

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » червня 2024 р.

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

« » червня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

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

на тему: « Одержання целюлаз для виробництва біоетанолу культивуванням
Bacillus subtilis»

Виконав: здобувач IV курсу, групи З

ГОДЛЕВСЬКА Марія Альбертівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(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 – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГОДЛЕВСЬКОЇ Марії Альбертівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

- Тема роботи: « Одержання целюлаз для виробництва біоетанолу культивуванням *Bacillus subtilis*»
керівник роботи Красінько В.О. , доцент, к.т.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-к
- Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.
- Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 1,6м³, коефіцієнт заповнення становить 0,6, цільовий продукт фермент целюлаза, виробничий штамп *Bacillus subtilis* MU S1
- Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва
- Перелік графічного матеріалу. Технологічна схема 1 аркуш формату А1 та апаратурна схема 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 06.03.24	
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	07.03.24 - 14.03.24	
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	15.03.24 - 22.03.24	
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	23.03.24 - 29.03.24	
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	01.04.24 - 13.04.24	
	Розділ 6. Специфікація обладнання	14.04.24 - 19.04.24	
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	20.04.24 – 28.04.24	
	Розділ 8. Контроль виробничого біосинтезу	29.04.24 - 12.05.24	
	Розділ 9. Обґрунтування стадій виділення і очищення целюлази <i>Bacillus subtilis</i> MU S1	13.05.24 - 17.05.24	
	Розділ 10. Методи ідентифікація цільового продукту	18.05.24 - 24.05.24	
	Розділ 11. Екологізація виробництва целюлази	25.05.24 - 28.05.24	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Марія ГОДЛЕВСЬКА _____
(ім'я та прізвище)

Вікторія КРАСІНЬКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва целюлази як цільового продукту шляхом культивування *Bacillus subtilis* MU S1. Розрахована потужність виробництва становить 70 м³/рік культуральної рідини або 23600 необхідна кількість целюлази млн. МО.

У даній роботі представлена технологія виробництва ферменту целюлази, здійснено техніко-економічний розрахунок, а саме розраховано потребу у целюлолітичних ферментах для підприємства, яке випускатиме біоетанол другого покоління. Тривалість культивування біологічного агента становить 48 год., температура 37°C.

Технологія виробництва складається з допоміжних робіт (приготування дезінфекційного засобу широкого спектра дії (IPA Micronclean і CONTEC CyChlor) по чергово зі спорицидом для періодичного використання або дії в точці застосування (CONTEC ProChlor)., підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища). Технологічний процес включає в себе 3 етапи (4 етап сам виробничий біосинтез). Стадії підготовки посівного матеріалу (у коблах на качалках, інокуляторі 20л та 160л) та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1,6м³. Тривалість культивування біологічного агента становить 48 год., температура 37°C. Обґрунтовано вибір та підбрано обладнання для здійснення післяферментаційних стадій, а саме відділення біомаси, ультрафільтрація, осадження, центрифугування та висушування (з подальшою упаковкою).

Наведені методи визначення активності ферментів. Графічна частина роботи присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем виробництва.

Обсяг кваліфікаційної роботи – ...сторіноки. Містить рисунки, ... таблиць. Робота виконана на основі літературних джерел та технологічної схеми формату А1 та апаратурної схеми формату А1.

Ключові слова: *Bacillus subtilis* MU S1, целюлаза.

ABSTRACT

The project presents the production of cellulase as a target product through the cultivation of *Bacillus subtilis* MU S1. The calculated production capacity is 70 m³/year of culture liquid or 23,600 million required cellulase activity units. This work presents the technology for the production of the cellulase enzyme, including a techno-economic calculation that determines the need for cellulolytic enzymes for an enterprise that will produce second-generation bioethanol. The duration of the cultivation of the biological agent is 48 hours at a temperature of 37°C.

The production technology consists of auxiliary tasks (preparation of a broad-spectrum disinfectant (IPA Micronclean and CONTEC CyChlor) alternately with a sporicide for periodic use or point-of-use action (CONTEC ProChlor), preparation of aeration air, preparation, and sterilization of the nutrient medium). The technological process includes 3 stages (with the 4th stage being the actual production biosynthesis). The stages of preparation of the inoculum (in shakers, a 20L inoculator, and a 160L inoculator) and production biosynthesis in a 1.6 m³ fermenter. The duration of the cultivation of the biological agent is 48 hours at a temperature of 37°C. The selection and fitting of equipment for post-fermentation stages, such as biomass separation, ultrafiltration, precipitation, centrifugation, and drying (with subsequent packaging), are justified.

Methods for determining enzyme activity are provided. The graphical part of the work is dedicated to the development of technological and equipment diagrams of production.

The qualification work volume is ... pages. It contains ... figures, ... tables. The work is based on ... literary sources, a technological scheme in A1 format, and an equipment scheme in A1 format.

Keywords: *Bacillus subtilis* MU S1, cellulase.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	14
2.1. <i>Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування</i>	14
2.2. <i>Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента</i>	17
2.3. <i>Таксономічний статус біологічного агента</i>	19
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	21
3.1. <i>Потреби у целюлазі для виробництва біоетанолу</i>	21
3.2. <i>Розрахунок потужності виробництва целюлази</i>	22
3.3. <i>Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера</i>	23
3.4. <i>Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу</i>	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	28
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	33
5.1. <i>Вибір умов і способу культивування <i>Bacillus subtilis</i> MU S1</i>	33
5.2. <i>Вибір типу ферментера для культивування <i>Bacillus subtilis</i> MU S1 - продуцента целюлази</i>	34
5.3. <i>Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря</i>	36
5.4. <i>Підготовка персоналу</i>	37
5.5. <i>Підготовка обладнання та інвентарю</i>	39
5.6. <i>Підготовка виробничих приміщень</i>	40
5.7. <i>Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища</i>	42
5.7.1. <i>Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках</i>	43
5.7.2. <i>Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах</i>	44

5.7.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу	46
5.8. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН.....	47
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	48
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	53
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	64
8.1. Мікробіологічний контроль.....	64
8.2. Концентрація біомаси	65
8.3. Визначення активності целюлази	65
8.4. Концентрація джерела вуглецю	66
8.5. Концентрація джерела азоту	67
8.6. Карта постадійного контролю	69
РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦЕЛЮЛАЗИ <i>Bacillus subtilis</i> MU S1.....	75
РОЗДІЛ 10. МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	79
10.1 Визначення активності целюлази	79
10.2. Визначення вологості готового препарату	80
10.3. Мікробіологічна чистота	81
РОЗДІЛ 11. ЕКОЛОГІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ЦЕЛЮЛАЗИ.....	82
ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:	88

ВСТУП

Величезний діапазон невивченого мікробного різноманіття, що впливає на функціонування біосфери і людську діяльність, нещодавно прискорили значне розширення мікробіологічних досліджень навколишнього середовища. Незважаючи на ці зусилля, понад 90% мікробного різноманіття ще потребують відкриття. Таке нове біорізноманіття являє собою скарбницю нових і вдосконалених біотехнологічних розробок і застосувань у секторах фармацевтики, енергетики, хімічної та гірничодобувної промисловостей, виробництва екологічних матеріалів, сільського господарства, продуктів харчування та охорони навколишнього середовища [1].

Мікробні ферменти відіграють незамінну роль у виробництві харчових продуктів, фармацевтичних препаратів та інших комерційних товарів. У літературних джерелах описується про виробництво нових ферментів рослинного, тваринного та мікробного походження. Тим не менш, частина ферментів, що виробляються у промислових масштабах із залученням мікробних біологічних агентів, є доволі низькою [2].

Мікробні ферменти зазвичай розглядаються як потенційні біокатализатори у безлічі біотехнологічних застосувань. Такі сполуки в основному характеризуються своєю біохімічною різноманітністю та сприйнятливістю до генних маніпуляцій. Промисловість часто зацікавлена в нових мікробних штаммах, що виробляють різні ферменти з оригінальною активністю [3]. Тому продовжується активний пошук потенційних біологічних агентів-продуцентів ензимів, а також досліджується виробництво нових ферментів за допомогою технологій білкової інженерії, для вдосконалення уже існуючих промислових ферментних препаратів [2, 3].

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Годлевська М.А.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					6	91
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.						7		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Целюлаза посідає третє місце по використанню ферментів у промисловості після протеази і амілази. Фермент розкладає целюлозу до мономерних субодиниць глюкози та зазвичай застосовується у виробництві біопалива, біодеінкінгу, текстильній промисловості і харчовій та кормовій промисловостях [4].

Целюлозний біоетанол є біопаливом другого покоління, яке виготовляється з відходів лігніоцелюлозної біомаси (ЛБ). ЛБ - це складний субстрат, який в основному складається з целюлози (40-50%), геміцелюлози (ксилани та інші) (25–35%) і лігніну (15–20%) [4, 5, 6]. Біоетанол таким чином виробляють шляхом перетворення целюлози і геміцелюлози до простих цукрів шляхом попередньої обробки та оцукрювання, із подальшою ферментацією цих простих цукрів до етанолу за допомогою дріжджів [4].

Актуальність

Вичерпання запасів викопного палива та збільшення викидів парникових газів, що призводять до кліматичних змін і глобального потепління, зумовили необхідність практичної реалізації ідеї альтернативного біопалива в найближчому майбутньому. Ключовим кроком у переході від невідновлюваних до відновлюваних джерел енергії, що є переходом від палива на основі нафти до біопалива, є рушійне явище біопереробних заводів [7, 8].

Біоетанол другого покоління є однією з таких потенційних альтернатив, яка може зменшити залежність від продуктів на основі нафти та пом'якшити викиди парникових газів [9]. Біоетанол другого покоління отримують із лігніоцелюлозної біомаси, такої як рослинні залишки, деревні культури або різних трав. Такий субстрат в останні роки набирає обертів по використанню, оскільки лігніоцелюлозна біомаса є найпоширенішою та всюдисущою сировиною, доступною для людства.

Тому на сьогоднішній день і надалі продовжується пошук найкращих біологічних агентів-продуцентів ферментів, а саме целюлаз. Поступово йде впровадження інтегрованої технології виробництва ферментів з використанням дешевшої сировини та матеріалів в якості субстрату для виробництва целюлаз, а

також підходів щодо поліпшення властивостей уже відомих штамів за допомогою генної інженерії [10].

Новизною кваліфікаційної роботи є використання бактерій роду *Bacillus* для одержання целюлаз з метою їх подальшого використання у технології виробництва біоетанолу з лігно-целюлозної сировини.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Загальна характеристика

Целюлаза - фермент комплексної целюлолітичної дії, розщеплює молекули целюлози на моносахариди (прості цукри), такі як бета-глюкоза. Як секретований білок целюлаза є важливим ферментом, що належить до класу КФ 3.2.1.4, і каталізує ендогідроліз 1,4-- β -D-глюкозидні зв'язки в целюлозі, ліхеніні та β -D-глюканах зернових культур [11,12] . Таким чином целюлаза грає дуже важливу роль у сучасній харчовій, текстильній, паперовій та фармацевтичних промисловостях. Зовсім нещодавно целюлаза привернула велику увагу до її потенційного використання у біопаливній промисловості [11].

Фізико-хімічні властивості

Целюлаза залишається достатньо активною у широкому діапазоні рН. Як зазначають автори статті [14], целюлаза характеризується високою стабільністю при рН 5,0-8,0 (оптимальний показник рН 7,5). При кислотності вище 8,0 активність ферменту поступово знижується, при цьому втрати складають 23% і 39% при рН 9,0 і рН 10,0 відповідно. Температурним оптимум для даного ферменту при рН 7,5 є 45°C, при 60°C ферментативна активність целюлази різко знижується (32,2%).

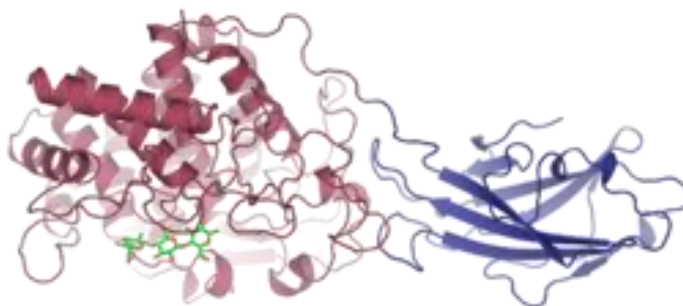


Рис. 1.1. Модель структури целюлази

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ					
Розроб.	Годлевська М.А.							Літ.	Арк.	Акрівнів
Перевір.	Красінко В.О.								9	91
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

За попередніми дослідженнями [15] було показано, що активність целюлази значно посилюється із додаванням 0,5 мМ Co^{2+} (майже вдвічі), але трохи інгібується Ni^{2+} . Загалом даний фермент є стійким до дії більшості катіонів металів.

Також дослідники оцінювали вплив органічних та неорганічних розчинників на ферментативну активність целюлази. Виявили, що алкалофільна целюлаза симбіотичної *Bacillus subtilis*, зберігає близько 30% активності при наявності 1% додецилсульфату натрію [15], а целюлаза *Acinetobacter junii* зберігає 66,1% активності за наявності 5 мМ додецилсульфату натрію [17].

Целюлази можуть функціонувати як окремі ферменти з окремими каталітичними доменами або у мультиферментних комплексах, які називаються целюлосомами; целюлосома приєднана до білка скаффолдіна за допомогою модуля зв'язування вуглеводів (СВМ), який у свою чергу, зв'язаний із целюлозою. Існують також целюлозолітичні ферменти, які не використовують гідроліз як спосіб катаболізму [18].

За класом безпеки целюлаза - хімічна речовина, що відповідає критеріям безпечнішого вибору для свого класу функціональніших інгредієнтів, але має деякі проблеми з профілем небезпеки. Зокрема, хімічна речовина з цим кодом не пов'язана з низьким рівнем небезпеки для здоров'я людини та навколишнього середовища. Під час дії на організм людини може викликати подразнення та респіраторну сенсibilізацію дихальних шляхів, та навіть астму [13].

Сфери застосування. Целюлаза використовується для багатьох цілей у промисловому секторі, а також викликає великий інтерес через її різноманітне застосування в текстильній, миючих засобах, шкіряній, харчовій, кормовій та паперовій промисловостях. Також використовується для ферментації біомаси, модифікації волокна та у фармацевтичних цілях.

Целюлази у харчовій промисловості використовуються для видалення соків і олій із насіння, для одержання картопляного крохмалю, а також для освітлення соків, але все ж таки їхня роль в харчовій промисловості залишається недостатньо використаною [19,20].

У текстильній промисловості целюлазами користуються для вологої обробки текстилю, обробки джинсової тканини, шліфування бавовняної тканини (це допомагає відновити виразність і м'якість тканини), видаленні надлишку барвника з тканин. Також цікавий факт, целюлаза використовується як альтернатива відбілювача, тобто для видалення плям (целюлаза розщеплює частини бруду і пилу, а також запобігає вицвітання тканини), у цьому випадку целюлаза є безпечнішою, бо не подразнює шкіру [21].

Целюлаза гідролізує біомасу на прості цукри, пентози або гексози, які потім ферментуються до палива або біоетанолу. Целюлази в основному беруть участь у біоконверсії відновлювальної лігноцелюлозної біомаси. А саме розкладання такої біомаси складається з 3 етапів: (1) обробка біомаси, (2) оцукрювання, в якому беруть участь ферменти, і (3) ферментація [22]. В даний час різні країни прийняли політику щодо целюлозного етанолу та встановили цілі щодо переведення ресурсів біомаси з крохмалистого або тростинного цукру на матеріали на основі целюлози. Зокрема, є повідомлення, що *Caldicelluloseruptor bescii* має здатність безпосередньо перетворювати рослинну біомасу на біоетанол, що демонструє потенціал виробництва етанолу цими термофільними бактеріями, які можна використовувати в комерційному секторі для перетворення біомаси на біоетанол [23].

Інше застосування целюлази передбачає її використання в кормовій промисловості. Його можна використовувати для попередньої обробки зернових кормів і сільськогосподарського силосу для підвищення поживної цінності кормів для тварин. Крім того, целюлази руйнують антипоживні компоненти, такі як олігосахариди, пектини, лігнін, інулін, декстрини, що в кінцевому підсумку покращує поживну цінність корму та здоров'я тварин [24].

Є дослідження, які показують, що застосовують целюлази для отримання якісного вина. Целюлозні біоматеріали можна перетворити на зброджуваний цукор за допомогою ферменту целюлази; потім дріжджі перетворюють цукор на спирт. Використання целюлази у виноробстві дає багато переваг, таких як якість

та стабільність вина, освітлення, кращий розвиток кольору та покращена мацерація. Целюлаза також знижує в'язкість суслу [25].

Висновки

Хоча целюлази мають широке застосування, вартість виробництва перешкоджає їх експлуатації, особливо до целюлозного етанолу. Тому багато лабораторій працюють над стратегіями зниження собівартості виробництва шляхом використання відходів як компонентів середовища для виробництва ферментів. Нещодавній прогрес у синтетичній біології відкрив нову арену для розробки целюлаз та їх застосування. Удосконалення у вищесказаних сферах призведе до сталого використання ресурсів, максимізуючи їх використання за допомогою економічно ефективних, екологічно чистих біопроектів з низьким енергоспоживанням. Отже, розроблення біотехнологій одержання целюлаз є нині актуальним.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Целюлази синтезуються бактеріями, грибами, найпростішими, рослинами і тваринами [26]. Однак ферменти мікробного походження є більш поширеними через їх широке біохімічне різноманіття, можливість масового культивування та легкості до генетичних маніпуляцій [27]. В даний час більшість комерційних целюлаз отримують з грибів, головним чином *Trichoderma*, *Hemicola*, *Aspergillus* і *Penicillium*.

Проте бактеріальні целюлази привертають увагу через їх високу природну різноманітність, більш високу швидкість росту, легше виділення продукту та здатність виробляти ферменти, які витримують суворі умови навколишнього середовища. Добре вивчені целюлозолітичні можливості бактерій, що належать до різних родів, таких як *Acetivibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Ruminococcus* і *Thermomonospora* [28].

Узагальнені дані щодо синтезу целюлази грибами та бактеріями наведено у табл. 2.1. Так, целюлазу із найвищим показником активності (566,66 ОД/мл) синтезує *B.subtilis* MU S1 [28], у той час як активність, синтезованої *P. janthinellum* EMS-UV-8 - 3,1 ОД/мл [29], а його споріднений штам *P.oxalicum* IODBF5 утворює фермент із активністю 1,2 ОД/мл [30]. Целюлазу із найнижчою ферментативною активністю синтезує *B.subtilis* AS3 (0,75 ОД/мл) [31].

Суттєвий недолік продуцента *B.subtilis* AS3 - синтез целюлази із низькою ферментативною активністю, хоча для процесу використовується середовище доволі простого складу [32].

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Годлевська М.А.					13	91
Перевір.		Красінко В.О.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
							14	

Грибні штами *P.oxalicum* IODBF5 і *P. janthinellum* EMS-UV-8[29, 30] продукують целюлолітичні ферменти при рості на середовищі однакового складу. Але штаб EMS-UV-8 [29] у швидші синтезує целюлазу із вищою ферментативною активністю у 2,6 рази. При рості на вуглеводному субстраті (карбоксиметилцелюлоза) бактеріальний штаб *B.subtilis* MU S1 [28] здатен до синтезу целюлози із ферментативною активністю, що на порядки є вищою, ніж в інших вищеописаних штабах (див. табл. 2.1).

Отже, проаналізувавши склад поживного середовища, умови культивування, активність синтезованого продукту, можна зробити висновок, що найкращим продуцентом ферменту целюлази є *B.subtilis* MU S1 [28].

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів целюлази

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Активність ферменту, Од/мл	Умови культивування	Література
<i>Bacillus subtilis</i> AS3	Карбоксиметилцелюлоза - 18; Пептон - 8; Дріжджовий екстракт - 5; K ₂ HPO ₄ -1; MnCl ₂ *4H ₂ O - 0,5; MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,25; FeSO ₄ * 7H ₂ O - 0,25.	0,75	pH 7,2 (± 0,1), 48 год., 39 °C, 121 об/хв	Deka D., Das S. P., Sahoo N., Das D., Jawed M., Goyal D., Goyal A. Enhanced Cellulase Production from <i>Bacillus subtilis</i> by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production. <i>ISRN Biotechnology</i> . 2013, 2013: 1 – 11. doi: 10.5402/2013/965310.
<i>Penicillium oxalicum</i> IODBF5	Пшеничні висівки – 25; Целюлоза – 10; Сечовина – 0,3; Пептон - 0,25; Дріжджовий екстракт – 0,1; KH ₂ PO ₄ – 2; (NH ₄) ₂ SO ₄ -1,4; CaCl ₂ * 2H ₂ O – 0,3; MgSO ₄ * 7H ₂ O – 0,3; Твін-80 – 0,1; FeSO ₄ * 7H ₂ O – 0,005; CoCl ₂ * 6H ₂ O – 0,002; CoCl ₂ * 6H ₂ O – 0,002; MnSO ₄ * H ₂ O – 0,0016; ZnSO ₄ * 7H ₂ O -0,0014.	1,2	pH 5,0 (± 0,1), 96 год., 50 °C	Saini R., Saini J. K., Adsul M., Patel A. K., Mathur A., Tuli D., Singhania R. R. Enhanced cellulase production by <i>Penicillium oxalicum</i> for bio-ethanol application. <i>Bioresource Technology</i> . 2015, 188: 240 – 246. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.048.

Закінчення таблиці 2.1

<i>Bacillus subtilis</i> MU S1	Карбоксиметилцелюлоза – 10; Дріжджовий екстракт – 1; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1; NaNO ₃ – 0,1; NaCl – 6; KH ₂ PO ₄ – 0,5; K ₂ HPO ₄ – 0,5; MgSO ₄ – 0,1; CaCl ₂ – 0,1.	566,66	pH 7,0 (± 0,1), 24 год., 37 °C,	Sreena C. P., Sebastian D. Augmented cellulase production by <i>Bacillus subtilis</i> strain MU S1 using different statistical experimental designs. <i>Journal of Genetic Engineering and Biotechnology</i> . 2018, 16 (1): 9 – 16. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.12.005.
--------------------------------	--	--------	-------------------------------------	---

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів целюлаз

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1-3)*
<i>Bacillus subtilis</i> AS3	Карбоксиметилцелюлоза	18	616	5	1
	Пептон	8	3600	11,07	2
	Дріжджовий екстракт	5	1198	28,80	2
	K ₂ HPO ₄	1	43,5	5,99	1
	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,5	186	0,0435	3
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,25	82	0,093	3
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,25	15	0,00375	2
Вартість 1 л середовища – 46,02 грн					
<i>Penicillium oxalicum</i> IODBF5	Пшеничні висівки	25	60	1,5	2
	Целюлоза	10	400	4	2
	Сечовина	0,3	44	0,0132	2
	Пептон	0,25	3600	0,9	2
	Дріжджовий екстракт	0,1	1198	0,1198	2
	KH ₂ PO ₄	2	43,5	0,087	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	500	0,7	3
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,3	65	0,0195	3
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,3	82	0,0246	3
	Твін-80	0,1	480	0,048	1
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,005	15	0,000075	2
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,002	720	0,00144	2
	MnSO ₄ * H ₂ O	0,0016	95	0,000152	2
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,0014	128	0,0001792	2
Вартість 1 л середовища - 7,41 грн					

Закінчення таблиці 2.2

<i>Bacillus subtilis</i> MU S1	Карбоксиметил-целюлоза	10	616	6,16	1
	Дріжджовий екстракт	1	1198	1,198	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1	500	0,5	3
	NaNO ₃	0,1	120	0,012	2
	NaCl	6	19	0,114	2
	KH ₂ PO ₄	0,5	43,5	0,02175	1
	MgSO ₄	0,1	99	0,0099	3
	CaCl ₂	0,1	65	0,0065	3
Вартість 1 л середовища - 8,02 грн					

Примітка.* - Ціни наведено станом на лютий 2023 рік. 1- <https://flagma.ua/uk/>; 2 - <https://prom.ua/ua/>; 3 - <https://www.systopt.com.ua/>.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г целюлази

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, ОД/мл	Умовна вартість 1 ОД цільового продукту, грн/ОД	Тривалість культивування, год	Концентрація цільового продукту утвореного за годину, ОД/год
<i>Bacillus subtilis</i> AS3	46,02	0,75	61,36	48	0,015
<i>Penicillium oxalicum</i> IODBF5	7,41	1,2	6,17	96	0,012
<i>Bacillus subtilis</i> MU S1	8,02	566,66	0,01	24	23,6

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

Морфолого-культуральні ознаки

Bacillus subtilis – приклад типової паличкоподібної бактерії, що при фарбуванні за Грамом залишаються синього кольору (рис. 2.1), тобто є грампозитивними [33]. Мікроорганізм є спороутворювальною бактерією, що являє собою симетричний циліндр із закругленими кінцями. Утворення спор зазвичай проходить так: значна різниця тиску на цитоплазматичній мембрані штовхає клітинну стінку в певну форму [34].



Рис. 2.1. Зображення *Bacillus subtilis* під мікроскопом [27]

На твердих агаризованих середовищах, що містять 1% агару, більшість клітин *B. subtilis* знаходяться в стані активної секреції позаклітинних полісахаридів і майже не рухливі. Клітини утримуються разом позаклітинним матриксом, утворюючи довгі ланцюжки, а також ростуть у вертикальному напрямку до поверхні середовища, оскільки ковзна здатність низька порівняно з розширенням колоній, яке відбувається на м'яких середовищах, що мають багаті вологою поверхні. Внаслідок цього колонія часто стає густою [36].

При культивуванні на звичайному поживному агарі морфологічна кругла колонія цієї бактерії шорстка, непрозора, нечітко-біла або злегка жовта із нерівними краями (рис. 2.2) [33].



Рис. 2.2. Вигляд колоній *Bacillus subtilis* на агаризованому середовищі [37]

На м'яких агаризованих середовищах, що містять 0,4–0,6 % агару, майже всі клітини виявляють високу рухливість, що забезпечує їх колективне роїння. У результаті колонія дуже тонка (часто один клітинний шар), і розширення відбувається відносно швидко, займаючи 12 годин, щоб досягти діаметра 50 мм [36].

Фізіолого-біохімічні ознаки

Бактерія – мезофіл, оскільки оптимальною температурою для росту *B. subtilis* є 30 °С. По відношенню до кисню мікроорганізм є аеробом [38]. Крім того, значення рН мало впливає на стабільність або активність даного мікроорганізму. Тому бактерія має великий потенціал для використання як альтернативи протимікробним препаратам [33].

Бактерія здатна до асиміляції маніту, рибози, глікогену, желатину, мальтози, сахарози та нітратів, але не катаболізує ксилозу та лактозу. *B. subtilis* дає позитивну ферментативну активність на лужну фосфатазу, α -глюкозидазу, β -галактозидазу, каталазу і желатиназу [38]. Даний вид широко використовується в мікробіологічних дослідженнях і вважається легким модельним організмом для вивчення біоплівки, зокрема завдяки його здатності утворювати чітко сегментовані тривимірні біоплівки колоній [39].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

B. subtilis є всюдисущим організмом. У лабораторії *B. subtilis* легко вирощувати та маніпулювати. У природі бактерія населяє ґрунт, коріння рослин і водне середовище. Хоча *B. subtilis* може рости в шлунково-кишковому тракті (ШКТ) тварин, він не вважається патогеном людини. Насправді мікроорганізм разом з іншими видами *Bacillus* вважається загалом безпечним організмом за рішенням Управління з контролю за харчовими продуктами та ліками (FDA) [40].

Сучасна (філогенетична) класифікація для *B. subtilis* наведена згідно [41]:

Царство: *Bacteria*

Тип: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Ряд: *Bacillales*

Родина: *Bacillaceae*

Рід: *Bacillus*

Вид: *subtilis*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреби у целюлазі для виробництва біоетанолу

Наразі у світі спостерігається тенденція до переходу на більш екологічні джерела енергії. Одним з найбільш перспективних у цьому розрізі може стати біоетанол. Так, у період з 2007 по 2017 його світове виробництво зросло з 38,22 млн. тон на рік до 84,1 млн. тон на рік. Найбільшу кількість біоетанолу виробляють у США, Бразилії та Індії, хоча Україна також має гарні перспективи для розвитку цього сектору промисловості, зважаючи на великі об'єми відходів сільського господарства [42].

У процесі отримання біоетанолу у разі використання целюлозної сировини все більшої популярності набуває використання целюлази. Так, за допомогою 1 МО активності целюлази в подальшому можна отримати 0,59 г етанолу [43], що є достатньо вигідним, а також значно підвищує екологічність виробництва. Таким чином, постає потреба у синтезі целюлази для забезпечення потреб підприємств з виробництва біоетанолу. Зважаючи на те, що за минулий рік українськими підприємствами було вироблено 128 тис. тон біоетанолу [44], річна потреба у целюлазі складає (табл 3.1):

Таблиця 3.1

Орієнтовна річна потреба у целюлазі для виробництва біоетанолу

Цільова група споживачів	Кількість біоетанолу, що виробляється за рік, тис. тон	Кількість біоетанолу, яку можна отримати за допомогою 1 МО целюлази, г [45]	Загальна кількість целюлази, яку необхідно отримувати на рік, млн. МО
Підприємства з виробництва біоетанолу	128	0,59	216949

Отже, згідно з даними таблиці 1.1, річна потреба у целюлазі для виробництва біоетанолу може скласти 216949 млн. МО.

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Годлевська М.А.			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					19	91
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

3.2. Розрахунок потужності виробництва целюлази

Згідно з попередніми розрахунками (див. п.1.1), загальна річна потреба у целюлазі для виробництва біоетанолу може скласти 216949 млн. МО за умови використання виключно целюлозовмісної сировини. Однак, зважаючи на те, що традиційними джерелами сировини для одержання біоетанолу є зернові культури та відходи цукрового виробництва, тобто наявні в Україні біоетанольні заводи входять в систему локальних кластерів переробки буряку та кукурудзи й органічно доповнюють екосистему створення високої доданої вартості — поле → цукровий завод → біоетанольний завод → біогазова станція → виробництво добрив або поле → біоетанольний завод → птахофабрика → біогазова станція → виробництво добрив [46], розраховувати на перехід всіх виробників біоетанолу на целюлозовмісну сировину не доводиться.

І все ж в Україні найближчим часом варто очікувати започаткування виробництва біоетанолу другого покоління, яке вже почали виробляти комерційно у світі, оскільки як член Енергетичного Співтовариства, Україна повинна імплементувати вимоги Директиви RED II і також взяти на себе зобов'язання щодо використання біопалив другого покоління у транспорті. При цьому як основну сировину з огляду на наявні ресурси можна розглядати післяжнивні рештки: соломку, побічну продукцію кукурудзи і соняшнику. В перспективі також можна залучати енергетичні культури.

Варто орієнтуватися на досвід існуючих аналогічних біоетанольних заводів і для подальших розрахунків обрати річну потужність виробництва біоетанолу другого покоління у межах 40...50 тис. т. на рік [47].

Дані розрахунків потреби у целюлолітичних ферментах для підприємства, яке випускатиме біоетанол другого покоління, наведені у *табл. 3.2.*

**Орієнтовна річна потужність цеху одержання целюлаз для забезпечення
виробництва біоетанолу другого покоління**

Цільова група споживачів	Річна потужність виробництва біоетанолу другого покоління, тис. тон	Кількість біоетанолу, яку можна отримати за допомогою 1 МО целюлази, г [45]	Загальна кількість целюлази, яку необхідно отримувати на рік, млн. МО
Підприємство з виробництва біоетанолу	40	0,59	23600

$$G_{\text{гп}} = 23600 \text{ млн МО (U)}$$

Зважаючи на те, що активність целюлази, отриманої в процесі культивування *Bacillus subtilis* MU S1 складає 566 U/мл [48], необхідно отримувати наступну

кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = \frac{23600 \times 1000000}{566 \text{ U/мл} \times 1000000} = \frac{23600000000}{566000000} \approx 42 \text{ м}^3$$

$((23600 \text{ МО} \times 1000000 \text{ (переведення в МО)}) / (566 \text{ U/мл} \times 1000000 \text{ (переведення U/мл в U/м}^3))) \approx 42 \text{ м}^3$.

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр.}} = 42000 / (1 - (0,3 + 0,1)) = 70000 \text{ л}$$

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

Для забезпечення річної потреби у целюлазі (згідно з п.1.2) потрібно отримати (з урахуванням втрат під час виділення) 70 м³ культуральної рідини.

Розрахуємо кількість культуральної рідини за цикл ферментації. Кількість трудоднів приймемо за 210, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_{\text{д}} = \frac{V_{\text{гп}}}{T_{\text{тр}}} = \frac{70000}{210} = 333 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл становитиме:

$$V_{\text{цк}} = \frac{K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,1 \times 333 \times 56}{24} \approx 855 \text{ л}$$

де $T_{\text{цф}}$ – робочий цикл ферментера, до складу якого входить тривалість виробничого біосинтезу (48 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год); K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

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

Визначивши об'єм КР за цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\text{Г}} = V_{\text{цк}}/K_3 = 855/0,6 = 1425 \text{ л}$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер

$$V=1500 \text{ л.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 855/1500 = 0,57 \text{ – перебуває в межах (0.55 -0.65)}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 855$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\text{ф}}) = 855/(1-0,15) \approx 1006 \text{ л,}$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$$V_{\text{роб.1}}=1006\text{л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6-0,7$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 1006/0,6 \approx 1677\text{л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 1600$ л,

та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 1006 / 1600 = 0,63.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_f) = 1006 / (1 + 0,1) \approx 914 \text{ л},$$

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

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 1006 - 914 = 92 \text{ л}.$$

Для одержання 92л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

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

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 92 / (1 - 0,10) \approx 102 \text{ л}.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 102 / (1 + 0,1) \approx 93 \text{ л},$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 102 - 93 = 9 \text{ л}.$$

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 102 \text{ л}$ можна одержати під час культивування дріжджів у посівному апараті

$$V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 102 / 0,6 = 170 \text{ л}.$$

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

$$K_{з1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 102 / 160 = 0,63.$$

Для одержання 9 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 9/(1-0,10) = 10 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3}/(1+X_{ін}) = 10/(1+0,1) \approx 9,1 \text{ л,}$$

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

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 10 - 9,1 = 0,9 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 431$ л можна одержати під час культивування дріжджів в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{ін3} = V_{роб.3}/K_{зап} = 10/0,6 \approx 17 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сф} = 20$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.3}/V_{сф} = 10/20 = 0,5.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{пм4} = 0,9$ л можна одержати культивуванням у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме $N_{колб} = V_{пм5}/(V_{колб} \cdot K_{зк}) = 900/750 \cdot 0,2 = 6$. Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 6 качалочних колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу буде відбуватись у ферментері об'ємом $1,6 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у три етапи.

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

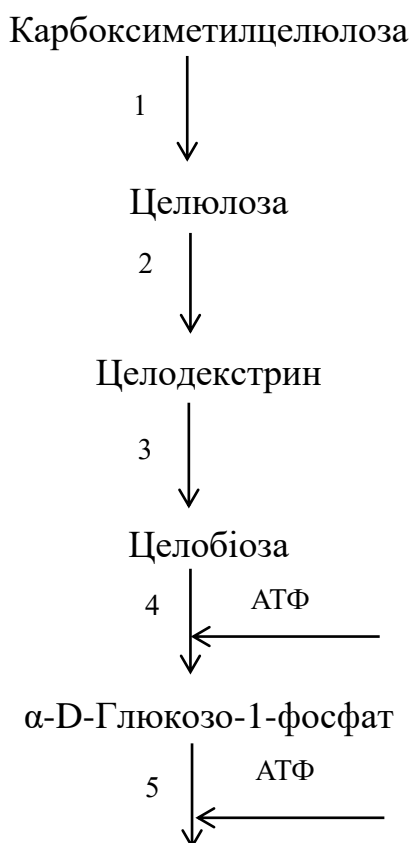
№ стадії	Об'єм культуральної рідини, $V_{кр}$, м³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини, $V_{роб}$, м³ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, м³ (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, м³ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, м³ (л)
1	2	3	4	5	6	7
IV	855	1006	92	914	0,6	1500
III	92	102	9	93	0,6	170
II	9	10	0.9	9.1	0,6	17
I	0.9	0.9	-	0.9	0,2	6 колб

Отже, процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу буде проходити в 3 етапи (4 етап сам виробничий біосинтез).

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

B. subtilis здатна рости як у поживних середовищах, так і в сольових середовищах із визначеним хімічним складом, у яких глюкоза, малат та інші прості цукри є джерелами вуглецю, а солі амонію або певні амінокислоти є джерелами азоту.

Як зазначають автори статті [49], даний мікроорганізм у процесі біосинтезу целюлази для виробництва біоетанолу використовує в якості субстрату карбоксиметилцелюлозу. Оскільки у KEGG немає штаму *Bacillus subtilis* MU S1, обираємо схему катаболізму у класичного штаму – *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168 (рис. 4.1) [50]. За умов росту на карбоксиметилцелюлозі, у таких бактерій функціонує шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколізу).



НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Годлевська М.А.		
Перевір.		Красінько В.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ				
		Літ.	Арк.	Акрівів
		26	91	
Кафедра БТМ				
28				

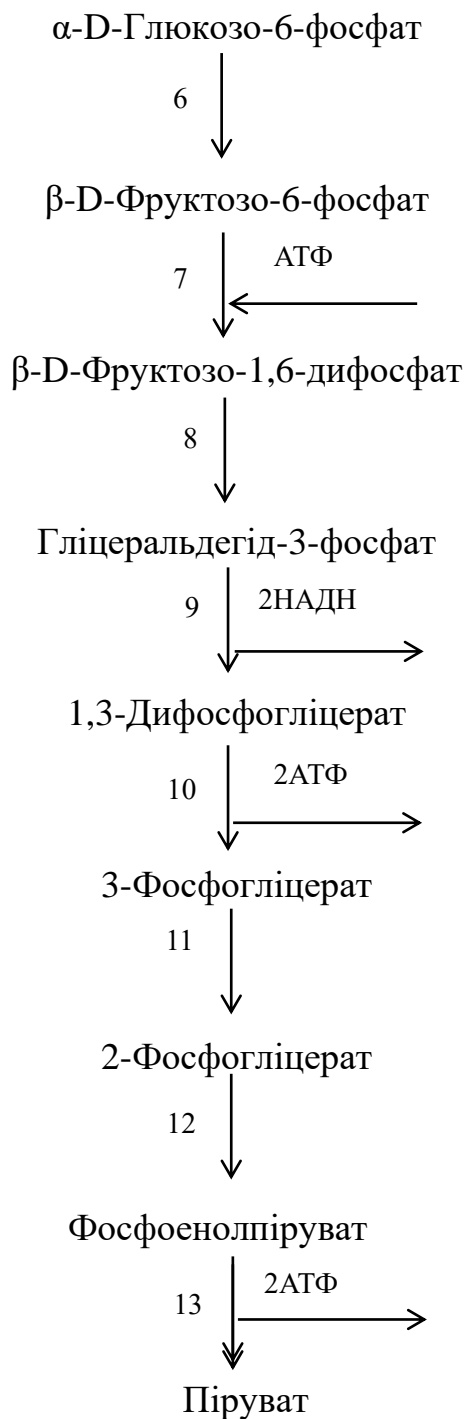


Рис. 4.1 Шлях катаболізму карбоксиметилцелюлози у *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168.

Ферменти: 1 – целюлаза (КФ. 3.2.1.4); 2 – эндоглюканаза (КФ.3.2.1.4); 3 – эндоглюканаза (КФ.3.2.1.4); 4 – целобіозо-фосфорилаза (КФ.2.4.1.20); 5 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 6 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 7 – фосфофруктокіназа (КФ.2.7.1.11); 8 – фруктозодифосфатальдоза (КФ.4.1.2.13); 9 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 10 – фосфогліцераткіназа

(КФ.2.7.2.3); 11 – фосфогліцеромутаза (КФ.5.4.2.11); 12 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 13 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *Vacillus subtilis* MU S1 з використанням карбоксиметилцелюлози як джерела вуглецю, внаслідок катаболізму субстрату утворюються різні продукти.

Целюлаза – фермент комплексної целлюлолітичної дії, розщеплює молекули целюлози на моносахариди (прості цукри), такі як бета-глюкоза.

Процес розкладання КМЦ розпочинається з гідролізу, внаслідок якого КМЦ розщеплюється на більш коротколанцюгові полісахариди, такі як целобіоза і целотриоза. Далі, ці коротколанцюгові полісахариди зазнають подальшого розщеплення до глюкози, що є основним метаболітним продуктом розкладання карбоксиметилцелюлози.

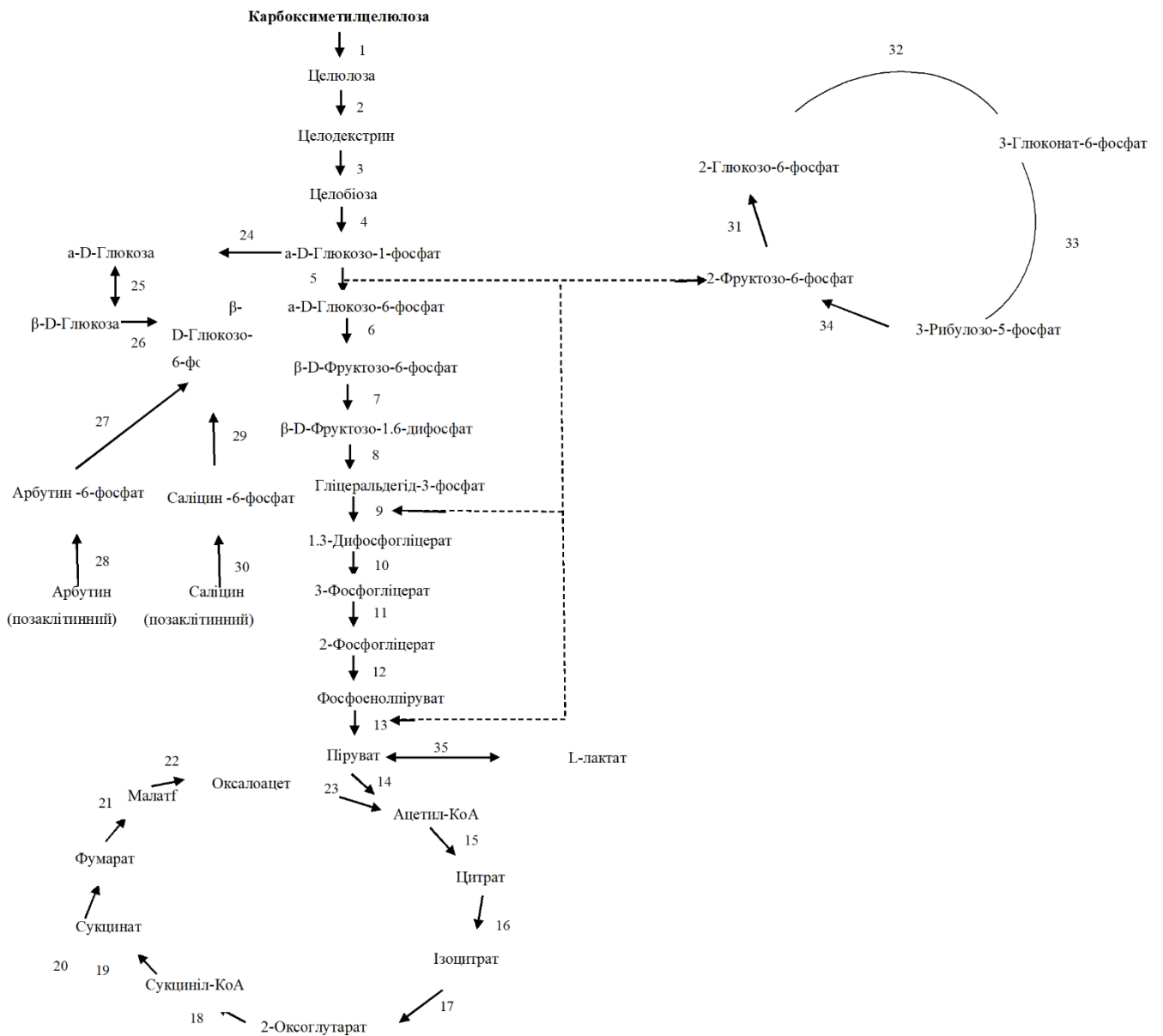
Глюкоза розщеплюється за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз). Глюкоза фосфорилується за участю АТФ і перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Глюкозо-6-фосфат залучається до пентозофосфатного циклу, де утворюються попередники ароматичних амінокислот – еритрозо-4-фосфат та фосфорибозилпірофосфат.

Піруват утворюється з фосфоенолпірувату за допомогою піруваткінази (КФ. 2.7.1.40). Частина пірувату, що утворилася відновлюється до лактату, а частина окиснюється до ацетил-КоА. Ацетил-КоА вступає у повний цикл трикарбонових кислот.

Ацетил-КоА вводиться в ЦТК в результаті цитрат-синтазної реакції, в якій оксалоацетат і ацетил-КоА конденсуються з утворенням цитрату, даний етап каталізується ферментом цитратсинтазою (КФ 2.3.3.1). Фермент ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42) каталізує реакції перетворення ізоцитрату на 2-оксоглутарат. Далі під дією 2-оксоглутаратдегідрогенази з 2-оксоглутарату утворюється сукциніл-КоА, який перетворюється на сукцинат за участю ферменту сукцинаттіокінази. Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1) окиснює сукцинат до фумарату[5]. Фермент фумараза (КФ 4.2.1.2) приєднує воду до

фумарату з подальшим утворенням малату. За участю ферменту малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) відбувається дегідрування малату до оксалоацетату. Всі реакції циклу трикарбонних кислот є оборотними, окрім утворення сукциніл-КоА.

Схема біотрансформації ростового субстрату у кінцевий продукт



Ферменти: 1- целюлаза (КФ 3.2.1.4); 2 – ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4); 3 – ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4); 4 – целобіозо-фосфорилаза (КФ 2.4.1.20); 5 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 7 – фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 8 –фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 9 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 10–фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 11 –фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 12 – енолаза (КФ4.2.1.11); 13 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 14 – дигідроліпоамідоацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.2); 15 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 16 – аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 17 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 18 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.4); 19 – сукциніл-КоА-лігаза (КФ 6.2.1.5); 20– сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 21 – фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2); 22–малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 23 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 24 – глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 25 – альдозо-1-епімераза (КФ 5.1.3.3); 26 –глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 27 – 6-фосфо-бета-глюкозидаза (КФ 3.2.1.86); 28 - цукор PTS система ЕПА компонент (КФ 2.7.1.-); 29 – 6-фосфо-бета-глюкозидаза (КФ 3.2.1.86); 30 – цукор PTS система ЕПА компонент (КФ 2.7.1.-); 31 – глюкозофосфатізомераза; 32- глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; 33–глюконат-6-фосфатдегідрогеназа; 34 – трансальдолаза і транскетолаза; 35 – L-лактатдегідрогеназа (КФ1.1.1.27).

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Вибір умов і способу культивування *Bacillus subtilis* MU S1

Умови і спосіб культивування *Bacillus subtilis* залежать від фізіолого-біохімічних особливостей.

Bacillus subtilis - це грампозитивна бактерія, яка має паличкоподібну форму, утворює терmostійкі спори, має джгутики. Росте на МПБ і МПА, а також на простих синтетичних живильних середовищах [51].

З точки зору характеру процесу культивування мікроорганізмів-продуцентів усі технологічні процеси поділяються на дві різні групи: в першому випадку ферментація ведеться глибинним методом у рідкому поживному середовищі, в другому - використовується поверхнева культура, яка росте на спеціально підготовленому пухкому і зволоженому поживному середовищі.

Поверхневий метод. Поверхневий метод культивування - це метод вирощування мікроорганізмів на поверхні поживних середовищ. Зазвичай цей метод використовується для вирощування грибів, для подальшого дослідження їхніх властивостей. Поверхневий метод культивування має ряд недоліків: в порівнянні з глибинним методом поверхневий метод є менш ефективним, тому що мікроорганізми можуть займати більше простору на поверхні та менш ефективно збирати поживні речовини. Поверхневий метод не завжди може забезпечити всі необхідні умови для росту мікроорганізмів, займає багато часу, вимагає певних вмінь. А так як культивування *B.subtilis* відбувається при температурі 37°C, то цілком можливий ризик контамінації. Саме тому найкращим рішенням буде обрати глибинний метод культивування [52].

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ					
Розроб.		Годлевська М.А.						Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.							31	91
Реценз.								Кафедра БТМ 33		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

Глибинний метод культивування полягає у введенні зразка матеріалу в спеціальну апаратуру, де він знаходиться під тиском і іншими фізичними параметрами (температурою, вологістю та ін.). Переваги даного методу: можливість культивування мікроорганізмів, які не зростають на поверхні середовища, висока ефективність культивування, менше ймовірності контамінації [52].

Виробництво целюлази можна здійснювати періодичним і безперервним способом. У періодичному способі культивування, мікроорганізми культивуються у партіях, коли певна кількість суміші додається до культивуючого середовища, а потім збирається продукція та очищається, потім процес повторюється.

Отже, культивування *Bacillus subtilis* MU S1 слід здійснювати глибинно-періодичним способом, підтримуючи аерацією стерильним повітрям.

5.2. Вибір типу ферментера для культивування *Bacillus subtilis* MU S1 - продуцента целюлази

Визначившись із способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов. Вибір типу ферментера (біореактора) здійснюється з урахуванням особливостей продуцента, складу поживного середовища, економічних міркувань.

Культивування *Bacillus subtilis* MU S1 передбачається здійснювати глибинним способом в ферментерах. Проведення культивування передбачає забезпечення інтенсивного перемішування та аерації. Система аерації має велике значення для аеробного процесу.

Барботер - це пристрій для пропускання через шар рідини пари або бульбашок газу. За допомогою барботерів відбувається аерація. Повітря, що подається, використовується для перемішування зростаючої культури,

забезпечення потреби мікроорганізму в кисні і відводу утворених метаболітів [53].

Барботер - це пристрій для пропускання через шар рідини пари або бульбашок газу. За допомогою барботерів відбувається аерація. Повітря, що подається, використовується для перемішування зростаючої культури, забезпечення потреби мікроорганізму в кисні і відводу утворених метаболітів[53].

Культивування *B.subtilis* передбачається здійснювати глибинним способом, за допомогою ферментеру з механічним перемішуванням барботажного типу.

Цей вид ферментера забезпечує рівномірне перемішування середовища культури, що забезпечує належні умови для росту і розвитку бактерій.

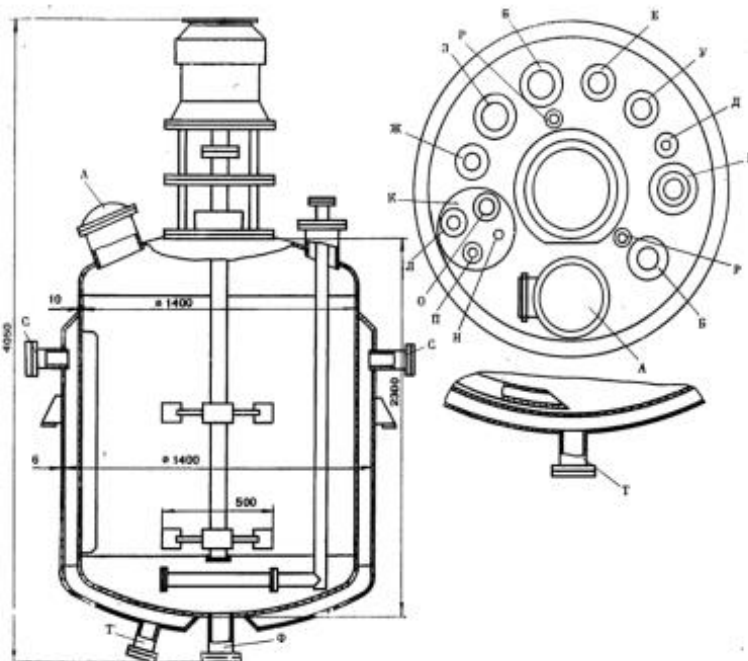


Рисунок 5.1 Ферментер для глибинного культивування [34]:

А – люк; Б – оглядове вікно; В – для труби барботера; Д – для завантаження піногасника; Е – завантаження поживного середовища та посівного матеріалу; Ж – для посіву; З – для труби передавлювання; К – резервний; Л – для взяття проби; Н – для манометра; О – для гільзи ртутного термометра; П – для термометра опору; Р – для очистки оглядових вікон; С – для входу охолоджуючої води чи

пару; Т – для виходу конденсата чи охолоджуючої води; У – для виходу повітря; Ф – для нижнього спуску.

Отже, для ферментації *Bacillus subtilis* MU S1 найкраще обрати ферменстер барботажного типу.

5.3. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Bacillus subtilis є аеробною бактерією, тому під час культивування потребує належну аерацію, саме тому ферменстер має бути оснащений барботером для подачі повітря.

Відбувається підготовка посівного матеріалу та інокуляту у приміщенні лабораторії та мікробіологічному боксі, де повітря піддається стерилізації за допомогою ультрафіолетового випромінювання.

Простий спосіб очищення повітря від мікроорганізмів – це здійснення фільтрації через мембранні або волокнисті фільтри. Стадії підготовки стисненого аераційного повітря :

- За допомогою трубокомпресора через забірну шахту відбувається забір атмосферного повітря на висоті від 2 до 3 метрів від найвищої точки будівлі. Це пов'язано з тим, що із збільшенням висоти концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується;
- З метою очищення повітря від пилу, захисту компресорів від забруднень та зниження рівня забруднення використовують фільтри попереднього очищення;
- Для подолання опору фільтрувальних матеріалів під час подальших етапів фільтрації і подолання гідравлічного опору під час диспергування повітря у культуральній рідині, повітря піддається стисненню у трубокомпресорі до 0.35-0.5 МПа. Ця операція призводить до підвищення температури повітря до 120°-250° С і зростання вологовмісту на одиницю об'єму.
- Для охолодження нагрітого під час стиснення повітря та видалення вологи в краплевловлювачі, використовують водяний теплообмінник.

- Для кінцевого видалення накопиченої вологи та вирівнювання тиску, повітря направляють у ресивер.
- Для видалення до 98% мікроорганізмів та очищення повітря, що надходить до всіх ферментерів виробничого приміщення, застосовують основні фільтри. Дані фільтри заповнені компресованим волокном і розташовані у цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря.

Фільтри для очищення повітря поділяються на 3 класи:

- фільтри грубого очищення (вони затримують частинки розміром більше 10 мкм);
- тонкого очищення (затримують частинки розміром більше 1 мкм);
- «абсолютні» фільтри, які з найбільшим ступенем очищення [54].

Фільтри тонкого очищення найефективніше затримують забруднюючі частинки в системах аспірації та вентиляції. Головною особливістю цього типу фільтрів є наявність спеціального фільтруючого матеріалу. Він складається з тонких синтетичних волокон, які затримують дрібні частинки. Абсолютні та НЕРА-фільтри в основному використовуються для створення антибактеріального повітряного середовища, захисту від ряду шкідливих викидів і підтримки чистоти виробничих приміщень.

Процес очищення повітря проводиться за допомогою індивідуальних фільтрів, потім воно подається через колектори від головних фільтрів. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення -99.99%.

5.4. Підготовка персоналу

«Принцип. Організація та функціонування відповідної системи забезпечення якості й належне виробництво лікарських засобів залежать від людей. Тому необхідна достатня кількість кваліфікованого персоналу для вирішення всіх завдань, які знаходяться у сфері відповідальності виробника. Кожен співробітник повинен чітко розуміти індивідуальну відповідальність, яка має бути документована. Весь персонал повинен знати принципи належної виробничої практики, що стосуються його діяльності, а також пройти первинне і

подальше навчання відповідно до його обов'язків, включаючи інструктаж з виконання гігієнічних вимог»[55].

1. **Освіта та Кваліфікація:** зазвичай для роботи на фармацевтичному підприємстві необхідна вища фармацевтична освіта або споріднена галузь. В окремих випадках може знадобитися додаткова спеціалізована кваліфікація.
2. **Досвід Роботи:** залежно від конкретної посади може вимагатися певний рівень досвіду в галузі фармації або виробництва медичних препаратів.
3. **Знання Регуляторних Норм:** працівники фармацевтичних підприємств повинні орієнтуватися на дотримання регуляторних вимог і стандартів. До цього входить ознайомлення з GMP (Належна виробнича практика) та іншими стандартами.
4. **Комунікаційні навички:** важливо мати здатність ефективно спілкуватися, особливо в умовах співпраці з іншими фахівцями та групами.
5. **Відповідальність і уважність:** дотримання точних стандартів і уважність до деталей є вельми важливими у фармацевтичній галузі.
6. **Здатність працювати в команді:** багато завдань у фармацевтиці вимагають співпраці та вміння працювати в команді.
7. **Аналітичні Навички:** здатність аналізувати дані, виявляти проблеми та розробляти ефективні рішення є ключовою для багатьох робочих позицій.
8. **Дотримання етичних норм:** працівники у фармацевтиці повинні дотримуватися високих етичних стандартів через потенційний вплив на здоров'я та безпеку пацієнтів.

Інструктаж для робітника фармацевтичного підприємства: інструктаж включає введення працівника в робочий процес та забезпечення йому необхідних знань та навичок [55].

Етапи інструктажу включають:

- Ознайомлення з умовами праці та знайомство з колегами.
- Знайомство з правилами безпеки на роботі та використанням засобів індивідуального захисту.

- Вивчення принципів НВП (GMP) та інших стандартів якості.
- Навчання використанню та обслуговуванню обладнання.

Навчання фармацевтичного персоналу – це комплексний процес, який охоплює кілька етапів та різноманітні види навчальних заходів. Для досягнення цієї мети використовують різні педагогічні методи, включаючи теоретичне навчання, організацію лекторіїв, проведення семінарів та інтерактивних тренінгів. Практична частина навчання охоплює майстер-класи та навчання на робочому місці, що сприяє засвоєнню практичних навичок [55].

Оцінка знань та вмінь персоналу також відіграє важливу роль у забезпеченні якості навчального процесу. Контроль знань через проведення залікових випробувань та інших оціночних заходів є ефективним інструментом для визначення рівня підготовки працівників та вдосконалення навчальних програм [55].

5.5. Підготовка обладнання та інвентарю

Підготовка устаткування, яка є важливою частиною санітарної підготовки виробництва, має на меті досягнення необхідного рівня чистоти та асептичності. До операцій, пов'язаних із підготовкою інокуляторів, ферментерів та установок для проведення безперервної стерилізації (УБС), включають такі етапи, як ***миття обладнання та перевірка його на герметичність*** [56].

Миття устаткування:

1. Спочатку проводиться миття водою протягом двох хвилин з передачею води у збірник нейтралізації перед скидом рідини у систему каналізування рідких викидів.
2. Подальше миття виконується розчином лугу 1% протягом 10 хвилин при 40 °С, з поверненням розчину в збірник нейтралізації.
3. Здійснюється ополіскування очищеною або пом'якшеною водою, з передачею води в збірник нейтралізації.

В разі наявності стійких до видалення забруднень на обладнанні (на поверхні) застосовується миття розчином кислоти 1%, при 20 °С, з повертанням розчину у збірник нейтралізації. Після цього проводиться ополіскування

очищеною або пом'якшеною водою, з передачею води в збірник нейтралізації, і завершується процес ополіскуванням очищеною водою протягом 5 хвилин, з повертанням води в збірник рециркуляційної води [56].

Сучасні підприємства часто використовують механізовані пристрої для миття обладнання, такі як гідромонітори. Мийні машини, наприклад, типу ММ-4А, і гідромонітори Г-13А використовуються для механічного миття устаткування. Останні опускаються всередину апарату через люк на опорному пристосуванні і, під дією струменя гарячої рідини під тиском, здійснюють очищення внутрішніх поверхонь [56].

Мийна машина ММ-4А та гідромонітор Г-13А використовуються для видалення забруднень при тиску від 0,6 до 1 Мпа і температурі до 80 °С. Такі пристрої дозволяють ефективно та швидко вимивати апарати, забезпечуючи відповідні санітарні стандарти [56].

5.6. Підготовка виробничих приміщень

Принципи відносно приміщень та обладнання у виробництві ґрунтуються на необхідності їхнього правильного розташування, проектування, конструювання, пристосування та експлуатації з урахуванням проведених операцій. Ці принципи спрямовані на мінімізацію ймовірності помилок, забезпечення ефективного очищення та обслуговування для запобігання перехресної контамінації, накопичення пилу чи бруду та будь-яких факторів, що можуть впливати на якість продукції [57].

При проектуванні та експлуатації приміщень слід враховувати і гарантувати мінімальний ризик контамінації, розглядаючи це як забруднення речовинами фізичного, хімічного та біологічного походження. Освітлення, температура, вологість і вентиляція повинні відповідати стандартам і не впливати негативно на лікарські засоби під час їх виробництва і зберігання, а також на функціонування обладнання. Такий підхід забезпечує найвищі стандарти якості та безпеки виробничого процесу [57].

Одним з важливих етапів підготовки приміщень є: їх очищення та дезінфекція. Очищення й контроль мікробного забруднення є критично

важливими у фармацевтичній промисловості. Щоб уникнути перехресної контамінації та подальшого мікробного забруднення для відповідності класам «чистих приміщень», потрібні надійні програми з очищення й дезінфекції [58].

Підготовка виробничих приміщень складається з обробки виробничих приміщень та лабораторії миючими та дезінфікуючими засобами, в деяких випадках із застосуванням УФ-ламп відповідно до затверджених інструкцій. Здійснюють щоденну підготовку та генеральну. Генеральну обробку здійснюють після закінчення виробничого циклу, бажано 1 раз на тиждень. Основний спосіб - розпилювання дезінфікуючого розчину з подальшим обмиванням водою і сушкою поверхні. Бажано змінювати дезінфікуючі розчини, щоб уникнути утворення резистентних форм мікроорганізмів. Дезінфікуючі та миючі засоби піддають контролю на мікробіологічну чистоту. Матеріали для прибирання повинні бути промарковані, зберігатись в спеціальних місцях [59].

Очищення – це видалення нежиттєздатного забруднення (наприклад, залишків продукту чи дезінфекційного засобу) фізичними засобами або відповідним агентами для надання видимої чистоти поверхні [60].

Дезінфекція – це процес, за допомогою якого зменшення кількості мікроорганізмів досягається незворотною дією засобу на їхню структуру або метаболізм до рівня, котрий вважають відповідним певній меті. Одні дезінфекційні засоби ефективні тільки проти вегетативних мікробів, тоді як інші – мають додаткову здатність ефективно знищувати бактерії та спори грибів [Помилка! Закладку не визначено.0].

Нормативні документи не вказують на обов'язкову ротацію дезінфекційних засобів та їхню кількість. У Додатку 1 GMP раніше було зазначено, що має бути використано більш ніж один тип деззасобу, те саме повторюється і в новій редакції. Потрібно переконатися, чи засоби мають різні способи дії, щоб їхнє комбіноване використання було ефективним проти бактерій і грибів. В інших регуляторних інструкціях також чітко зазначено, що дезінфекція має включати періодичне використання спорицидів. Багато підприємств регулярно використовують дезінфекційний засіб широкого спектра дії (наприклад,

ізопропіловий спирт IPA Micronclean і CONTEC CyChlor) почергово зі спорицидом для періодичного використання або дії в точці застосування (наприклад, CONTEC ProChlor). У табл. 5.1 наведено ефективний приклад схеми використання дезінфекційних засобів [Помилка! Закладку не визначено.0].

Таблиця 5.1

Схема використання дезінфекційних засобів

Дезінфекція	Використовується кожного дня на всіх поверхнях	Дезінфектант широкого спектра дії •Micronclean IPA (ізопропіловий спирт 70%) •Contec CyChlor (ефективний через 3 хв після обробки)
Дезінфекція	Періодично на основі моніторингу виробничого середовища й точки дії	Спорицид • Contec ProChlor – революційний спорицид, що забезпечує 100% знищення спор менш ніж за 1 хв • Contec PeridoxRTU – 3-хвилинна спорицидна дія з ефективністю 99,9999%
Змивання	Щодня після очищення й дезінфекції для видалення залишків	• Вода для ін'єкцій •Micronclean IPA • Витерти серветкою насухо
Очищення	Використовувати після технічного обслуговування або розливу і періодично для видалення утворених залишків	• Contec NeutraKlean – нейтральний рівень рН робить його придатним для використання в «чистих приміщеннях» усіх класів

5.7. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Поживні середовища для культивування мікроорганізмів повинні відповідати мінімальним вимогам, тобто вони повинні містити всі необхідні компоненти з яких будується клітина, і ці компоненти повинні бути в тій формі, яку мікроорганізми можуть засвоїти.

Для здійснення промислового виробництва продукту, середовище має бути економічно вигідним і при цьому забезпечувати високий рівень біосинтезу, легке виділення.

Середовище для виробничого біосинтезу має такий склад , г/л [61]:

Карбоксиметилцелюлоза – 10;

Дріжджовий екстракт – 1;

(NH₄)₂SO₄ – 1;

NaNO₃ – 0,1;
NaCl – 6;
KH₂PO₄ – 0,5;
K₂HPO₄ – 0,5;
MgSO₄ – 0,1;
CaCl₂ – 0,1.

5.7.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Стерилізацію поживного середовища для вирощування поживного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, тому що об'єм невеликий. Склад поживного середовища ділимо на композиції в залежності від режиму стерилізації компонентів:

Композиція А: карбоксиметилцелюлоза (режим стерилізації: 121°C, 30 хв);

Композиція Б: дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв);

Композиція В: NaCl, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, (режим стерилізації: 131°C, 40 хв);

Композиція Г: KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв);

Композиція Д: CaCl₂ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

**Перед стерилізацією композиції А проводиться попередня обробка карбоксиметилцелюлози. Етапи підготовки включають: суспендування та настоювання.*

Перед стерилізацією композиції А проводиться попередня обробка карбоксиметилцелюлози. Етапи підготовки включають: суспендування та настоювання. Далі після приготування 4 композицій, проводимо їх змішування у асептичних умовах і після цього розливаю у 6 колб.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,9 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Карбоксилметил целюлоза	10	9	А	0,175
Вода		0,175		
Дріжджовий екстракт	1	0,9	Б	0,175
Вода		0,175		
NaCl	6	5,4	В	0,200
MgSO ₄	0,1	0,09		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	0,9		
NaNO ₃	0,1	0,09		
Вода		0,200		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,45	Г	0,175
Вода		0,175		
CaCl ₂	0.1	0.09	Д	0.175
Вода		0.175		

5.7.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Для вирощування інокуляту в посівному апараті потрібно 9 л поживного середовища, умови стерилізації та склад композицій аналогічні пункту 5.7.1. Стерилізацію всіх композицій здійснюють в автоклаві. Для того щоб здійснити засів поживного середовища необхідно внести 0.9 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композицій буде становити 8.1 л.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 20 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 10 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Карбоксилметил целюлоза	10	90	А	0.200
Вода		0.200		
Дріжджовий екстракт	1	9	Б	0.50
Вода		0.50		
NaCl	6	54	В	8.8
MgSO ₄	0,1	0.9		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	9		
NaNO ₃	0,1	0.9		
Вода		7.9		
Конденсат		0.8		
KH ₂ PO ₄	0,5	4.5	Г	0.50
Вода		0.50		
CaCl ₂	0.1	0.9	Д	0.50
Вода		0.50		
Разом:		8.1		9.1

Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора 160 л

Для отримання посівного матеріалу потрібно приготувати 102 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (табл 5.4) з урахуванням конденсату. Для того щоб здійснити засів поживного середовища в інокуляторі необхідно внести 9 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композицій буде становити 93 л.

Таблиця 5.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 102 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 102 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Карбоксилметил целюлоза	10	1020	А	2.0
Вода		2.0		
Дріжджовий екстракт	1	102	Б	0.200
Вода		0.200		
NaCl	6	612	В	90.7
MgSO ₄	0,1	10.2		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	102		
NaNO ₃	0,1	10.2		
KH ₂ PO ₄	0,5	51		
Вода		81.6		
Конденсат		9.07		
CaCl ₂	0.1	10.2	Г	0.100
Вода		0.100		
Разом:		93		93

5.7.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Вирощування інокуляту в посівному апараті 1.6 м³

Для цієї стадії потрібно 1006 л поживного середовища . Ділимо склад поживного середовища на такі композиції:

Композиція А: карбоксиметилцелюлоза (режим стерилізації: 121°C, 30 хв);

Композиція Б: дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв);

Композиція В: NaCl, MgSO₄, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131°C, 40-60 хв).

Композиція Г: CaCl₂ (режим стерилізації: 131°C, 40-60 хв).

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 1.25 м³, наведений у таблиці 2.3. Для цієї стадії необхідно 1006 л поживного середовища, для того щоб здійснити посів поживного середовища необхідно

внести 92 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість композицій буде становити 914 л.

Таблиця 5.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1006 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 1006 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Карбоксилметил целюлоза	10	10060	А	20.0
Вода	192.6			
Конденсат	21.4			
Дріжджовий екстракт	1	1006	Б	2.0
Вода	2.0			
NaCl	6	6036	В	886.7
MgSO ₄	0,1	100.6		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1006		
NaNO ₃	0,1	100.6		
KH ₂ PO ₄	0,5	503		
Вода	807.0			
Конденсат	89.6			
CaCl ₂	0.1	100.6	Г	0.300
Вода	0.300			
Разом:	914			914

5.8. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН

Перед здійсненням культивування рекомендується використовувати розчини HCl (6%) і NaOH для регулювання рівня рН. Додавання HCl перед стерилізацією є необхідним для запобігання випадіння осадів фосфорних солей магнію, заліза та марганцю під час нагрівання розчину солей в апараті. Оптимальне значення рН для *Bacillus subtilis* знаходиться в межах від 6.5 до 7.5, за допомогою розчину NaOH доведемо до цього значення.

Таблиця 5.6

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	NaOH		HCl (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
93	186 мл	у колбі на 450 мл	186 мл	у колбі на 450 мл
914	1828 мл	у бутлі на 3 л	1828 мл	у бутлі на 3 л

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в *табл. 6.1*. Список використаних для підбору обладнання інформаційних джерел наведений під таблицею.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірний пристрій для забору свіжого повітря в систему вентиляції. Лабіринтова структура забезпечує хорошу стійкість (дощ, сніг, град) у штормову погоду (швидкість вітру до 25 м/с). Матеріал - листовая сталь з цинк-магнієвим покриттям (ZM310). Рекомендований максимальний перепад тиску 40 Па. Компанія: «ETS NORD» (Естонія) [1*]
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – поліестер, швидкість фільтрування 3 м ³ /год, Е = 80 % [2*].
К – 3	Компресор	1	Тип компресора: масляний Продуктивність компресора, л/хв: 1000 Об'єм ресивера компресора, л: 220 Тиск компресора, бар: 8 Характеристики енергопостачання (приводу, двигуна) Тип двигуна: електричний Число циліндрів: 3 Напруга мережі живлення, В: 380 Число фаз мережі живлення: 3 Потужність, кВт: 7.5 Кількість оборотів, об/хв: 900 Виробник: Україна[3*].

НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Годлевська М.А.		
Перевір.		Красінько В.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			Літ.	Арк.
				46
			Акрюшів 91	
			Кафедра БТМ 48	

Продовження таблиці 6.1

ТО – 4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Витрата: до 640 м ³ /год Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195 °С- +220 °С Нержавіюча сталь AISI 316 Виробник: Швеція [4*].
Р – 5	Ресивер	1	Виробник: ТОВ "ЗЕО Лідер" Гарантійний термін: 10 років Об'єм ресивера: 900 л Максимальний робочий тиск: 10 бар Максимальний перевірочний тиск: 13 бар Положення монтажу: Вертикальний Габаритні розміри ДхВ: 2023 x 908 Приєднувальне різьблення 1: G2" Товщина сталі: СтЗсп/5мм Вихідне з'єднання: 2 Робоча температура +5...+40 °С Країна виробник: Україна[5*].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Кількість повітря, м ³ /год: 4500 Необхідна теплова потужність, кВт (від -100С до +200С): 45 кВт Виробник: Україна[6*].
Ф – 7	Фільтр тонкої очистки	1	Компактний кишеньковий фільтр класу F9 («New filter»). Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; E>95% [7*].
НВ – 22	Насос відцентровий	1	Циркуляційний насос Grundfos Насос відцентровий герметичний, матеріал чавун. Продуктивність від 3,2 м ³ /год, Максимальний тиск – 10бар. Виробник: Данія[8*].
33-8 33-10	Збірник - змішувач	2	Збірник-змішувач об'ємом 15л. Ємність з нержавіючої сталі технічних або харчових марок AISI 304 або AISI 316, оснащена теплоізолюваною сорочкою нагріву, приводом обертання, вузлом ущільнення, валом з рамною мішалкою і щитом управління. Ємність реактора має герметичні вузли завантаження та вивантаження. Щит управління, обладнаний датчиком-регулятором нагріву, частотним перетворювачем, кнопками запуску і зупинки перемішуючого пристрою, кнопками запуску і зупинки насоса (встановлюється додатково), кнопкою аварійної зупинки і системою захисту управління двигуна.. Виробник: Україна [9*].

Продовження таблиці 6.1

ЗЗ-12	Збірник - змішувач	1	Скляний хімічний двошаровий реактор на 20 літрів з сорочкою. Оснащений перемішуючим пристроєм Виробник: Україна [10*].
РЗ-14	Реактор - змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 40л. Хімічний реактор являє собою ємність з нержавіючої сталі технічних або харчових марок AISI 304 або AISI 316, оснащену теплоізолюваною сорочкою нагріву, перемішуючим пристроєм, вузлом ущільнення і щитом управління. Ємність реактора має герметичні вузли завантаження та вивантаження. Щит управління, обладнаний датчиком-регулятором нагріву, частотним перетворювачем, кнопками запуску і зупинки перемішуючого пристрою, кнопками запуску і зупинки насоса (встановлюється додатково), кнопкою аварійної зупинки і системою захисту управління двигуна. Виробник: Україна [11*].
ОВД-9 ОВД-11 ОВД-13 ОВД-15	Об'ємно-ваговий дозатор	4	Дозатор марки ДВСВ-50. Дозатор напівавтоматичний (гравітаційного типу). Виробник: Україна [12*].
ІН-16	Інокулятор	1	Інокулятор 20л нержавіюча сталь AISI 304, 316L Температура: робоча до +50 (при стерилізації +122) Діапазон швидкості мішалки: 300 грм для клітинних культур, 1000 - 1500 грм (в залежності від розміру ємності) для бактерій Повне програмування : автоматичне піногасіння та регулювання Ph Габарити реактора: 945x680x1350 Маса: 155 кг Виробник: Україна [13*].
ІН-18	Інокулятор	1	Інокулятор 160л. Температура: до 70°C, 130°C для стерилізації (електронагрів або імпульсний пар) Стерилізація на місці, паром Діапазон швидкості мішалки: 300 грм для клітинних культур, 1000 - 1500 грм (в залежності від розміру ємності) для бактерій Підлогова версія 1900 x 1020 x 750 мм (максимально) Виробник: Україна [14*].

Закінчення таблиці 6.1

Ф-17 Ф-19 Ф-21	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Стерилізуючі фільтри з політетрафторетилену. Ступінь очищення повітря фільтром становить 99,9999 %.[15*].
ФР-20	Ферментер	1	Виробничий ферментер геометричний об'єм 1500л нержавіюча сталь AISI 304, 316L Температура: робоча до +50 (при стерилізації +122) Діапазон швидкості мішалки: 300 грм для клітинних культур, 1000 - 1500 грм (в залежності від розміру ємності) для бактерій Повне програмування : автоматичне піногасіння та регулювання Ph Габарити реактора, мм: 1740x1530x2530 Виробник: Україна [16*].

1*. URS Air Intake Device [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://pim.etsnord.com/data/RDT-008_URS_en.pdf .

2*.Фільтруючий матеріал G4 від NEW FILTER [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>

3*.Компрессор масляный воздушный Tesla Weld AIR 1000 [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://teslaweld.com/kompressor-tesla-weld-air-1000?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAjrArBhAWeIwA2qWdCJWunv5oQ5o-IEOFri2LunApMURc9kj_ZbrYtGLJK0HCdGZg0UjVZBoChywQAvD_BwE

4*.ТЕПЛООБМЕННИКИ ДЛЯ КОТЛОВ, ВЕНТИЛЯЦИИ, КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-naznacheniyu/teploobmenniki-dlya-kotlov-ventilyacii-kondicionirovaniya>

5*.Ресивер Воздушный Лидер 10 бар 900 л. PB900.818.01 для компрессора (PRM011528) [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://tusk.ua/product/resiver-vozdushnyij-lider-10-bar-900-l-rv90081801-dlya-kompressora/?utm_source=cpc_tusk&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAjrArBhAWeIwA2qWdCIQNxQSGpZ4d9Wj7KmT-TzHbV1uV5WSD1AyqUaAEA35TBRgJJUCjVhoCaX8QAvD_BwE

6*.Система підігріву повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php

7*.Кишенькові фільтри F5 для вентиляції від NEW FILTER [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/kishenkovi-filtri-f5-dlya-ventilyatsiyi.html>

8*.Насос Grundfos UPS [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://modernsys.com.ua/tsirkulyatsionnyu-nasos-grundfos-ups-25-60-130-19121.html>

- 9*.ЛАБОРАТОРНИЙ РЕАКТОР 15 Л [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/laboratornyj-reaktor-15-l>
- 10*.Скляний хімічний двошаровий реактор на 20 літрів з сорочкою [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1898565994-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAjrArBhAWEiwA2qWdCJP3cmtXOws_u5vQ3LtyYBSi1uYoKAdgwoyRYIi8cLQ9O6TjVKO4mRoCEK0QAvD_BwE
- 11*.РЕАКТОР ГОМОГЕНІЗАТОР 40Л [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/reaktor-gomogenizator-40l>
- 12*.Комбінований дозатор [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://sweda.com.ua/ua/produksiya/kombinirovannyi-dozator/>
- 13*.Ферментер ФР 20 автоматичне піногасіння та регулювання Ph [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://promvit.com.ua/fermenter-fr-20-avtomatichne-pinogasinnya-ta-regulyuvannya-ph/>
- 14*.Ферментери (біореактор) Techfors, Infors [Електронний ресурс] //Режим доступу:<https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors/>
- 15*.Стерилізуючі фільтри для газів [Електронний ресурс] //Режим доступу: <http://novafilter.tech/products/f%D1%96ltri/steril%D1%96zuushh%D1%96/dyagaz%D1%96v>
- 16*.Реактор-ферментер РФ-1500 для біологічних препаратів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-fermentator-1500-l-dlya-proizvodstva-sredstv-zashhity-rastenij/>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

Повітря, яке використовується для аерації повинно бути стерильним та мати температуру 30-35°C. До того як повітря потрапить у ферментер, воно проходить очищення та стерилізацію. Очищене повітря в ферментер подається через барботер.

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Здійснюють забір атмосферного повітря за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником (ПЗ-1) у найвищій точці Н=20 м.

ДР 1.2 Очищення від пилу і механічних часток

Очищення повітря здійснюють тканинним фільтром грубого очищення (ФГО-2). Грубі домішки видаляються з ефективністю E=90% і затримуються частинки діаметром більше 50 мкм.

ДР 1.3 Стиснення повітря

Здійснюється стиснення повітря у компресорі (К-3) при тиску 0.35МПа і нагрівається повітря до 200°C.

ДР 1.4 Охолодження та видалення вологи

Отримане стиснене повітря охолоджують у охолоджуючому теплообміннику (ТО-4) до температури «точки роси» (25-30°C). У крапельловлювачі ресивера (Р-5) відбувається видалення зайвої вологи. У ньому також усуваються пульсації руху повітря, котрі можуть мати негативний вплив на роботу подальших фільтрів очистки повітря. Вологість повітря має складати 60-70%.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ			
Розроб.		Годлевська М.А.			РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					51	91
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.						53		
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.5. Стабілізація та нагрівання

Для стабілізації тиску та температури повітря далі підігривають до температури 50°C у теплообміннику-нагрівачі (ТН-6). Вологість повітря має складати 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр очистки (Ф-7) для досягнення ступеня чистоти в 98-99%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря подають до індивідуального фільтра (Ф-8), встановленого безпосередньо перед ферментером, для забезпечення очищення повітря на 99,999%. Фільтр являє собою гофрований фільтрувальний папір на основі ультра і мікротонкого скловолокна. У фільтруючому матеріалі наявні скляні волокна діаметром 0,25 – 1,0 мкм.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 160л

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{180 \cdot 6}{100} = 11,16 \text{ г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 2016 мл)}$$

На технічних вагах зважують 11,16 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 500 мл, і додають 186 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 60 хв.

ДР 2.2 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для ферментера 1.6 м³.

Для корегування рН необхідно приготувати титрувальний розчин з розрахунку 2мл/л культуральної рідини.

$$m(\text{NaOH}) = \frac{1828 \cdot 6}{100} = 109,68 \text{ г (потрібно для приготування 6 \% NaOH об'ємом 2016 мл)}$$

На технічних вагах зважують 110 г NaOH. Наважку поміщають у бутль об'ємом 3 л, і за допомогою мірника відміряють 1828 мл дистильованої води, та додають до бутля, перемішують. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С упродовж 60 хв.

ДР 2.3 Підготовка титрувального агенту HCl для інокулятора 160л.

Стерильний розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах. Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 184мл):

$$0,36x = 0,06 \times 186$$

$$0,36x = 11,16$$

$$x = 31 \text{ мл (36\% – і HCl)}$$

Розрахунок кількості стерильної води необхідної для приготування 186 мл 6 % HCl:

$$186 - 31 = 155 \text{ мл (стерильної дистильованої H}_2\text{O)}$$

Приготування кислоти відбувається у стерильній колбі об'ємом 500 мл. В асептичних умовах відміряють 31 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають в стерильну колбу об'ємом 450 мл, і додають 155 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 2.4 Підготовка титрувального агенту HCl для ферментера 1,6 м³.

Стерильний розчин HCl готують змішуванням концентрованої HCl з стерильною дистильованою водою в асептичних умовах.

Розрахунок кількості 36 % HCl необхідної для приготування титрувального агента (концентрацією 6 %, об'ємом 1828 мл):

$$0,36x = 0,06 \times 1828$$

$$0,36x = 109,68$$

$$x = 304.66 \text{ мл (36\% – і HCl)}$$

Розрахунок кількості стерильної води необхідної для приготування 1828 мл
6 % HCl:

$$1828 - 304.66 = 1523.3 \text{ мл (стерильної дистильованої H}_2\text{O)}.$$

В асептичних умовах відміряють 304 мл концентрованого 36% розчину HCl, та поміщають у бутль об'ємом 3 л, і додають 1523 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують.

ДР 3 Попередня підготовка КМЦ

ДР 3.1 Суспендування та настоювання КМЦ для колб на качалках

На даному етапі здійснюється попередня підготовка КМЦ, наважку карбоксиметилцелюлози зважують 9 г, поміщають у колбу об'ємом 750 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 175 мл води питної, перемішують. Перед етапом стерилізації КМЦ попередньо настоюють та суспендують. Після готову композицію подають на етапи стерилізації до ДР 4.1.1.

ДР 3.2 Суспендування та настоювання КМЦ для інокулятора 20 л

На даному етапі здійснюється попередня підготовка КМЦ, наважку карбоксиметилцелюлози зважують 90 г, поміщають у колбу об'ємом 750 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 0.200 л води питної, перемішують. Перед етапом стерилізації КМЦ попередньо настоюють та суспендують.

ДР 3.3 Суспендування та настоювання КМЦ для інокулятора 160 л

На технічних вагах зважують 1020 г карбоксиметилцелюлози. Наважку поміщають у бутль об'ємом 4 л. За допомогою мірного циліндра подають 2.0 л води питної, перемішують. Перед етапом стерилізації КМЦ попередньо настоюють та суспендують.

ДР 3.4 Суспендування та настоювання КМЦ для ферментера 1,6 м³

Через об'ємно-ваговий дозатор (ОВД-14) вносять 10060 карбоксиметилцелюлози до ректора-змішувача (РЗ-14) об'ємом 40 л. Через конектор, за об'ємно-ваговий дозатор додають 20 л води питної, перемішують. Перед етапом стерилізації КМЦ попередньо настоюють та суспендують.

ДР 4 Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Розрахунок кількостей компонентів для приготування середовища об'ємом 0,9 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках.

ДР 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

Готовий розчин КМЦ (від ДР 3.1) подають на стерилізацію. Колбу з розчином закривають ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 121°C, 30 хв.

ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 0,9 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 175 мл води питної, перемішують. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 112°C, 30 хв.

ДР 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують NaCl - 5,4 г, MgSO₄ - 0,09, (NH₄)₂SO₄ - 0,9, NaNO₃ - 0,09, поміщають у колбу об'ємом 750 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 200 мл води водопровідної, перемішують. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131°C, 60 хв.

ДР 4.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують KН₂РO₄ - 0,45 г, поміщають у колбу об'ємом 750 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 150 мл води водопровідної, перемішують. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131°C, 60 хв.

ДР 4.1.5 Приготування та стерилізація композиції Д

На технічних вагах зважують СаСl₂ - 0,09 г, поміщають у колбу об'ємом 750 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 175 мл води водопровідної, перемішують. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131°C, 60 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для Інокулятора 20 л.

Для отримання посівного матеріалу потрібно приготувати 10 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено в (*табл.5.3*).

Для того щоб здійснити засів поживного середовища в інокулятор необхідно внести 0.9 л посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції буде становити 9.1 л.

ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

Готовий розчин КМЦ (від ДР 3.2) подають на стерилізацію. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 121°C, 30 хв.

ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 9 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу об'ємом 150 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 0,50 л води питної, перемішують. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 112°C, 30 хв.

ДР 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

Через об'ємно ваговий дозатор (ОВД-9) зважують NaCl - 54 г, MgSO₄ - 0,9, (NH₄)₂SO₄ - 9, NaNO₃ - 0,9, наважку поміщають у збірник-змішувач на 15 л (ЗЗ-8), додаєм 7.9 л, готовий розчин перекачуємо в інокулятор (ІН-15). Стерилізація композиції В буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі шляхом подачі глухої пари в сорочку та гострої пари в середину апарата при 131°C, 40 хв.

ДР 4.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують КН₂Р₀4 – 4.5 г, поміщають у колбу об'ємом 100 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 0,050 л води водопровідної, перемішують. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131°C, 60 хв.

ДР 4.2.5 Приготування та стерилізація композиції Д

На технічних вагах зважують $\text{CaCl}_2 - 0.9$ г, поміщають у колбу об'ємом 100 мл. За допомогою мірного циліндра наливають 0,050 л води питної, перемішують. Потім закривають колбу ватно-марлевою пробкою і здійснюють стерилізацію в автоклаві при 131°C , 60 хв.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для інокулятора на 160л.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 93 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 102 л поживного середовища наведено в(*табл.5.4.*).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 9 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 93 л (з урахуванням конденсату).

ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

Готовий розчин КМЦ (від ДР 3.3) подають на стерилізацію. Стерилізацію здійснюють при 121°C , 30 хв.

ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 102 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у колбу 400 мл та допомогою мірного циліндра відміряють 200 мл питної води, перемішують. Стерилізацію здійснюють при 112°C , 30 хв.

ДР 4.3.3 Приготування та стерилізація композиції В

Через об'ємно ваговий дозатор (ОВД-11) зважують $\text{NaCl} - 552$ г, $\text{MgSO}_4 - 9.2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 92$, $\text{NaNO}_3 - 9.2$ та $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 46$ г поміщають у збірник – змішувач (33-10) об'ємом 15 л та через конектор, за допомогою об'ємно-вагового дозатора додають 10 л питної води, перемішують (весь інший залишок води, з врахуванням конденсату, а саме 71.6 л води подають через автоматизований лічильник для води в інокулятор (ІН-18)). Тоді, готовий розчин солей самопливом подають до інокулятора. Перед стерилізацією солей композицію доводять до рН 4, розчином HCl . Стерилізація **композиції В** буде відбуватися безпосередньо в інокуляторі.

Подача пари відбувається через барботер апарату. Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 40 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 4.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують CaCl_2 -10.2г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл, наливають 0.100 мл води питної, перемішують. Стерилізацію здійснюють при 121°C, 30 хв.

ДР 4.4 Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера на 1,6 м³.

Для одержання посівного матеріалу на даному етапі необхідно приготувати 1006 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 1006 л поживного середовища наведено в (табл.5.5.).

Для засіву поживного середовища в інокулятор необхідно внести 92 л рідкого посівного матеріалу, тому сумарна кількість води для композиції становить 914 л (з урахуванням конденсату).

ДР 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А

Підготовлений розчин КМЦ (від ДР 3.4), який попередньо готували у реакторі –змішувачі (РЗ-14), у ньому ж проводять стерилізацію. Стерилізацію композиції здійснюють гострою парою. подача пари відбувається через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 112°C, тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації. Тоді, стерильну композицію А самопливом подають до ферментера (ФР-20).

ДР 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1006 г дріжджового екстракту. Наважку поміщають у бутль об'ємом 4 л, додають 2 л води питної, перемішують. Стерилізацію композиції здійснюють в автоклаві. Температура стерилізації – 112°C, тривалість – 30 хв.

ДР 4.4.3 Приготування та стерилізація композиції В

Через об'ємно ваговий дозатор (ОВД-13) зважують NaCl - 6036 г, MgSO_4 – 100,6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1006, NaNO_3 – 100,6 та KH_2PO_4 – 503 г поміщають у збірник –

змішувач (ЗЗ-12) об'ємом 20л та через конектор, за допомогою об'ємно-вагового дозатора додають 10л питної води, перемішують (весь інший залишок води, з врахуванням конденсату, а саме 876.7 л води подаємо через автоматизований лічильник води в ферментер (ФР-20)). Тоді, готовий розчин солей самопливом подають до ферментера. Перед стерилізацією солей композицію доводять до рН 4, розчином HCl. Стерилізація **композиції В** буде відбуватися безпосередньо в ферментері. Подача пари відбувається через барботер апарату.

Одночасно в сорочку апарату подають глуху пару. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 40 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 4.4.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах зважують CaCl_2 –100,6 г. Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають 300 мл води питної, перемішують. Стерилізацію композиції здійснюють в автоклаві. Температура стерилізації – 131°C, тривалість – 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* MU S1 зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром з додаванням КМЦ при температурі 4°C. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 5.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках зі скошеним МПА з додаванням карбоксилметилцелюлози, розсівають петлею із ізолюваних колоній на чашки Петрі, які також містять МПА із карбоксилметилцелюлозою і вирощують при температурі 37 °C упродовж 24 год.

ТП 5.3 Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізолювані колонії (від **ТП 4.2**) пересівають в пробірки зі скошеним МПА із КМЦ (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год.

ТП 5.4 Вирощування культури в колбах на агаризованому середовищі

Для вирощування рідкого посівного матеріалу, у стерильні 6 качалочних колб об'ємом 750мл, в асептичних умовах наливають по 175 мл посівного середовища від ДР 3.1. У пробірку з робочою культурою *B. subtilis* MU S1, вирощеною на МПА із карбоксиметилцелюлозою, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Вирощування *B.subtilis* MU S1 здійснюють у колбах на качалці (150 об/хв) при температурі 37°C протягом 24 год. Після цього посівний матеріал з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1500 мл. Далі з колби відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю.

ТП 5.5. Вирощування в інокуляторі 20 л

У попередньо простерилізований інокулятор (ІН-16), через засівну колбу, стерильно вносять 0,200 л композиції А (від ДР 3.2.1), композиції Б (від ДР 3.2.2), композиції В (від ДР 3.2.3) та композиції Г (від ДР 3.2.4). Охолоджують компоненти суміші в інокуляторі (ІН-16) шляхом подачі холодної води в сорочку апарата. Після цього вносять посівний матеріал (від ДР 4.4.). Всі операції проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (450-500 об/хв), подачу повітря у барботер, температуру 37±1°C підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 24 год. Кожні 8 год з ферментера відбирають 200 мл зразку культуральної рідини для мікробіологічного та техніко-хімічного аналізу.

ТП 5.6. Вирощування в інокуляторі 160 л

У попередньо простерилізований інокулятор з 93 л Композиції В (від ДР 3.3.3) через засівну колбу, стерильно вносять 2.0 л і композиції А (від ДР 3.3.1) та композицію Б (від ДР 3.3.2). Охолоджують компоненти суміші в інокуляторі (ІН-18) шляхом подачі холодної води в рубашку апарата. Перед початком культивування середовище доводять до рН 7.1 розчином NaOH. Після цього через трубу перетискання подають посівний матеріал від ТП 4.5.. Всі операції

проводять в асептичних умовах. Вмикають мішалку (450-500 об/хв), подачу повітря у барботер, температуру $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ підтримують подачею гарячої або холодної води в сорочку, тривалість культивування 24 год. Кожні 8 год з ферментера відбирають 200 мл зразку культуральної рідини для мікробіологічного та техніко-хімічного аналізу.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері об'ємом $1,6\text{ м}^3$. У попередньо простерилізований ферментер (ФР-20) з розчином солей (від ДР 3.5.3) в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 3.5.1) та композицію Б (від ДР 3.5.2). Охолоджують компоненти суміші у ферментері. Перед початком культивування середовище доводять до рН 7.1 розчином NaOH. Далі через трубу перетискання подається посівний матеріал (від ТП 4.6). Перемішуючим пристроєм є турбінна мішалка. Швидкість перемішування становить 450-500 об/хв. Вмикають мішалку, барботер, температура $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, тривалість культивування 24 год. Культивування припиняють за досягнення в культуральній рідині активності ферменту не нижче 566,66 Од/мл. Кожні 8 год з ферментера відбирають 200 мл зразку культуральної рідини для мікробіологічного та техніко-хімічного аналізу.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Контроль процесу біосинтезу включає визначення концентрації біомаси, джерела азоту і вуглецю, целюлазну активність, мікробіологічний контроль чистоти виробничої культури та стерильності поживних середовищ.

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюється двома способами: посів на агаризоване середовище і мікроскопічне спостереження.

Мікроскопічне спостереження проводять під оптичним мікроскопом з імерсійною системою. Метод приготування полягає в наступному: краплею з мікроорганізмами наносять на знежирене предметне скло. Для рівномірного розподілу краплі на предметному склі використовують бактеріальну петлю. Мазку дають висохнути при кімнатній температурі. Потім на висушене предметне скло наносять 1-2 краплі імерсійної олії.

При здійсненні мікроскопіювання мають спостерігатися лише клітини біологічного агента *Bacillus subtilis* MU S1: прямі палички розміром 0.7 мкм із заокругленими кінцями, часто знаходяться попарно або ланцюжками. Грампозитивні бактерії, тому що наявний пептидоглікан у клітинній стінці. Наявні джгутики, сприяють рухливості. Ендоспори овальної форми і не більші за клітину. Після мікроскопічного дослідження залишки імерсійної олії на об'єктиві слід видалити тампоном, змоченим етиловим спиртом [62].

Прямий висів на агаризовані поживні середовища (проводиться шляхом посіву культур до ізольованих колоній на чашки Петрі з сусло-агаром. Маємо спостерігати лише ріст культури *Bacillus subtilis* MU S1.

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ					
Розроб.	Годлевська М.А.							Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Красінько В.О.								62	91
Реценз.								Кафедра БТМ 64		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

Стерильність поживних середовищ

Поживні середовища, які не мають в складі термолабільних компонентів, стерилізують в автоклаві, тобто середовище піддається впливу високого тиску та температури пару протягом певного часу [63].

8.2. Концентрація біомаси

Визначення біомаси здійснюється за оптичною густиною клітинної суспензії за допомогою фотоелектричного колориметра при довжині хвилі 540 нм в кюветах товщиною 0.5 см, а потім переводять в суху біомасу за допомогою калібрувального графіка[64].

8.3. Визначення активності целюлази

Для кількісного аналізу активності целюлаз використовували супернатант культуральної рідини як джерело целюлолітичного ферментного комплексу.

Аналіз активності целюлази проводили з використанням розчину КМЦ протягом інкубації 1 год. Активність целюлази розраховували шляхом вимірювання кількості відновлюючих цукрів, які виділяється методом динітросаліцилової кислоти (ДНС).

Методика визначення активності целюлази за допомогою динітросаліцилової кислоти включає такі кроки:

- Підготовка реакційної суміші: використовують розчин карбоксиметилцелюлози у буферному розчині. Реакційна суміш містить целюлазу та підготовлений субстрат;
- Інкубація: реакційну суміш інкубують при температурі 40°C протягом 1 год.
- Зупинення реакції: щоб зупинити реакцію додають розчин, що містить динітросаліцилову кислоту. ДНС реагує з відновленими цукрами, що виділяються під гідролізу целюлози;
- Вимірювання абсорбції: вимірюють абсорбцію отриманої реакційної суміші при певній довжині хвилі (540 нм) за допомогою спектрофотометра. Абсорбція пропорційна кількості відновлюючих цукрів, що виділяються.

Активність ферменту визначали за допомогою калібрувальної кривої по глюкозі. Одна одиниця активності целюлази визначається як кількість ферменту, необхідна для вивільнення 1 мкмоль глюкози за хвилину під умови аналізу.

Максимальне виробництво целюлази *Bacillus subtilis* MU S1 становило 566,66 ОД/мл [57].

8.4. Концентрація джерела вуглецю

Основне джерело вуглецю в середовищі – карбоксиметилцелюлоза. Визначення карбоксиметилцелюлози здійснюють за допомогою віскозиметричного методу.

Для цього у віскозиметр наливають 25 см³ розчинника з найменшою концентрацією через скляний фільтр, ставлять віскозиметр в термостат і утримують його при 25°C протягом 10–15 хвилин. Після цього приєднують гумову грушу до капілярної трубки віскозиметра, тричі промивають капіляр і вимірювальну кульку, всмоктуючи рідину на 1 см вище верхньої позначки. Потім знову заповнюють капіляр і вимірювальну кульку, фіксують за секундоміром час витікання розчинника від верхньої до нижньої позначки вимірювальної кульки. Час витікання визначають не менше п'яти разів і беруть середнє значення. Якщо різниця між результатами вимірювань перевищує 0,2 с, то вони відкидаються і знову проводять вимірювання. Час витікання розчинника має бути близько 100 с [65].

Після визначення часу витікання чистого розчинника $t_{0\text{поч}}$, його виливають через широку трубку віскозиметра, витискаючи його з капіляру за допомогою груші, а потім очищають віскозиметр від залишків розчинника.

На першому етапі готують вихідний концентрований (0,1 %) розчин КМЦ, використовуючи в якості розчинника 2 %, 6 % або 10 %-ий розчин NaCl. Для цього флокулянт, масою 0,1 г, розчиняють в 100 см³ розчинника за перемішування протягом 1 години. Потім, розведенням відповідним розчинником за формулою $C1/V1 = C2/V2$, готують розведені в 2; 5 та 10 разів розчини флокулянтів з концентраціями 0,05 %, 0,02 %, 0,01 %, при об'ємі 25 см³.

Після приготування ряду розчинів з різними концентраціями карбоксилметилцелюлози, стакани з розчинами розміщують під віскозиметричною піпеткою так, щоб кінець піпетки був занурений у розчин на 1,5 см. За допомогою груші всмоктують досліджувану пробу супернатанту культуральної рідини до половини верхньої кульки віскозиметричної піпетки.

Потім віскозиметричну піпетку витримують в термостаті при температурі 20°C протягом 5 хвилин. Після цього вимірюють час перетікання розчину між мітками за допомогою секундоміра. Вимірювання повторюють не менше п'яти разів, використовуючи середнє значення. Якщо різниця між результатами вимірювань перевищує 0,2 с, то вони відкидаються, і проводяться додаткові вимірювання для отримання надійних результатів. Подібні дії повторюють для всіх проб [65].

8.5. Концентрація джерела азоту

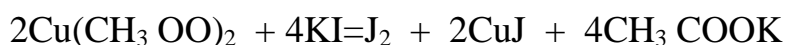
Основне джерело азоту в середовищі – дріжджовий екстракт.

Існують різні методи вимірювання амінного азоту. Найбільш зручним і простим є мідний метод. Цей метод базується на здатності амінокислот утворювати розчинні сполуки з міддю [66].

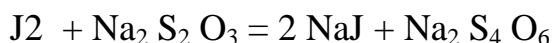
Суть методу

Додати надлишок ортофосфату міді до злегка лужного розчину амінокислот, відфільтрувати суміш. До фільтрату додають оцтову кислоту (для видалення міді з комплексу) і калій йодид (для визначення кількості міді).

Реакції



Виділяється йод в кількості, який є еквівалентній кількості міді, а також і азоту амінокислот .



0,01 н розчину $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ відповідає 0,28 мг амінного азоту.

Необхідні матеріали - розчин хлориду міді, розчин фосфату натрію, суспензія фосфату міді, розчин тимолфталейну, тіосульфату натрію, оцтова кислота, гідроксид натрію, йодид калій.

Умови проведення

У мірну колбу 25 мл вносять 10 мл культуральної рідини, яка містить суміш амінокислот і пептидів, додають декілька краплин тимолфталейну і по краплях 1н розчин гідроксиду натрію до початку появи слабо-блакитного забарвлення. Потім у мірну колбу додають 10 мл суспензії $\text{Cu}(\text{PO}_4)_2$ у боратному буфері, вміст колби доводять водою до мітки. Перемішують і здійснюють фільтрування через щільний фільтр.

Потім 10 мл фільтрату переносять у конічну колбу, де додають 0,5 мл оцтової кислоти і 0,4 г KI. Після того як здійснили перемішування йод титрують 0,01н розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, вкінці титрування додають 1-2 краплини розчину крохмалю до початку зникнення синього забарвлення.

Згодом здійснюють контрольний дослід, але замість досл. розчину беруть воду дистильовану.

За допомогою формули обчислюють результат[66]:

$$X=(a-b) *0,28 / n$$

Де:

X - це вміст амонійного азоту, мг/л;

a- це кількість 0.01н розчину тіосульфату натрію, яка була витрачена на здійснення титрування досліджуваного зразка [67];

b-це кількість 0.01н розчину тіосульфату натрію, яка була витрачена на здійснення титрування контрольного зразка;

n- кількість досл. розчину, мл.

8.6. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1.2 Очищення від пилу і механічних часточок	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стиснення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	P=0,35–0,5 МПа t=200 °C
Кт 1.4 Охолодження та видалення вологи	Охолоджене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	t = 25-40°C W=50-70°
Кт 1.5 Стабілізація та нагрівання	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 60 °C
Кт 1.6 Очищення в головному фільтрі	Очищене повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на тиждень	E = 99,92 %
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	E = 99,9999 %
Кт, Кх 2.1 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для інокулятора 160л	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131°C, τ = 60хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Кх 2.2 Підготовка і стерилізація титрувального агенту NaOH для ферментера 1,6м ³	Перевірка концентрації, температура, час	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 % t = 131°C, τ = 60хв P = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти

Кт, Кх 2.3. Підготовка титрувального агенту HCl для інокулятора 160 л	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 %
Кт, Кх 2.4. Підготовка титрувального агенту HCl для ферментера 1,6м ³	Перевірка концентрації	Хімічний метод	Перед початком кожного виробничого циклу	C = 6 %
Кт, Км 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 121 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.5 Приготування та стерилізація композиції Д	Композиція Д, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 121°C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.5 Приготування та стерилізація композиції Д	Композиція Д, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 121°C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 121 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C τ = 30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C τ = 60 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури <i>Bacillus subtilis</i> MU S1	Колекційна культура <i>Bacillus subtilis</i> MU S1 Температура, час, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час збереження, мікробіологічний контроль після збереження	t = 4 °C пересів кожні 3 – 4 місяці. відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури <i>Bacillus subtilis</i> MU S1 на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування <i>Bacillus subtilis</i> MU S1 на агаризованому середовищі	Тривалість культивування, температура, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування <i>Bacillus subtilis</i> MU S1 в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безпосередньо під час виробничого процесу.	t = 37°C, τ = 24 год, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 5.5 Вирощування <i>Bacillus subtilis</i> MU S1 в інокуляторі 20л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 37°C, τ = 24 год, рН-7/1, Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, 5.6 Вирощування <i>Bacillus subtilis</i> MU S1 в інокуляторі 160л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, рН - метр мікробіологічний контроль	Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.	t = 37°C, τ = 24 год, рН-7/1, Відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення таблиці 8.1

<p>Кт, Км, 6.1 Виробниче культивування</p>	<p>Культуральна рідина, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація клітин, активність ферменту</p>	<p>Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси, Визначення активності ферменту</p>	<p>Температура, час і кількість обертів мішалки визначається безперервно під час виробничого процесу.</p>	<p>$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24\text{ год}$, $\text{pH} = 7.1$, ферментативна активність – 566,66 ОД/мл Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
--	---	--	---	--

РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦЕЛЮЛАЗИ *Bacillus subtilis* MU S1

1. Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

1. Зберігання культуральної рідини
2. Центрифугування культуральної рідини
2. Концентрування супернатанту методом ультрафільтрації
3. Осадження ферменту 80 % сульфатом амонію
4. Відділення осадженого ферменту центрифугуванням
5. Сушіння осадженого ферменту у розпилювальній сушарці
6. Фасування, пакування порошку цільового продукту

2. Вихідні дані:

- a. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 855 \text{ л} = 0,855 \text{ м}^3$;
 - b. концентрація цільового продукту у КР $C_{ант} = 3,0 \text{ г/л} (=3,0 \text{ кг/м}^3)$
 - c. концентрація біомаси у КР $C_{БМ} = 4,5 \text{ г/л} (=4,5 \text{ кг/м}^3)$ – АСБ,
 - d. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 40% (прийнято для розрахунку ТЕО):
початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $0,855 \text{ м}^3 \times 3,0 \text{ кг/м}^3 = 2,56 \text{ кг}$; кінцева кількість (з урахуванням 40% втрат) має становити 3,6 кг
3. Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 9.1.

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦЕЛЮЛАЗИ <i>Bacillus subtilis</i> MU S1					
Розроб.		Годлевська М.А.						Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Красінько В.О.							72	91
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.								75		
Затверд.		Стабніков В.П.								

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 40 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	КР	0,855 м ³ (855 л)	-	0,855 м ³ (855 л)	Збірник КР 1 м ³
Відділення біомаси						
2	Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	3,84 кг (0,855×4,5)- АСБ, з урахуванням 90% вологості 38,4 кг	1,92 кг (5%)	36,48 кг	Центрифуга PGZ1800. Об'єм 1250 л, n = 800 об/хв.
		Супернатант	816,6 л (855-38,4)	40,8 л (5%)	775,8 л	Збірник фугату об'ємом 1 м ³
Ультрафільтрація						
3	Концентрування супернатанту методом ультрафільтрації	Супернатант	775,8 л	-	-	Ультрафільтраційна установка МВ- Q3000.Продуктивність 3000 л/год
		Концентрат	51,7 л	2,58 л (5%)	49,12 л	- (подається відразу до реактора)
		Пермеат	-	-	724,1 л (775,8- 51,7)	- (на знешкодження)

Продовження таблиці 9.1

Осадження						
4	Осадження ферменту 80 % сульфатом амонію	Концентрат	49,12 л	-	-	Реактор об'ємом 150 л
		Сульфат амонію (80% до повного насичення)	27,5 кг ((49,12×0,056) / 0,1 л)	-	-	
		Суспензія	76,62 кг (49,12+27,5)	3,83 кг (5%)	72,79 кг	
Центрифугування						
5	Відділення осадженого ферменту центрифугування м	Суспензія	72,79 кг	-	-	Центрифуга PGZ1800. Об'єм 1250 л, n = 800 об/хв.
		Вологий фермент	22,6 кг	2,26 кг (10%)	20,34 кг	- (подається відразу на сушіння)
		Супернатант	50,19 кг	-	50,19 кг	- (на знешкодження)
Висушування						
6	Сушіння осадженого ферменту у розпилювальній сушарці	Вологий фермент	24 кг (у перерахунку на АСР – 3,78 кг, з урахуванням 5% вологи – 3,96 кг)			Високошвидкісна відцентрова роторна розпилювальна сушарка. Продуктивність 1000 л/год.
		Висушена маса (вологість 5%)	3,96 кг	0,18 кг (5%)	3,78 кг (7,6-0,4)	Пересувна ємність об'ємом 5 л (передається на пакування)

Пакування, маркування, відвантаження						
7	Фасування, пакування порошку цільового продукту	Висушений фермент (вологість 5%)	3,78 кг	-	-	Стіл для ручного фасування та пакування ферменту в поліетиленові пакети. Ваги технічні Е-100 (100/0,001 г), висока точність - 0,001 г.
		Упакований у саше (по 5 г) цільовий продукт	-	0,18 (5%)	3,6 кг = 720 саше (3,42 кг у перерахунку на АСР)	

РОЗДІЛ 10. МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

10.1 Визначення активності целюлази

Для кількісного аналізу активності целюлазної активності цільового продукту готували 1% розчин ферменту, для чого 1,0 г готового сухого продукту вносили у мірну колбу об'ємом 100 мл і доводили дистильованою водою до мітки. Аналіз активності целюлази проводили з використанням смужки фільтрувального паперу Ватмана № 1 (1 x 6 см) протягом інкубації 1 год. Активність целюлази розраховували шляхом вимірювання кількості відновлюючих цукрів, які виділяється, методом динітросаліцилової кислоти (ДНС).

Методика визначення активності целюлази за допомогою динітросаліцилової кислоти включає такі кроки:

- Підготовка реакційної суміші: використовують 0,5 мл 1%-го розчину фермента і 2,0% розчин натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ, Sigma, середня в'язкість) у 0,05 М ацетатному буфері (рН 4,5).
- Інкубація: реакційну суміш інкубують при температурі 40°C протягом 1 год.
- Зупинення реакції: щоб зупинити реакцію додають розчин, що містить динітросаліцилову кислоту. ДНС реагує з відновленими цукрами, що виділяються під гідролізу целюлози;
- Вимірювання абсорбції: вимірюють абсорбцію отриманої реакційної суміші при певній довжині хвилі (540 нм) за допомогою спектрофотометра. Абсорбція пропорційна кількості відновлюючих цукрів, що виділяються.

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Годлевська М.А.			РОЗДІЛ 10. МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Красінько В.О.					75	91
Реценз.						Кафедра БТМ ₇₉		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Активність ферменту визначали за допомогою калібрувальної кривої по глюкозі. Одна одиниця активності целюлази визначається як кількість ферменту, необхідна для вивільнення 1 мкмоль глюкози за хвилину під умови аналізу [68].

10.2. Визначення вологості готового препарату

Вологість готового продукту визначали за допомогою лабораторного аналізатора вологості METRINCO M105MA, призначеного для точного визначення вологості найрізноманітніших зразків гравіметричним методом [69].

Принцип визначення ґрунтується на одночасному тепловому нагріванні зразка і його зважуванні, що робить можливим визначати масову частку вільної та зв'язаної води в досліджуваному зразку. Швидкість нагріву і його високі граничні значення (до 199 градусів Цельсія) в аналізаторах вологості METRINCO забезпечуються наявністю галогенного нагрівального елемента.

Висока точність зважування забезпечується ваговим модулем НВМ (Німеччина) – 0,005 г дискретності.

Для аналізу наважку готового ферментного препарату (орієнтовно 2-5 г) поміщають у прилад.



Рис. 10.1 Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA

10.3. Мікробіологічна чистота

Приготування розчинів ферментного препарату

З дотриманням правил асептики готують розведення досліджуваного препарату у воді 1: 100; 1:1000; 1:10000 і т. д. Наважку препарату масою 0,80-1,20 г, що визначається по різниці мас стерильної пробірки з препаратом і без препарату, розчиняють при ретельному перемішуванні протягом 10 хв у мірній колбі зі 100 см³ стерильної води і отримують перше розведення (1:102). Потім 1 см³ з першого розведення стерильною піпеткою переносять у пробірку з 9 см³ стерильної води та одержують (ретельно перемішавши) друге розведення (1:103). З другого розведення стерильною піпеткою переносять 1 см³ розчину в наступну пробірку з 9 см³ стерильної води, перемішують та одержують третю розведення (1: 104) тощо.

Проведення аналізу

З кожного приготовленого розведення роблять висіви на шість чашок Петрі з м'ясо-пептонним або, за його відсутності, картопляним агаром.

Для цього стерильною піпеткою у полум'я пальника відбирають 0,2-0,5 см³ розчину і переносять на поверхню агару чашки Петрі, ретельно розподіляючи його по всій поверхні шляхом мірного похитування чашки.

Після цього засіяні чашки Петрі поміщають термостат при температурі (37±0,2)°C на 24 і 48 год.

Через 24 год підраховують бактеріальні колонії, що вирости. Потім чашки Петрі залишають у термостаті ще на 24 години для виявлення бактеріальних колоній, що повільно ростуть [70].

РОЗДІЛ 11. ЕКОЛОГІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ЦЕЛЮЛАЗИ

1. Аналіз технологічної схеми проєктованого біотехнологічного виробництва.

Рідкі відходи: рідкі відходи підприємства представляють собою промивну воду з залишками миючих засобів, що є виробничим відходом.

Газоподібні відходи: газоподібні відходи представляють собою відпрацьоване повітря після культивування бактерій.

Тверді відходи: тверді відходи представляють собою біомасу, утворювану під час відділення від культуральної рідини, а також скло, папір, пластик та інші тари для зберігання речовин.

2. Розрахунок об'ємів стічних вод. Визначте загальний об'єм стічних вод, що утворюється в процесі виробництва. Зверніть увагу на:

- Водоспоживання виробничих потужностей.
- Можливі джерела забруднення води
- Типи стічних вод, які утворюються на виробництві.

Залишки мийно-дезінфікуючих засобів. Відомо, що для миття та дезінфекції обладнання за допомогою мобільної циркуляційної СІР-мийки необхідно приготувати робочі розчини із розрахунку 20-30% від об'єму ємкісного обладнання.

Відповідно до специфікації обладнання з курсового проєкту, з ємкісного обладнання маємо: збірник-змішувач 15л, 20л, 40л.; інокулятор на 20л та 160л для підготовки посівного матеріалу, та ферментер на 1500 л. Таким чином, потрібно розрахувати геометричний об'єм ємностей:

					НУХТ БТЕК 04.03.37 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Годлевська М.А.			РОЗДІЛ 11. ЕКОЛОГІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА ЦЕЛЮЛАЗИ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Красінко В.О.					78	91
Реценз.						Кафедра БТМ 82		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

$$V_{\text{ємностей}} = 15+20+40+20+160+1500=1755\text{л}$$

Тоді об'єм мийно-дезінфікуючих засобів становитиме:

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,2 = 1755 \times 0,2 = 351 \text{ л або}$$

$$V_{\text{засобів}} = V_{\text{ємностей}} \times 0,3 = 1755 \times 0,3 = 526 \text{ л}$$

Приймаємо, що об'єм відпрацьованих залишків засобів дорівнює об'єму цих засобів, тобто 351-526 л.

Відпрацьована вода після ополіскування обладнання. Об'єм води для ополіскування, так само як і мийно-дезінфікуючого розчину, становить 20-30% від об'єму ємнісного обладнання. Як розраховано вище, даний параметр дорівнює 351-526 л.

Таким чином, в сумі орієнтовна кількість стічних вод за один цикл виробництва становитиме: 526 л + 526 л = 1052 л.

Орієнтовний об'єм промислових стічних вод за 1 виробничий цикл. Спочатку потрібно порахувати орієнтовну кількість супернатанту, одержуваного за один виробничий цикл. Відповідно до розрахунків з курсової роботи, за один цикл отримаємо 855 л культуральної рідини з концентрацією абсолютно сухої біомаси 5,1 г/л. Проте, після центрифугування біомаса не буде сухою, її волога складає 70%. У свою чергу, 70% від 5,1 г/л становить 3,57 г/л (вологість біомаси). Тоді у 855 л культуральної рідини вміст вологої біомаси становить 3052 г. Так як основою культуральної рідини є вода, то $855000 \text{ г} - 3052 \text{ г} = 851948 \text{ г}$ рідкої фвази, або 852 л.

Таким чином, за один виробничий цикл отримуємо 852 л промислових стічних вод.

Середні витрати стічних вод підприємства

Відповідно до ТЕО, річний об'єм культуральної рідини дорівнює $70 \text{ м}^3/\text{рік}$. Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 210, тоді кількість культуральної рідини (КР) за цикл становить: 855л/доба.

Середні за зміну витрати виробничих стічних вод, $\text{м}^3/\text{добу}$, визначають за формулою:

$$Q_{\text{в}} = q_{\text{е}} \times n$$

де q_e - норма водовідведення в м^3 на одиницю продукції, яку випускає підприємство (розраховано вище $0,852 \text{ м}^3$); n – кількість одиниць продукції, що виробляється за зміну (розраховується у масових одиницях випуску готової продукції на добу)

$$Q_v = 0,852 \times 70 = 60 \text{ (м}^3/\text{доба)}$$

Середні за зміну витрати побутових стічних вод:

$$Q_n = q_n \times N$$

де q_n - норма відведення побутових стічних вод в $\text{м}^3/\text{зм}$ на одного робітника, яку приймають для гарячих цехів $0,045 \text{ м}^3/(\text{зм люд})$, для холодних - $0,025 \text{ м}^3/(\text{зм люд})$; N - кількість робітників, що працюють в зміну. Для перерахунку даного показника на добу необхідно помножити на кількість змін на добу та на 24 і поділити на тривалість однієї зміни.

$$Q_n = 0,025 \text{ м}^3/(\text{зм люд}) \times 8 \text{ людей} = 0,2 \text{ м}^3/\text{зм}$$

Перерахунок даного показника на добу:

$$(0,2 \times 3 \times 24)/8 = 1,8 \text{ м}^3/\text{добу},$$

де 3 - кількість змін на добу;

24 - кількість годин у добі;

8 - тривалість однієї зміни, год.

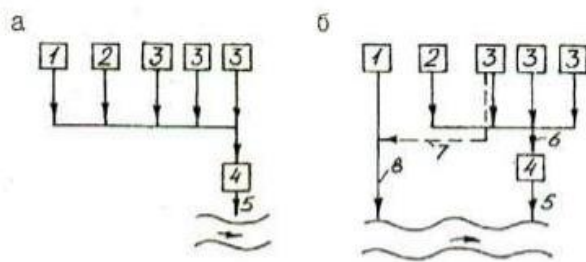
Загальна витрата атмосферних стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q_a). Орієнтовно можна прийняти у об'ємах у 5-30 разів меншому за витрати побутових стічних вод:

$$Q_a = Q_n/5 = 0,2/5 = 0,04 \text{ (м}^3/\text{добу)}.$$

Загальні витрати стічних вод, що утворюються на підприємстві (Q):

$$Q = Q_v + Q_n + Q_a = 60 + 1,8 + 0,04 = 61,84 \text{ м}^3/\text{добу}.$$

Аналізуючи отриману вище інформацію маємо: за добу кількість стічних вод підприємства становить $61,84 \text{ м}^3$. Задля очищення такої кількості води можемо скористатись системою зворотного осмосу Aquarum AMRO-3K з мембранами Hydranautics, яка має потужність 3000 л/год . $3000 * 24 = 72\,000 \text{ л}$, або 72 м^3 , що підходить для об'єму стічних вод за добу [71]. Після очищення води її можна зливати у міську каналізацію.



Серед запропонованих схем найбільше підходить схема а - загальносплавна система або б - роздільна система із дощовою і виробничо – побутовою мережами

3. Розрахунок об'ємів газоподібних відходів. Оцініть види та кількість газоподібних відходів, що утворюються:

- Викиди в атмосферу від технологічного обладнання.
- Можливі джерела забруднення повітря (CO_2 , аміак, SO_2 , клітини мікроорганізмів, тощо).
- Технології для зменшення викидів.

Газоподібні відходи біотехнологічних виробництв утворюються на етапі отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у вигляді відпрацьованого повітря, що містить аерозоль клітин продуцента. Об'єми відпрацьованого повітря приблизно дорівнюють об'ємам аераційного повітря. Відпрацьоване повітря через колектори подається на головні фільтри для очищення та знешкодження.

Тривалість процесу отримання посівного матеріалу складає 24 год, для виробничого біосинтезу таке ж значення. Для аерації середовища використовують стерильне повітря зі швидкістю аерації – 1 л/лПС·хв і у виробничому приміщенні встановлено 2 ферментаційні апарати (2 інокулятори об'ємом 20, 160 л і ферментер 1500 л , коефіцієнт заповнення усіх апаратів дорівнює 0,6), приблизний об'єм відпрацьованого повітря за 1 цикл ферментації буде становити:

$$(20+160) \times 0,6 \times 24 \times 60) + (1500 \times 0,6 \times 24 \times 60) = 145\ 1520 \text{ л (1451,5 м}^3\text{)}$$

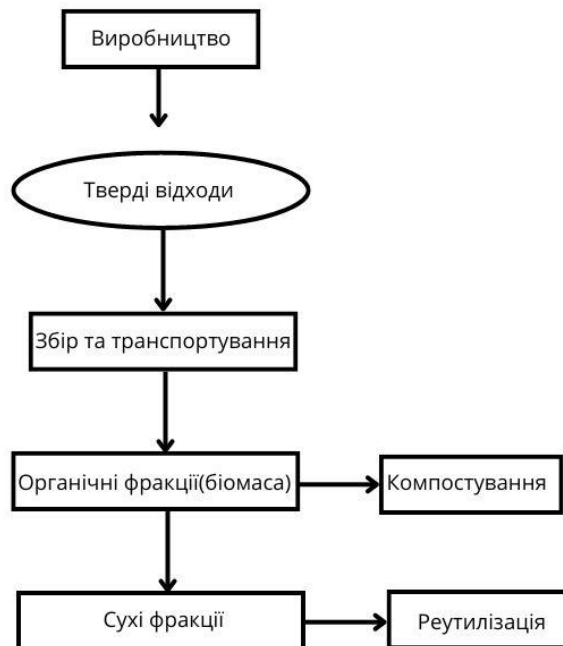
Аналізуючи отриману вище інформацію: повітря, яке потрапляє у атмосферу повинно бути чистим від можливих клітин бактерій. Задля цього можемо скористатися способом озонування повітря та озонаторами, як приладами для його очистки. Або замість озонатору можемо скористатися скруббером Deep Bed Scrubber for Toxic Gas (АОС1) [72], який є також надійним способом очистки повітря.

4. Розрахунок об'ємів твердих відходів. Визначте кількість та тип твердих відходів, що утворюються в процесі виробництва:

- Види твердих відходів (наприклад, відпрацьована сировина, упаковка, шлам з очисних споруд).
- Способи утилізації твердих відходів.

Маємо тверді відходи у вигляді біомаси, а також робочих тар (скло, папір, пластик та інші елементи). Продукція на підприємстві не є токсичною. Як спосіб утилізації біомаси можна запропонувати її компостування. Підприємство може заключити контракт із компанією, яка буде забирати біомасу та надалі компостувати її або використовувати в інших технологічних процесах.

Як спосіб утилізації виробничих тар можемо запропонувати реутилізацію – тобто вторинне перероблення та вторинне використання тар. Макулатуру подрібнюють у паперову масу, з якої виготовляють різноманітну паперову продукцію. Скло подрібнюють, плавлять і виготовляють з нього нову тару чи використовують замість гравію або піску для виробництва бетону й асфальту. Пластмасу переплавляють і виготовляють з неї матеріал для різних огорож, настилів й інших споруд просто неба. Реутилізація на підприємстві допоможе захистити оточуюче середовище від складування цих речовин на звалищах.



Спосіб поводження із твердими відходами

5. Екологічний аудит та заходи щодо мінімізації впливу на довкілля.
Зробіть висновки щодо проведеного аналізу проєктованого біотехнологічного виробництва та комплексу запропонованих заходів для оптимізації виробництва з мінімізації його впливу на довкілля.

Аналізуючи інформацію вище та тип відходів підприємства можна сказати, що вони не є надто токсичними та не надто шкодять оточуючому середовищу. Вода із миючими засобами проходить очистку на фільтрі, повітря забруднене газами очищується від їх вмісту, а тверді відходи піддаються реутилізації, що не шкодить оточуючому середовищу.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:

1. Timmis K., de Vos W. M., Ramos J. L., Vlaeminck S. E., Prieto A., Danchin A., Singh B. K. The contribution of microbial biotechnology to sustainable development goals. *Microbial Biotechnology*. 2017, 10 (5): 984 – 987. doi: 10.1111/1751-7915.12818.
2. Tatta E. R., Imchen M., Moopantakath J., Kumavath R. Bioprospecting of microbial enzymes: current trends in industry and healthcare. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022, 106 (5 – 6): 1813 – 1835. doi: 10.1007/s00253-022-11859-5
3. Hmidet N., Nawani N., Ghorbel S. Recent Development in Production and Biotechnological Application of Microbial Enzymes. *BioMed Research International*, 2015: 1 – 2. doi: 10.1155/2015/280518.
4. Bajaj P., Mahajan R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103 (21 – 22): 8711 – 8724. doi: 10.1007/s00253-019-10146-0.
5. Kamble R. D., Jadhav A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. *International Journal of Microbiology*, 2012: 1 – 8. doi: 10.1155/2012/683193.
6. Walia A., Guleria S., Mehta P., Chauhan A., Parkash J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*. 2017, 7 (1): 11. doi: 10.1007/s13205-016-0584-6.
7. Cunha J. T., Soares P. O., Baptista S. L., Costa C. E., Domingues L. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic valorization: a review and perspectives on bioethanol production. *Bioengineered*. 2020, 11 (1): 883 – 903. doi: 10.1080/21655979.2020.1801178.
8. Nawaz A., Huang R., Junaid F., Feng Y., Haq I. U., Mukhtar H., Jiang K. Sustainable Production of Bioethanol Using Levulinic Acid Pretreated Sawdust. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, 10: 990. doi: 10.3389/fbioe.2022.937838.

9. Sharma B., Larroche C., Dussap C.-G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2020, 313: 123630. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123630.
10. Singhania R. R., Ruiz H. A., Awasthi M. K., Dong C.-D., Chen C.-W., Patel A. K. Challenges in cellulase bioprocess for biofuel applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021, 151: 111622. doi: 10.1016/j.rser.2021.111622.
11. Yan S., Wu G. Signal peptide of cellulase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98 (12): 5329 – 5362. doi: 10.1007/s00253-014-5742-3.
12. Sukumaran R. K., Christopher M., Kooloth-Valappil P., Sreeja-Raju A., Mathew R. M., Sankar M., Pandey A. Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: Targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi. *Bioresource Technology*. 2021, 329: 124746. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124746.
13. Cellulase. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440950#section=2D-Structure>.
14. Mohapatra B. R. Kinetic and thermodynamic properties of alginate lyase and cellulase co-produced by *Exiguobacterium* species Alg-S5. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 98: 103 – 110. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.091.
15. Zhao X., Liu L., Deng Z., Liu S., Yun J., Xiao X., Li H. Screening, cloning, enzymatic properties of a novel thermostable cellulase enzyme, and its potential application on water hyacinth utilization. *International Microbiology*. 2021, 24 (3): 337 – 349. doi: 10.1007/s10123-021-00170-4.
16. Dehghanikhah F., Shakarami J., Asoodeh A. Purification and biochemical characterization of alkalophilic cellulase from the symbiotic *Bacillus subtilis* BC1 of the leopard moth *Zeuzera pyrina* (L.) (Lepidoptera; Cossidae). *Curr Microbiol*. 2020, 77 (7): 1254 – 1261. doi: 10.1007/s00284-020-01938-z.
17. Sandipan B., Tushar K. M., Raj N. R. Production, purification, and characterization of cellulase from *Acinetobacter junii* GAC 16.2, a novel cellulolytic

gut isolate of *Gryllotalpa africana*, and its effects on cotton fiber and sawdust. *Ann Microbiol.* 2020, 70 (1): 853 – 866. doi: 10.1186/s13213-020-01569-6.

18. Co R., Hug L. A. Guest commentary: A need for improved cellulase identification from metagenomic sequence data. *Applied and Environmental Microbiology.* 2020, 87 (1): e01928-20. doi: 10.1128/AEM.01928-20.

19. Choi, J.M.; Han, S.S.; Kim, H.S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33, 1443–1454.

20. Sukumaran, R.K.; Singhanian, R.R.; Pandey, A. Microbial cellulases- Production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.* 2005, 64, 832–844.

21. Ahmed, A.; Bibi, A. Fungal Cellulase; Production and Applications: Minireview. *LIFE Int. J. Health Life Sci.* 2018, 4, 19–36.

22. Menendez, E.; Paula, G.; Rivas, R. Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioeng.* 2015, 2, 163–182.

23. Chung, D.; Cha, M.; Guss, A.M.; Westpheling, J. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 8931–8936.

24. Asmare, B. Biotechnological Advances for Animal Nutrition and Feed Improvement. *World J. Agric. Res.* 2014, 2, 115–118.

25. Kumar, V.A.; Kurup, R.S.C.; Snishamol, C.; Prabhu, G.N. Role of Cellulases in Food, Feed, and Beverage Industries. In *Green Bio-Processes*; Springer: Singapore, 2019; pp. 323–343.

26. Zhang X.-Z., Zhang Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers.* 2013, 8: 131 – 146. doi: 10.1002/9781118642047.ch8.

27. Anbu P., Gopinath S. C. B., Cihan A. C., Chaulagain B. P. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. *BioMed Research International.* 2013, 1–2. doi: 10.1155/2013/204014.

28. Sreena C. P., Sebastian D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. *Journal of*

Genetic Engineering and Biotechnology. 2018, 16 (1): 9 – 16. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.12.005.

29. Singhanian R. R., Saini J. K., Saini R., Adsul M., Mathur A., Gupta R., Tuli D. K. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. *Bioresource Technology*. 2014, 169: 490 – 495. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.011.

30. Saini R., Saini J. K., Adsul M., Patel A. K., Mathur A., Tuli D., Singhanian R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Technology*. 2015, 188: 240 – 246. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.048.

31. Lewis Jackson. *Bacillus subtilis*: характеристика, морфологія, хвороби [Електронний ресурс] / Lewis Jackson – Режим доступу до ресурсу: <https://uk.warbletoncouncil.org/bacillus-subtilis-5785>.

32. Способи культивування мікроорганізмів [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/5193874/page:14/>.

33. Lu Z., Guo W., Liu C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2018, 80 (3): 427 – 433. doi: 10.1292/jvms.16-0572.

34. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://biologydictionary.net/bacillus-subtilis/>.

35. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=408>.

36. Tasaki S., Nakayama M., Shoji W. Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. *Development, Growth & Differentiation*. 2017, 59 (5): 369 – 378. doi: 10.1111/dgd.12383.

37. Foligné B., Peys E., Vandekerckhove J., Dewulf J., Breton J., Pot B. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. *Clinical Nutrition*. 2013, 31 (6): 987 – 994. doi: 10.1016/j.clnu.2012.05.016.

38. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/1172>.

39. Bridier A., Meylheuc T., Briandet R. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron*. 2013, 48: 65 – 69. doi: 10.1016/j.micron.2013.02.013.

40. Martinez R. M. *Bacillus subtilis*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2013, 246 – 248. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00125-X.

41. *Bacillus subtilis*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1423&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.

42. Чернявський Д.О. потенціал використання кукурудзи в якості біопалива [Електронний ресурс] / Чернявський Д.О. // вісник СІТ ННІ бізнесу і менеджменту ХНТУСГ. – 2019. – Режим доступу до ресурсу: https://repo.btu.kharkov.ua/bitstream/123456789/16062/1/%D0%92%D1%96%D1%81%D0%BD%D0%B8%D0%BA%20%D0%A1%D0%9D%D0%A2_%D0%B2%D0%B8%D0%BF%D1%83%D1%81%D0%BA%202_2019-164-167.pdf.

44. Deka D., Das S. P., Sahoo N., Das D., Jawed M., Goyal D., Goyal A. Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production. *ISRN Biotechnology*. 2013, 2013: 1 – 11. doi: 10.5402/2013/965310.

45. Hmidet N., Nawani N., Ghorbel S. Recent Development in Production and Biotechnological Application of Microbial Enzymes. *BioMed Research International*, 2015: 1 – 2. doi: 10.1155/2015/280518.

46. Рідкі біопалива: біоетанол та біодизель [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://uabio.org/liquid-biofuels/>.

47. Біоетанол. Стан та оцінка галузі в Україні [Електронний ресурс]. – 2023. – Режим доступу до ресурсу: <https://latifundist.com/analytics/30-bioetanol-stan-ta-otsinka-galuzi-v-ukrayini>.

48. Walia A., Guleria S., Mehta P., Chauhan A., Parkash J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*. 2017, 7 (1): 11. doi: 10.1007/s13205-016-0584-6.

49. Sreena C. P., Sebastian D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018, 16 (1): 9 – 16. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.12.005.

50. Starch and sucrose metabolism - *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?bsu00500.

51. Ahmed, A.; Bibi, A. Fungal Cellulase; Production and Applications: Minireview. *LIFE Int. J. Health Life Sci*. 2018, 4, 19–36.

52. Способи культивування мікроорганізмів [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/5193874/page:14/>.

53. Попова Н.В. БАРБОТЕР [Електронний ресурс] / Попова Н.В. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1851/barboter>.

54. Co R., Hug L. A. Guest commentary: A need for improved cellulase identification from metagenomic sequence data. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020, 87 (1): e01928-20. doi: 10.1128/AEM.01928-20.

55. Zhang X.-Z., Zhang Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. 2013, 8: 131 – 146. doi: 10.1002/9781118642047.ch8.

56. Anbu P., Gopinath S. C. B., Cihan A. C., Chaulagain B. P. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. *BioMed Research International*. 2013, 1–2. doi: 10.1155/2013/204014.

57. Sreena C. P., Sebastian D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018, 16 (1): 9 – 16. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.12.005.

58. Singhanian R. R., Saini J. K., Saini R., Adsul M., Mathur A., Gupta R., Tuli D. K. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing

Penicillium janthinellum cellulases. Bioresource Technology. 2014, 169: 490 – 495. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.011.

59. Saini R., Saini J. K., Adsul M., Patel A. K., Mathur A., Tuli D., Singhanian R. R. Enhanced cellulase production by Penicillium oxalicum for bio-ethanol application. Bioresource Technology. 2015, 188: 240 – 246. doi: 10.1016/j.biortech.2015.01.048.

60. Lewis Jackson. Bacillus subtilis: характеристика, морфологія, хвороби [Електронний ресурс] / Lewis Jackson – Режим доступу до ресурсу: <https://uk.warbletoncouncil.org/bacillus-subtilis-5785>.

61. Таблиця класифікації повітряних фільтрів [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://envirco.in.ua/filterklass.html>.

62. Lewis Jackson. Bacillus subtilis: характеристика, морфологія, хвороби [Електронний ресурс] / Lewis Jackson. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: <https://uk.warbletoncouncil.org/bacillus-subtilis-5785>.

63. Лабораторний практикум [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/486154/mod_resource/content/2/%D0%9B%D0%B0%D0%B1%20%D0%B7%D0%B0%D0%BD%D1%8F%D1%82%D1%82%D1%8F%207-9.pdf.

64. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: Лаборатор. Практикум. – К.: НУХТ, 2009. – 302 с.

65. Черваков О.В., Варлан К.Є., Андріянова М.В. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Хімія і фізика ВМС» для студентів III курсу денної форми навчання та IV курсу заочної форми навчання напряму підготовки 6.051301 «Хімічна технологія». «Реакції та основи фізикохімії полімерів» / ДВНЗ УДХТУ, 2014. – 40 с.

66. Дослідження вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: http://ni.biz.ua/5/5_14/5_149121_issledovanie-soderzhaniya-aminogo-azota.html.

67. Tatta E. R., Imchen M., Moopantakath J., Kumavath R. Bioprospecting of microbial enzymes: current trends in industry and healthcare. Applied Microbiology

and Biotechnology. 2022, 106 (5 – 6): 1813 – 1835. doi: 10.1007/s00253-022-11859-5.

68. (PDF) Study of Cellulose Degradation Enzymatic Complex of *Penicillium funiculosum* Thom Strains from Different Habitats. Available from: https://www.researchgate.net/publication/321301051_Study_of_Cellulose_Degradation_Enzymatic_Complex_of_Penicillium_funiculosum_Thom_Strains_from_Different_Habitats [accessed Apr 22 2024].

69. Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://simvolt.ua/laboratorniy-analzator-vologost-metrinco-m105ma.html/>

70. ДСТУ 7899:2015 Препарати ферментні для спиртового виробництва. Методи визначання органолептичних, фізико-хімічних і мікробіологічних показників.

71. Інтернет джерело: Система зворотного осмосу Aquarum AMRO-3K з мембранами Hydranautics [Режим доступу:] <https://www.aqua-room.com.ua/sistema-obratnogo-osmosa-aquarum-amro-3k-amro-3000-1-s-membranami-hydranautics>

72. Інтернет джерело: Deep Bed Scrubber for Toxic Gas (AOC1) [Режим доступу:] <https://www.purafil.com/products/equipment/toxic-gas/deep-bed-scrubber-for-toxic-gas-dbs/>