді добрива для вирощування технічних культур.

Із аеротенкабіофлотатора, частково очищена вода по з'єднувальному трубопроводу 13 надходить в прояснювач 15. Періодично до води додається регенераційний потік водо-осадової промивної суміші по трубопроводу 14 з фільтра 32, за рахунок чого вода збагачується дисперсносорбційною системою, провадиться зростання її редокс-потенціалу. В прояснювачі 15 за допомогою системою аерації 16 провадиться інтенсивне газонасичення, в результаті чого зростає редокс-потенціал води, що сприяє аеробіозу із використанням активного мулу, для проходження нітрифікації-денітрифікації забруднень. Продуктивність аерації регулюється, підтримуючи редокс-потенціал в зоні оптимальних значень,

за рахунок чого провадиться інтенсивний процес окислення і коагулювання домішкових включень, переведення їх зважений стан.

Мінералізований осад, що утворюється в прояснювач 15 періодично скидається патрубком 38, або циркуляційною системою 17, по транспортному трубопроводу 11 відводиться у аеротенк-біофлотатор, звідки вилучається разом із флотошламом, пройшовши обробку біодеструктором-ензимами. Пройшовши біологічну обробку в прояснювачі 15, за допомогою процесорного управління 20 включається насос 19, і забірним трубопроводом 18 вода подається в приймальну камеру лагуни-біоплато 21, куди надходить очищена, профільтрована вода через трубопровід 22, а також розчин біодеструкторів-ензимів, і/або католіту, отриманого в прикатодній зоні окремого перетинкового електролізера, і/або реактиву Фентона, і/або промивних і продувальних мулових вод УЗВ закритої рибної акваферми, або як розчини біодеструкторів-ензимів використовують теплі, з температурою вище 25 °С, придонні продувально-промивні мулові води УЗВ закритої рибної акваферми з бройлерного вирощування окремого виду риб з роду Кларій родини Кларієві ряду сомоподібних (*Clarias gariepinus*) через патрубок 23 з бокс-дозатора 24.

В приймальній камері лагуни-біоплато 21 провадиться корегування і збільшення редокс-потенціалу води за рахунок змішування з чистою водою, а також підготовка біологічного середовища штамами спеціально підготовлених бактерій і ензимів, котрі відповідають характеру забруднень, адже нарощування необхідної кількості активного мулу за рахунок постійного чи періодичного введення розчину біодеструктора, або як розчини біодеструкторів-ензимів використовують теплі, з температурою вище 25 °С, придонні продувально-промивні мулові води УЗВ закритої рибної акваферми з бройлерного вирощування окремого виду риб з роду Кларій родини Кларієві ряду сомоподібних (*Clarias gariepinus*).

Підготовлена вода по дренажній інфільтраційній системі 25 подається в мінеральне завантаження 27 камери лагуни-біоплато-фільтра 26, в зоні кореневої системи висаджених вищих водних рослин 28. Вода із забрудненнями

фільтрується крізь мінеральне завантаження 27, контактуючи із кореневою системою вищих водних рослин 28, (наприклад, очеретом, аїром, рогозом, ейхорнією, вільхою, вербою і верболозом), яка фітовилучає забруднення, попередньо мінералізовані біодеструктором до форм, здатних поглинатися рослинами-макрофітами. Одночасно на поверхні мінерального завантаження провадиться поглиблений процес фітобіологічної обробки за допомогою біодеструктивних мікроорганізмів, яка полягає в активізації діяльності мікроорганізмів вихідного субстрату, що викликає прискорення процесу розпаду органічних компонентів і мікробного синтезу.

Результатом фітобіологічних реакцій є загибель яєць гельмінтів (аскарид, фасціол, трихоцефалюсов, шистосоми і т.д.), найпростіших, умовно-патогенної і патогенної мікрофлори. Очищена вода частково забирається середнім дренажем 40 і подається в третю камеру лагуни-біоплато 39, яка виконана як приймальний резервуар проміжного циркуляційно-промивного фільтрату, при цьому, із нижньої частини камери лагуни-біоплато-фільтра 26 збірною дренажною системою 29 і відводиться у збірну камеру лагуни-біоплато 30, при цьому з камери 39, гідравлічно з'єднаної з середнім дренажем 40, частина потоку циркуляційно-промивної води системою подачі води 31 надходить у окремий гідроавтоматизований фільтр 32 для очищення на зернистому завантаженні 33.

Окремий гідроавтоматизований фільтр 32 виконує функцію підготовки води для очищення основного потоку води в приймальній камері, куди вона потрапляє через збірний колектор 34 трубопроводом 22, а також є своєрідним індикатором якості очищення і регулятором редокс-потенціалу, адже при наявності забруднень в збірній камері 30, на зернистому завантаженні 33 окремого гідроавтоматизованого фільтра утворюється додатковий мікробіологічний-ферментний шар, який потрапляє у збірну камеру, збільшуючи кількість активного мулу і ензимів перед SBR-фітоочищенням води.

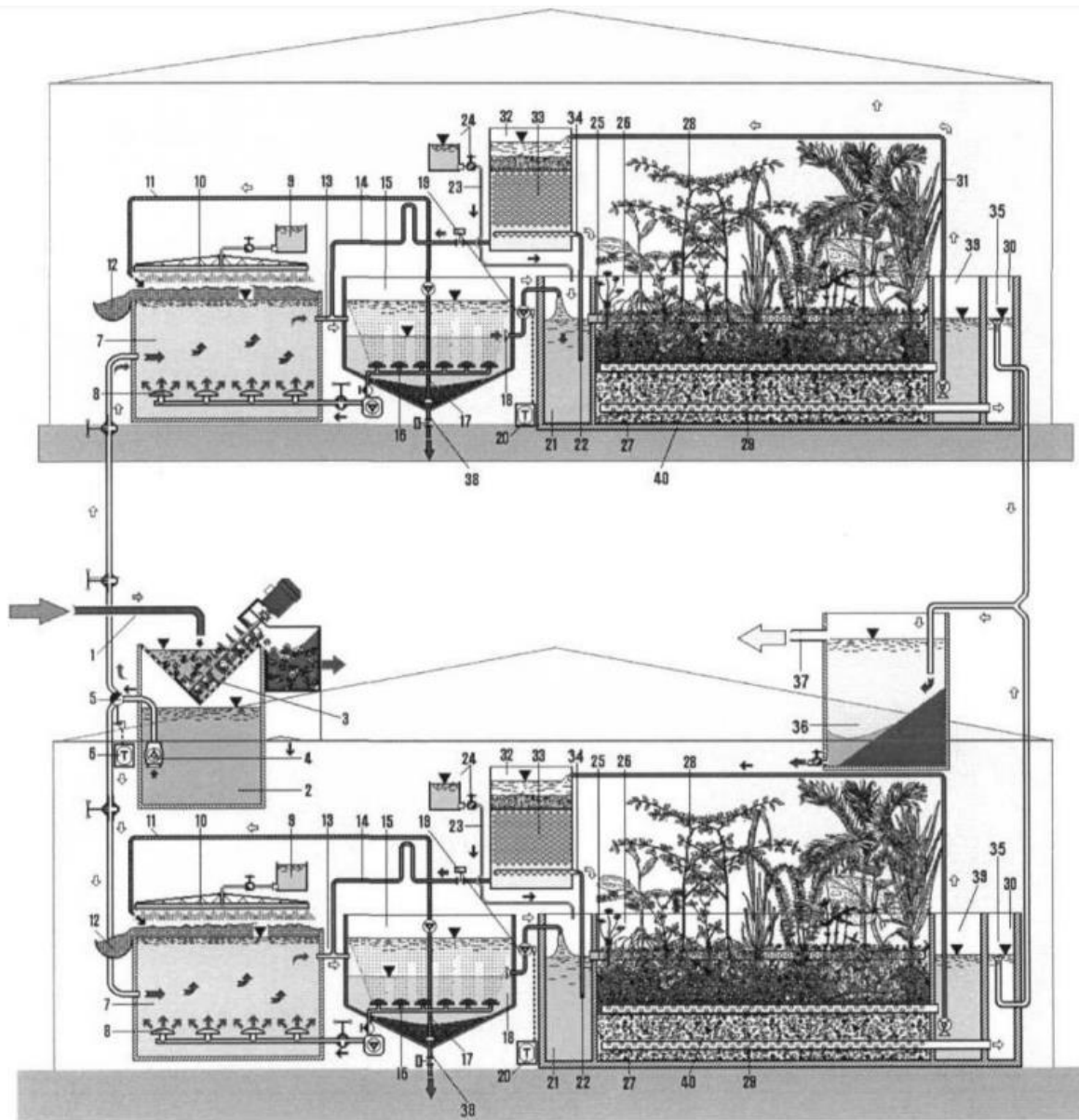


Рис. 8.1. Схематичне зображення УЗВ-фітореактору SBR-BIOPLATO [1].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Під час приготування мийних і дезінфікуючих засобів, а також приготування і стерилізації поживних середовищ в якості відходів можуть виступати пакувальні тари для цих засобів та компонентів поживних середовищ. Тара для миючих та дезінфікуючих засобів має вигляд канистри із поліпропілену, який має піддаватися вторинній переробці. Для пакування деяких компонентів поживних середовищ іноді використовується такий матеріал як полівінілхлорид (ПВХ), який неможливо утилізувати з іншими типами пластику, які піддаються вторинній переробці. Узагальнена характеристика твердих відходів наведена у табл. 8.2.

Характеристика твердих відходів виробництва нізину

Назва твердих відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Пластикова тара для мийних та дезінфікуючих засобів	Поліпропілен	0,5	IV
Пакування для компонентів поживного середовища	Поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид (PVC-3)	0,5	IV
	Усього:	1	

Для утилізації пакувальних тар дезінфікуючих і мийних засобів, а також компонентів поживного середовища їх попередньо піддають сортуванню, а потім відправляють до пунктів прийому вторинної сировини.

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

До складових газоповітряних відходів виробництва нізину належать аерозоль і вуглекислий газ. Дані газоповітряні відходи утворюються під час таких процесів виробництва як виробничий біосинтез антибіотику та підготовка посівного матеріалу.

Тривалість процесу підготовки посівного матеріалу складає 12 год, час виробничого біосинтезу – 21 год. Швидкість аерації стерильного стисненого повітря, що подається для забезпечення аеробних умов культивування – 1 л/(1 л КР·хв). У виробничому приміщенні встановлюються 1 інокулятор з робочим об'ємом 30 л, 1 посівний апарат з робочим об'ємом 300 л та 1 ферментер із робочим об'ємом 10 м³. Тому, приблизний об'єм відпрацьованого повітря становить: $1 \cdot (30 \cdot 12) + 1 \cdot (300 \cdot 12) + 1 \cdot (10000 \cdot 12) = 123\,960$ л (123,96 м³).

Оскільки продуцент нізину є безпечним для людини і тварин, то газоподібні відходи мають клас небезпеки IV. Узагальнена характеристика газоповітряних відходів наведена у табл. 8.3.

Характеристика газоповітряних відходів виробництва нізину

Назва газоподібних відходів	Речовини, що входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, м ³	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Оксиди вуглецю, аерозоль бактерій	123,96	IV
	Усього:	123,96	

Пропонується така технологія очищення повітря. Подачу іонізованого повітря здійснюють у вихідні гази, а іонізацію повітря здійснюють ультрафіолетовим світлом, яке подається і змішується з вихідними газами у вихідній трубі. Додаткову подачу іонізованого повітря у вихідні гази здійснює повітряний компресор і іонізаційна камера з лампами ультрафіолетового світла, що подає повітря у вихідні гази. При вирішенні поставленої задачі береться той факт, що іонізовані молекули O₂ в повітрі змішуються з викидами газів, що сприяють перетворенню CO в CO₂. На кресленні зображена функціональна схема запропонованого пристрою для здійснення способу очистки CO у вихідних газах.

Він складається з:

1. Повітряний компресор.
2. Іонізаційна камера.
3. Лампи ультрафіолетового світла.
4. Вихідна труба турбіни.
5. Димова труба.
6. Турбіна.

Пристрій працює таким чином. У вихідну трубу - 4 турбіни - 6 через вхід, що сполучає її з іонізаційною камерою - 2, за допомогою повітряного компресора - 1 подається повітря, яке, проходячи через іонізаційну камеру - 2, іонізується ультрафіолетовими лампами - 3 (наприклад ДРК-1000) і змішується з вихідними газами у вихідній трубі - 4. Іони кисню при змішуванні з молекулами CO вступають в реакцію доокислення до CO₂, що в кінцевому результаті призводить до очистки відхідних газів від оксиду вуглецю.

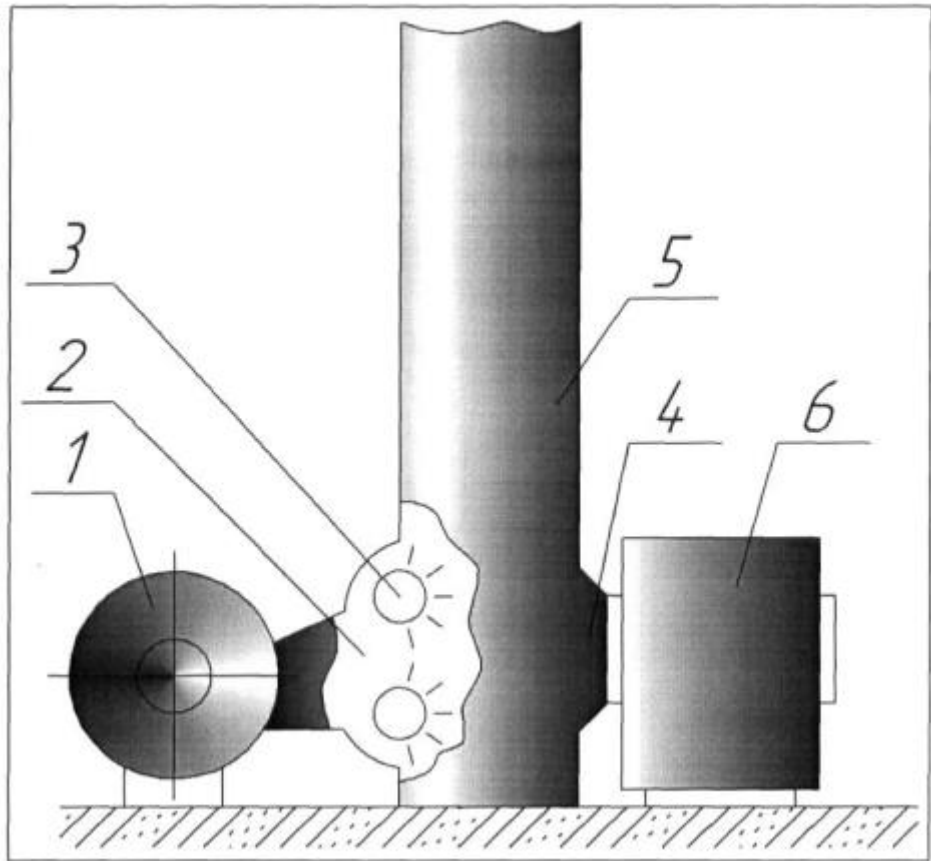


Рис. 8.2. Зображення установки для очищення повітря [59].

Список використаної літератури

1. Jones E., Salin V. Nisin and the market for commercial bacteriocins. *Texas Agribusiness Market Research Center*. 2005. Електронний ресурс // [Режим доступу]:
<https://ageconsearch.umn.edu/record/90779/files/CP%2001%2005%20Nisin%20Report.pdf>.
2. Jones E., El-Haddad N. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *Journal of Dairy Science*. 2020, 103(3): 2041-2052. doi:10.3168/jds.2019-17498.
3. Lee N. K. Antimicrobial effect of nisin against *Bacillus cereus* in beef jerky during storage. *Korean journal for food science of animal resources*. 2015, 35: 272–276.
4. Jiang L., Liu Y., Yan G., Cui Y. Aeration and fermentation strategies on nisin production. *Biotechnology Letters*. 2015, 37(10): 2039–2045. doi:10.1007/s10529-015-1886-1.
5. Jozala A. F., Novaes L. C. de L. Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials. *Intech open science*. 2015, 103–119. doi:10.5772/60932.
6. Chen H., Hoover D.G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2003, 2(3): 82–100. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x .
7. Małaczewska J., Kaczorek-Łukowska E. Nisin—A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. *Peptides*. 2021, 137(170479). doi:10.1016/j.peptides.2020.170479.
8. Shin J. M., Gwak J. W., Kamarajan P., Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*. 2016, 120(6): 1449–1465. doi:10.1111/jam.13033.
9. Piper C., Hill C., Cotter P. D. Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbial Biotechnology*. 2010, 4(3): 375–382. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00207.x.

					НУХТ БТЕК 05.01.18 КР ПЗ							
Зм	Арк.	№	Підпи	Да	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ			Літер	Аркв	Арквшіє		
Розробн	Синяк А І											
Керівник	Каппаш Ю									83	92	82
Н контр								Кафедра БТМ				
Консульт												
Зав.	Стабніков											

10. Younes M., Aggett P., Aguilar F. Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal*. 2017, 15(12):5063. doi:10.2903/j.efsa.2017.5063.
11. Product information Nisin. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.caymanchem.com/pdfs/16532.pdf>.
12. Liu W., Hansen J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, 56(8): 2551-2558. doi:10.1128/aem.56.8.2551-2558.1990.
13. Tai Y.-C., McGuire J., Neff J. A. Nisin antimicrobial activity and structural characteristics at hydrophobic surfaces coated with the PEO–PPO–PEO triblock surfactant Pluronic® F108. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008, 322(1): 104–111. doi:10.1016/j.jcis.2008.02.062.
14. Müller-Auffermann K., Grijalva F., Jacob F. Nisin and its usage in breweries: a review and discussion. *Journal of the Institute of Brewing*. 2015, 121(3): 309–319. doi:10.1002/jib.233.
15. Ávila M, Gómez-Torres N, Gaya P, Garde S. Effect of a nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. *Int J Food Sci Tech*. 2020, 1-7. doi:10.1111/ijfs.14598.
16. Liang Z-R, Hsiao H-I, Jhang D-J. Synergistic antibacterial effect of nisin, ethylenediaminetetraacetic acid, and sulfite on native microflora of fresh white shrimp during ice storage. *Journal of Food Safety*. 2020: e12794. doi:10.1111/jfs.12794.
17. Severina E., Severin A., Tomasz A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998, 41(3), 341–347. doi:10.1093/jac/41.3.341.
18. Piper C., Draper L. A., Cotter P. D. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009, 64(3):546–551. doi:10.1093/jac/dkp221.
19. Dosler S., Gerceker A. A. In vitro Activities of Nisin Alone or in Combination with Vancomycin and Ciprofloxacin against Methicillin-Resistant and Methicillin-

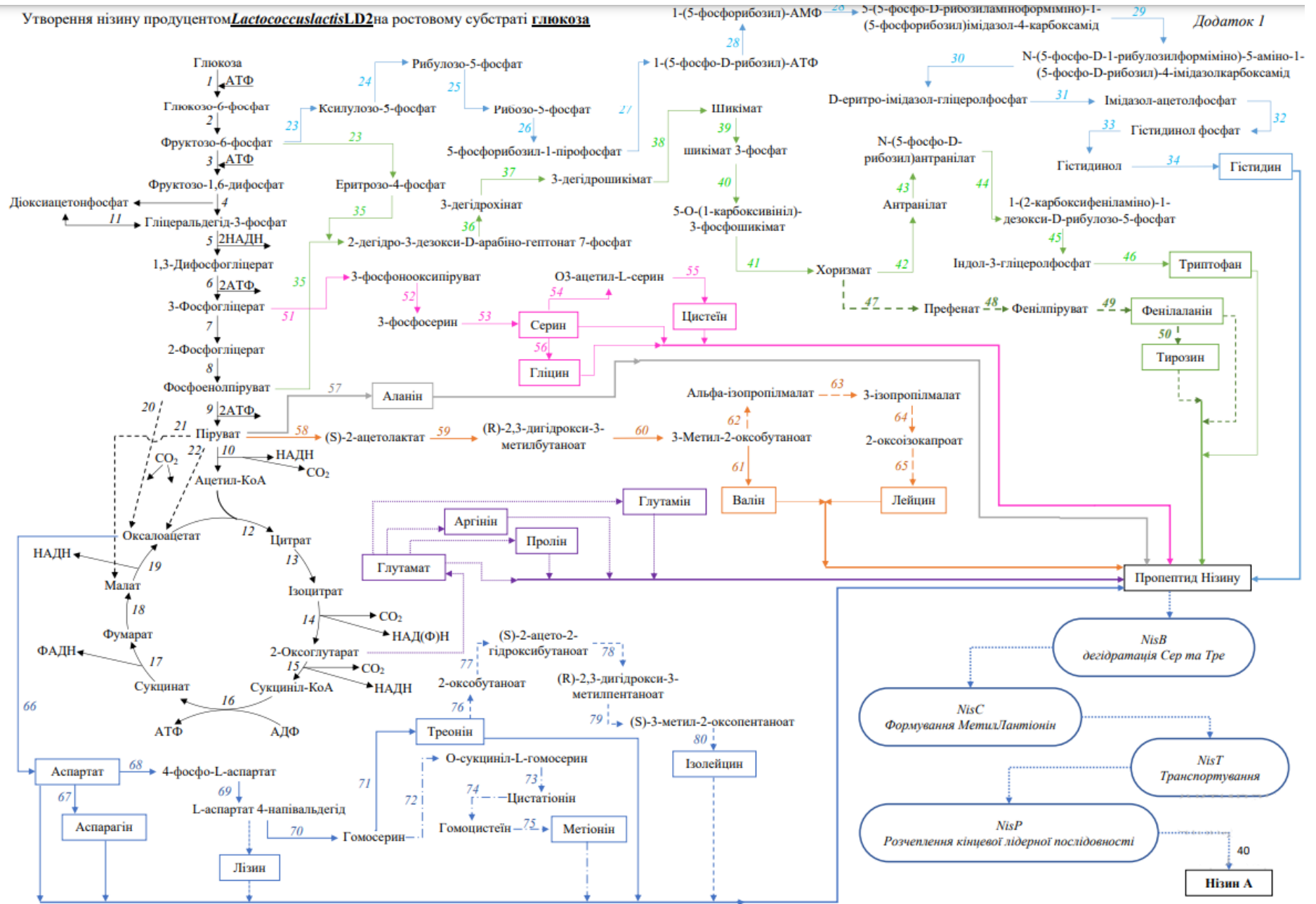
- Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. *Chemotherapy*. 2011, 57(6): 511–516. doi:10.1159/000335598.
20. Bartoloni A., Mantella A., Goldstein B. P. In-Vitro Activity of Nisin Against Clinical Isolates of *Clostridium difficile*. *Journal of Chemotherapy*. 2004, 16(2): 119–121. doi:10.1179/joc.2004.16.2.119.
21. Joo N. E., Ritchie K., Kamarajan P., Miao D. Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Medicine*. 2012, 1(3): 295–305. doi:10.1002/cam4.35.
22. Preet S., Bharati S., Panjeta A. Effect of nisin and doxorubicin on DMBA-induced skin carcinogenesis—a possible adjunct therapy. *Tumor Biology*. 2015, 36(11): 8301–8308. doi:10.1007/s13277-015-3571-3.
23. De Arauz L. J., Jozala A. F., Mazzola P. G. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009, 20(3-4): 146–154. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.056.
24. Zhang J., Caiyin Q., Feng W. Enhance nisin yield via improving acid-tolerant capability of *Lactococcus lactis* F44. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). doi:10.1038/srep27973.
25. Hao P., Liang D., Cao L., Qiao B. Promoting acid resistance and nisin yield of *Lactococcus lactis* F44 by genetically increasing D-Asp amidation level inside cell wall. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, 101(15): 6137–6153. doi:10.1007/s00253-017-8365-7.
26. Pat. US4597972A. Nisin as an antibotulinal agent for food products / Stephen L. Taylor. 01.07.1986.
27. Tan J. P., Jahim J. M., Wu T. Y. Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2016, 36 – 012058. doi:10.1088/1755-1315/36/1/012058.
28. *Lactococcus lactis* [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/14702>.

29. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с., ил.
30. Bacteria Collection: *Lactococcus lactis subsp. lactis* Additional Information [Электронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?collection=nctc&refId=NCTC%206681&additional=true>.
31. Younes M., Aggett P., Aguilar F. Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. EFSA Journal. 2017, 15(12):5063. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5063.
32. Виробництво промислової продукції за видами за 2020 рік [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2021/pr/ovp/ovp_rik/vppv_20xls_ue.xls x.
33. Каустична сода, натрій гідроксид [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p694734755-kausticheskaya-soda-granula.html?&primelead=M143NA>.
34. Полідез D-5 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://spilna-meta.com.ua/ua/p257116204-polidez.html>.
35. ЕКСАН ПРО ДЕЗ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://novahim.com.ua/eksan-pro-dez-mojushchee-sredstvo-dlja-udaleniya-zhirovyh-zagrjaznenij-2>.
36. Микробак форте [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://allhim.kh.ua/p334833632-mikrobak-forte.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQiAqOucBhDrARIsAPCQL1bnH8xKsGD65Rn3WWzbFZCZbnU-tG0kJfmXcRbXzsN1yMy7xOJujA8aAh40EALw_wcB.
37. Фільтр грубого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.technofilter.com.ua/types/mesh/>.

38. Компрессор [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50>.
39. Теплообмінник-охолоджувач [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-oxolodzhuвачi/>.
40. Ресивер [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://dalgakiran.ua/uk/products/kompresori-seriyi-tidy-3-50>.
41. Теплообмінник-нагрівач [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://opeks.ua/ua/parovi-kaloriferi-nagrivachi>.
42. Фільтр тонкого очищення [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/>.
43. Stirred Pressure Autoclave Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.amarequip.com/stirred-pressure-autoclave-reactor>.
44. Фільтр індивідуальний [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/>.
45. Customizable Fermenters [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.solarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>.
46. Лічильник-дозатор для води [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://prom.ua/ua/p1139912056-schetchik-dozator-dlya.html>.
47. Реактори сталеві з механічним перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс]. Режим доступу:
http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.ph
р.
48. Об'ємно-ваговий дозатор [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://artmash.ua/product/dozator-sypuchih-materialov-06-kub-m>.
49. Дозатор ваговий автоматичний [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://vesmaster.com.ua/images/dozators/doz4.html>.
50. Насос відцентровий [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/gigienicheskie_nasosyi.

51. Установка безперервної стерилізації [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bioengineering.ch/plants/continuous-sterilization>.
52. Насос перистальтичний [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tapflo.ua/images/pt_ptl_ua_rev1_2019.pdf.
53. Мотроненко В. В., Луценко Т. М., Дронько Л. М. Біотехнологія та біоінженерія. Частина 1. Основи біотехнології рекомендації до виконання лабораторних робіт. Електронний ресурс // [Режим доступу]: https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/48653/1/Biotekhnolohiia_ta_bioinzheneriia_%201.
54. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс] : конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.
55. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Ігнатенко С.В. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 "Біотехнологія" ден. форми навч. — Київ : НУХТ, 2010. — 127 с.
56. Смотраева И.В., Меледина Т.В. Анализ качества готового солода: Учеб.-метод. пособие к лабораторным работам. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. 38 с.
57. Hao P., Liang D., Cao L., Qiao B., Wu H., Caiyin Q., Zhu H., Qiao, J. Promoting acid resistance and nisin yield of *Lactococcus lactis* F44 by genetically increasing D-Asp amidation level inside cell wall. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, 101(15): 6137–6153. doi:10.1007/s00253-017-8365-7.
58. Патент України на винахід № 122933. УСТАНОВКА ЗАМКНУТОГО ВОДОПОСТАЧАННЯ - (УЗВ)-ФІТОРЕАКТОР SBR-БИОПЛАТО.175 / Бондар О. І., Курилюк М. С., Злакоман С. Л., Курилюк О. М. Опубл. 25.01.2018, Бюл. № 2.
59. Патент України на винахід № 102157. СПОСІБ ОЧИСТКИ ВІДХІДНИХ ГАЗІВ КОМПРЕСОРНИХ УСТАНОВОК ВІД СО / Михайлюк Ю. Д. Опубл. 26.10.2015, Бюл. № 20.

Утворення нізину продуцентом *Lactococcus lactis* LD2 на ростовому субстраті глюкоза



Ферменти:

- 1 – глюконокіназа (КФ: 2.7.1.2);
- 2 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ: 5.3.1.9);
- 3 – фосфофруктокіназа (КФ: 2.7.1.11);
- 4 – фруктозодифосфатальдоза (КФ: 4.1.2.13);
- 5 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ: 1.2.1.12);
- 6 – фосфогліцераткіназа (КФ: 2.7.2.3);
- 7 – 2,3-бісфосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ: 5.4.2.11);
- 8 – енолаза (КФ: 4.2.1.11);
- 9 – піруваткіназа (КФ: 2.7.1.40);
- 10 – піруватдегідрогеназа (КФ: 1.2.4.1);
- 11 – триозофосфатізомераза (КФ: 5.3.1.1);
- 12 – цитратсинтаза (КФ: 2.3.3.1);
- 13 – аконітаза (КФ: 4.2.1.3);
- 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.42);
- 15 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ: 2.3.1.61);
- 16 – бета-субодиниця сукциніл-КоА синтетази (КФ: 6.2.1.5);
- 17 – сукцинатдегідрогеназа (КФ: 1.3.5.1);
- 18 – фумаратгідратаза, клас II (КФ: 4.2.1.2);
- 19 – малатдегідрогеназа (хінон) (КФ: 1.1.5.4);
- 20 – фосфоенолпіруват карбоксикіназа (АТФ) (КФ: 4.1.1.49);
- 21 – малатдегідрогеназа (декарбоксилювання) (КФ: 1.1.1.39);
- 22 – піруваткарбоксилаза (КФ: 6.4.1.1);
- 23 – транскетолаза (КФ: 2.2.1.1);
- 24 – рибулозофосфат-3-епімераза (КФ: 5.1.3.1);
- 25 – рибоза-5-фосфат-ізомераза А (КФ: 5.3.1.6);
- 26 – рибозо-фосфат-пірофосфокіназа (КФ: 2.7.6.1);
- 27 – АТФ-фосфорибозилтрансфераза (КФ: 2.4.2.17);
- 28 – фосфорибозил-АТФ пірофосфогідролаза (КФ: 3.6.1.31);
- 29 – фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазол карбоксамід риботид ізомераза (КФ: 5.3.1.16);
- 30 – субодиниця імідазолгліцеролфосфатсинтази HisH (КФ: 4.3.2.10);
- 31 – імідазолегліцерин-фосфатдегідратаза (КФ: 4.2.1.19);
- 32 – гістидинол-фосфатамінотрансфераза (КФ: 2.6.1.9);
- 33 – гістидинол-фосфатаза (сімейство РНР) (КФ: 3.1.3.15);
- 34 – гістидинолдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.23);
- 35 – 3-дезоксид-7-фосфогептулатсинтаза (КФ: 2.5.1.54);
- 36 – 3-дегідрохінатсинтаза (КФ: 4.2.3.4);
- 37 – 3-дегідрохінатдегідратаза I (КФ: 4.2.1.10);
- 38 – шикіматдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.25);
- 39 – шикіматкіназа (КФ: 2.7.1.71);
- 40 – 3-фосфошикімат-1-карбоксивінілтрансфераза (КФ: 2.5.1.19);
- 41 – хоризматсинтаза (КФ: 4.2.3.5);
- 42 – компонент антранілатсинтази II (КФ: 4.1.3.27);
- 43 – антранілатфосфорибозилтрансфераза (КФ: 2.4.2.18);

- 44 – фосфорибозилантранілатізомераза (КФ: 5.3.1.24);
45 – індол-3-гліцеролфосфатсинтаза (КФ: 4.1.1.48);
46 – триптофансинтаза(КФ: 4.2.1.20);
47 – хоризмат мутаза(КФ: 5.4.99.5);
48 – префенатдегідратаза (КФ: 4.2.1.51);
49 – трансаміназа ароматичних амінокислот (КФ: 2.6.1.57);
50 – фенілаланін-4-гідроксилаза (КФ: 1.14.16.1);
51 – 2-оксоглутаратредуктаза (КФ:1.1.1.399);
52 – фосфосеринаміотрансфераза (КФ: 2.6.1.52);
53 – фосфосеринфосфатаза (КФ: 3.1.3.3);
54 – серин-О-ацетилтрансфераза (КФ: 2.3.1.30);
55 – цистеїнсинтаза (КФ: 2.5.1.47);
56 - гліцингідроксиметилтрансфераза (КФ: 2.1.2.1);
57 – аланінсинтезуюча трансаміназа (КФ: 2.6.1.66);
58– ацетолактатсинтаза (КФ: 2.2.1.6);
59– кетолово-кислотна редуктоізомераза (КФ: 1.1.1.86);
60– дигідроксокислотна дегідратаза (КФ: 4.2.1.9);
61– амінокислотна трансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42);
62 – 2-ізопропілмалатсинтаза (КФ: 2.3.3.13);
63 – (R)-2-метилмалатдегідратази (КФ: 4.2.1.35);
64 – 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ: 1.1.1.85);
65 – аміотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42);
66 – аспартатаміотрансфераза, цитоплазматична (КФ: 2.6.1.1);
67 – аспарагінсинтаза (КФ: 6.3.5.4);
68 – аспартаткіназа (КФ: 2.7.2.4);
69 – аспартат-напівальдегіддегідрогеназа (КФ: 1.2.1.11);
70 – гомосеринкіназа (КФ: 2.7.1.39);
71 – треонінсинтаза (КФ: 4.2.3.1);
72 – гомосерин-О-сукцинілтрансфераза (КФ: 2.3.1.46);
73 – цистатіонін-гама-синтаза (КФ: 2.5.1.48);
74 – цистеїн-S-кон'югат бета-ліаза (КФ: 4.4.1.13);
75 – 5-метилтетрагідроптероїлтриглутамат - гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ: 2.1.1.14);
76 – треоніндегідратаза (КФ: 4.3.1.19);
77 – велика субодиниця ацетолактатсинтази I/II/III (КФ: 2.2.1.6);
78 – редуктоізомераза кетолової кислоти (КФ: 1.1.1.86);
79 – дигідроксикисла дегідратаза (КФ: 4.2.1.9);
80 – аміотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ: 2.6.1.42).