

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

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Культивування *Bacillus subtilis* для одержання Ендоспорину

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

_____ Тимцясь Андрій Анатолійович _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ Скроцька Оксана Ігорівна _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю.

Кафедра біотехнології і мікробіології.

Освітній ступінь бакалавр.

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія».

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

« » 2021 року

**З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

_____ Тимцяся Андрія Анатолійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus subtilis* для одержання Ендоспорину

керівник роботи Скροцька Оксана Ігорівна, к.б.н., доцент,

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від « » 2021 року

2. Строк подання здобувачем роботи « » 2021 року.

3. Вихідні дані до роботи Штам культури продуцента *Bacillus subtilis* 3, об'єм ферментера 1 м³

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Характеристика цільового продукту; Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4. Біосинтез цільового продукту; Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 6. Специфікація обладнання; Розділ 7. Опис технологічної схеми; Розділ 8. Контроль виробництва; Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва Ендоспорину; Розділ 10. Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема – 2 аркуша А1, Апаратурна схема – 2 аркуша А1, Схема автоматизації – 1 аркуш А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Клименко Олег Миколайович доцент, ктн., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання «01»квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Характеристика цільового продукту	01.04.2021- 03.04.2021	
2.	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	03.04.2021- 10.04.2021	
3.	Техніко-економічне обґрунтування	10.04.2021- 17.04.2021	
4.	Біосинтез цільового продукту	17.04.2021- 25.04.2021	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	25.04.2021- 03.05.2021	
6.	Специфікація обладнання	03.05.2021- 10.05.2021	
7.	Опис технологічної схеми виробництва	10.05.2021- 15.05.2021	
8.	Контроль виробництва	15.05.2021- 20.05.2021	
9.	Автоматизація ділянки виробництва Ендоспорину	20.05.2021- 22.05.2021	
10.	Екологізація виробництва	22.05.2021- 24.05.2021	
11.	Виконання графічної частину проекту	24.05.2021- 28.05.2021	

Здобувач _____

(підпис)

Тимцясь А.А.

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____

(підпис)

Скороцька О.І.

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату Ендоспорин у вигляді сухої біомаси (*Bacillus subtilis* 3) з наповнювачем.

Технологія виробництва включає в себе допоміжні роботи такі, як: санітарна підготовка виробництва; основний технологічний процес в яких входить: біосинтез цільового продукту, який здійснюється у ферментері об'ємом 1 м³ та та підготовчі етапи для біосинтезу у ферментерах об'ємами 100 і 10л та в колбах на качалці. Наступна частина роботи представлена виділенням сухої біомаси з культуральної рідини після виробничого біосинтезу та виготовленням Ендоспорину, зокрема (відділення біомаси сепаратором, змішування з приготовленим раніше захисним середовищем (желатин, сахароза), розлив у піддони ліофільної сушарки, заморожування після чого висушування під вакуумом, подрібнення) стадії фасування, пакування, маркування, відвантаження та знешкодження відходів, що наведені на технологічній та апаратурній схемах.

Також обрано методи контролю готової продукції. До них входить визначення масової частки вологи, число життєздатних клітин, визначення клітин сторонніх мікроорганізмів, зовнішнього вигляду та кольору.

Курсовий проект викладений на 144 стор. друкованого тексту, містить 27 таблиць, 14 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (100 джерел) та графічної частини (4 креслення формату А2).

Ключові слова: *Bacillus subtilis* 3, виробничий біосинтез, пшеничні висівки, ендоспорин, пробіотичний препарат, виділення, біомаса, сепарування, сушіння, подрібнення, наповнювач, захисне середовище.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	24
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	24
3.2. Розрахунок кількості виробничих циклів та герметичного об'єму ферментера для культивування <i>Bacillus subtilis</i> 3.....	32
3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	33
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	36
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента – <i>Bacillus subtilis</i>	36
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	38
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	40
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. 40	
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.	40
5.1.1.1. Вибір умов і способу культивування.	40
5.1.1.2. Вибір типу ферментера	41
5.1.2. Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря.	43
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.	45
5.1.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища	54
5.1.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	55
5.1.4.2 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах	55
5.1.4.2.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в ферментері об'ємом 10л.....	55
5.1.4.2.2 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в ферментері об'ємом 100л.....	56
5.1.4.3 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу	57

5.1.5	Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.....	57
5.2.	Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	58
5.2.1.	Обґрунтування стадій виділення цільового продукту	58
5.2.2.	Обґрунтування способу відділення клітинної біомаси з культуральної рідини.....	59
5.2.3.	Обґрунтування способу сушіння та сушарки	68
5.2.4.	Обґрунтування способу подрібнення	75
5.2.5.	Обґрунтування форми випуску препарату.	79
5.2.6.	Обґрунтування кінцевої форми продукту	81
5.2.7.	Обґрунтування стадії пакування цільового продукту	81
5.3.	Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення і очищення цільового продукту.	82
5.3.1	Обґрунтування стадії змішування з захисним середовищем.	82
5.4.	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	83
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ		87
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		91
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		105
8.1.	Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	105
8.2.	Мікробіологічний контроль	112
8.3.	Показники росту і синтезу цільового продукту.....	113
8.3.1.	Концентрація біомаси.....	113
8.3.2.	Концентрація цільового продукту.....	113
8.3.3.	Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	114
8.3.3.1.	Визначення концентрації вуглецю.	114
8.3.3.2.	Визначення концентрації амінного азоту	116
8.4.	Показники якості готового продукту.....	117
8.4.1.	Визначення масової частки вологи.	117
8.4.2	Визначення числа життєздатних клітин <i>Bacillus subtilis</i>	117
8.4.3.	Визначення числа клітин сторонніх мікроорганізмів	118
8.4.4.	Визначення зовнішнього вигляду і кольору	120
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА		121
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ		128

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.	128
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.	130
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	130
10.2.1.1. Розрахунок об'ємів відходів.	130
10.2.1.2. Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів.	131
10.2.1.3. Утилізація рідких відходів.	131
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.	133
10.2.2.1. Розрахунок об'ємів відходів.	133
10.2.2.2. Утилізація твердих відходів.	134
10.2.3. Система знешкодження газоподібних викидів.	134
10.2.3.1. Розрахунок об'ємів відходів.	134
10.2.3.2. Заходи для зменшення об'ємів газоповітряних відходів.	135
10.2.3.3. Утилізація газоповітряних відходів.	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	137

ВСТУП

Заборона застосування кормових антибіотиків у годівлі тварин та птиці в країнах Європи спонукала вчених до пошуку альтернативних, добавок, які запобігали б колонізації патогенної і умовно-патогенної кишкової мікрофлори та розвитку захворювань. В умовах промислового ведення тваринництва, птахівництва економічно вигідним є використання препаратів природного походження. Даними препаратами є пробіотики, одержані на основі живих клітин.

У якості перспективних конкурентів увагу привернули бактерії роду *Bacillus*. Вони стійкі до несприятливих умов, висока ферментативна й антагоністична активність щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, продуценти біологічно активних речовин, не викликають розвитку патологічного стану у людей. Це обумовлює перспективність використання бактерій даного роду в якості основи для розробки лікувально-профілактичних препаратів. [1].

B. subtilis є унікальним в плані антимікробної дії. Унікальність виражається в кодуванні речовин антимікробного характеру значною частиною генома. Їх спектр дії охоплює бактерії, віруси і гриби, що робить *B. subtilis* пробіотиком здатним протистояти більшості патогенів, що викликають захворювання ШКТ.

Окрім цього дана бактерія, хоч і постійно потрапляє в шлунково-кишковий тракт з навколишнього середовища, тим не менш, не колонізує його. *B. subtilis* є транзитною бактерією, що постійно надходить і виводиться з організму. Тому для підтримки *B. subtilis* в популяції мікроорганізмів мікробіоти тварин, необхідно постійне надходження цієї бактерії ззовні. *B. subtilis* також синтезує ряд травних ферментів: амілази, ліпази, протеази, пектиназу і целюлази. Ці ферменти полегшують процес травлення, і збільшують цінність споживаної їжі, а також дозволяють перетравлювати зазвичай неперетравлювані компоненти [2].

У роботі представлено розробку технологічного процесу, яку можна використовувати при виготовленні пробіотика Ендоспорин на основі *B. subtilis*.

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Тимцясь А.А.						
Перевір.		Скроцька О.І.					9	135
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Запропоновано необхідне обладнання для проведення усіх робіт. Зокрема було обрано *B.subtilis* 3 та підбрано все необхідне для доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу (глибинний спосіб культивування, поживне середовище та необхідні ферментери та реактори; підготовка аераційного повітря, обрано миючі та дезінфікуючі засоби), а також для стадії виділення та очищення цільового продукту (для відділення біомаси тарілчастий сепаратор з механічним відвантаженням; сушіння-ліофілну сушарку (підбрано захисне середовище(желатин, сахароза) для максимального збереження живих клітин(70% живих клітин виживає)); для подрібнення - струйна дробарка оснащена ситом для одночасного просіювання.

Ендоспорин використовується у сільському господарстві тому вирішено фасувати у поліетиленові пакети. Вони найбільш поширений пакувальний матеріал і дешевий порівняно з іншими. Оскільки на фермах може бути від 200 і більше одиниць великої рогатої худоби, а доза для однієї 1гр розчинений в 50мл води, обрано упаковку по 0,2кг, тому що вона буде зручною при використанні.

Представлено методи контролю виробництва(мікробіологічний контроль-розсівом на чашки Петрі з МПА,СА і мікроскопіюванням; концентрацію біомаси за оптичною густиною за допомогою калібрувального графіка, життєздатних клітин - методом Коха, вуглецю – методом Бертрана-Шорля, амінного азоту – метод Стевенса; масову частку вологи висушуванням; клітин сторонніх мікроорганізмів зафарбовуванням за Ціль-Нільсеном для виявлення кислотостійких мікобактерій, для виявлення грибів та інших сторонніх мікроорганізмів – посів штрихом; визначення зовнішнього вигляду та кольору препарату – органолептично.

Новизна. У роботі пропонується використовувати штам *B. subtilis* 3, оскільки при його культивуванні досягається концентрація біомаси – 5,9 г/л, що є у 4,5 рази більше, ніж при використанні *B. subtilis* ИМВ В-7023. Окрім цього Ендоспорин не шкідливий для теплокровних тварин в дозах, що в 200 разів перевищують рекомендовані для лікування, а також може використовуватись і для ендометритів великої рогатої худоби.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Сучасні уявлення про етіологію і патогенез захворювань тварин визначають вимоги до ефективних лікувально - профілактичних препаратів як до засобів комплексної дії на організм.

Високу ефективність в лікуванні та профілактиці здатний надати комплекс етіотропного, патогенетичного, імуностимулюючого механізму дії при максимальній нешкідливості застосовуваного засобу для тканин, систем, фізіологічних процесів і організму тварини в цілому.

У будь-якому випадку роль мікробних збудників в патології є одна з головних. Тому ефективний лікувально – профілактичний засіб має володіти також вираженою етіотропною антимікробною дією.

В Інституті мікробіології і вірусології НАН України проводяться фундаментальні дослідження біології аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* [3].

Багато представників цієї групи мікроорганізмів синтезують широкий ряд біологічно активних речовин, характеризуються відсутністю патогенних властивостей і не впливають на теплокровних.

Накопичені наукові відомості дозволяють вести цілеспрямовану розробку ефективних засобів для лікування і профілактики конкретних патологій людей і тварин. При цьому можливе використання як чистих речовин (антимікробних та ін.), так і біологічно високоактивних живих мікробних культур для конструювання препаратів пробіотиків [4].

Одна з таких розробок – високоефективний етіотропний пробіотик Ендоспорин для лікування і профілактики післяпологових ендометритів у корів і інших видів сільськогосподарських тварин [3].

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
<i>Розроб.</i>		<i>Тимцясь А.А.</i>					11	135
<i>Перевір.</i>		<i>Скроцька О.І.</i>						1
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						



Рис.1.1. Препарат Эндоспорин – упаковка

Ендоспорин представляє собою ліофілізовану біомасу. Основу препарату складають життєздатні клітини бактерій *Bacillus subtilis* та весь комплекс біологічно активних речовин, продукує штами в середовище росту та внутрішньоклітинно, стабілізатор та кріопротектор. Препарат розфасований в ампули чи флакони по 0,5г, зберігають при температурі не вище 20°C. Термін придатності – 3 роки [5].

Згідно переліку імунобіологічних препаратів, що зареєстровані в Україні станом на 10 квітня 2019 року власником реєстраційного посвідчення є ТОВ «Бактеріальні препарати», а виробником препарату Ендоспорин є Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика [6].

Препарат проявляє широкий спектр дії:

- антимікробна дія, пригнічує патогенну та умовно патогенну мікрофлору і не впливає на представників нормальної мікрофлори;
- покращує засвоюваність кормів;
- виявляє імуномодулюючу дію;

- сприяє нарощуванню маси тварин та збереженню поголів'я;
- не викликає утворення стійких форм штамів патогенних бактерій.

Механізм дії:

1) антибактеріальні, протигрибкова, антимікробна дія штамів-компонентів препарату базуються на їх здатності синтезувати антибіотики – сурфактин, фенгіцин, бацилибактин, бацилаєн, макролактин, дифіцидин, які пригнічують розвиток та розмноження широкого спектру патогенних мікроорганізмів. Крім того синтезовані *Bacillus subtilis* бактеріолітичні та дріжжелітичні ферменти руйнують клітинні стінки патогенних бактерій, що підсилює антагоністичну дію препарату;

2) підвищення конверсії кормів відбувається за рахунок синтезу штамами ферментів (целюлази, протеази, ліпази, амілази), які розкладають білки жири, вуглеводи, клітковину і тим самим сприяють поліпшенню перетравлення і засвоєнню кормів;

3) імуномодуюча дія відбувається шляхом посилення синтезу ендogenous інтерферону і активації фагоцитарної активності лейкоцитів і макрофагів;

4) нарощуванню маси поголів'я зумовлене синтезом штамами численних біологічно активних речовин – вітамінів, амінокислот та ін., які позитивно впливають на обмін речовин;

5) споровий пробіотик більш стійкий до несприятливого впливу агресивного середовища шлунково-кишкового тракту, довший час зберігає свою життєву активність, проявляє високу антагоністичну активність щодо широкого спектру патогенної мікрофлори і може використовуватися як альтернатива антибіотикам.

Ендоспорин використовується: в тваринництві та птахівництві та в рибному господарстві.

Застосування:

- лікування та профілактика дизбактеріозів;
- лікування та профілактика кишкових та гнійних інфекцій;
- лікування та профілактика післяпологових ендометритів, затримки оболонки плоду (посліду);
- інших запальних хвороб пологових шляхів

Норми використання Ендоспорину.

Вид тварин	Порядок застосування
Бройлери віком від 0 до 7 днів ; Бройлери з 18 дня; Продуктивні птахи;	5-10 мл на 100 голів 5-7 діб;
Кури-несучки	5-10 мл на 100 голів 6 діб, 2 рази в місяць;
Свиноматки	300-400 мл на 100 голів за 15 днів до опоросу і на протязі всього періоду лактації
Новорожені поросята	100-200 мл на 100 голів на протязі 12-14 днів
Поросята на відгодівлі вагою до 10-15 кг	100 мл на 100 голів на протязі 7 днів
Поросята на відгодівлі вагою від 10-15 кг до 30-40 кг	3-4 л на 1т води
Поросята вагою від 50-60 кг до забою	2-3 л на 1 т води
Рибне господарство	
Підготовка плідників до нересту	0,5л на 1т води за 7-10 днів до нересту
Утримування і підрощування личинок	1л на 1т води 1 раз в місяць
Вирощування риб старших вікових груп	0,2 л на 1т води 1 раз в місяць.

Спосіб застосування:

Вміст флакона або ампули (не менше 400-500 млрд мікробних клітин) розбавляють в стерильному фізіологічному розчині хлориду натрію (воді, 0,5% розчині новокаїну) в обсязі, придатному для внутрішньо-маткового введення (з лікувальною метою) або для внутрішньо-вагінального введення (з профілактичною метою).

Препарат вводять з дотриманням правил асептики і антисептики. Рекомендована разова доза для великої рогатої худоби складає 400-500 млрд клітин (1 флакон або ампула). Профілактичний ефект з метою попередження післяпологових гнійно-запальних процесів надає навіть одноразове введення "Ендоспорина" стельним коровам внутрішньо-вагінально або на шийку матки за 10-15 днів до планового отелення.

Лікувальний ефект, залежно від тяжкості гнійного патологічного процесу, досягається при двох-триразовому внутріматковому введенні "ендоспорина" з двох-триденними інтервалами між введеннями або до клінічного одужання у важких випадках. Застосування "ендоспорина" в господарствах показало його виражену ефективність в терапії та профілактики післяпологових гнійно-запальних процесів геніталій маточного поголів'я тварин.

Сумісність з хімічними засобами

Ендоспорин може використовуватись як альтернатива антибіотикам

Умови і термін зберігання

Ендоспорин поміщений в стерильно закриті флакони чи ампули, зберігають при температурі не вище 20°C. Термін придатності – 3 роки з дня виготовлення.

Ефективність препарату:

- збереження поголів'я птахів на 2,3%;
- збільшення яйценосності на 3,5%;
- збільшення живої маси курчат при випоюванні з першого дня на 6%;
- зменшення патогенної мікрофлори: майже на 100% стафілококів, протеїв на 22,7%, кандід на 35,5%, при випоюванні курчат з 1-ого дня;
- економічний ефект від застосування в ветеринарній практиці 15%.

Препарат пригнічує ріст патогенної і умовно патогенної гнійної мікрофлори, стимулює індукцію ендогенного сироваткового інтерферону [7].

"Ендоспорин" зберігає весь комплекс біологічної активності штамів, що складають його основу, не шкідливий для теплокровних тварин в дозах, що в 200 разів перевищують рекомендовані для лікування.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Сьогодні у всьому світі спостерігається зростання виробництва пробіотиків, оскільки вони все більше цікавлять людей, що підтримують своє здоров'я за допомогою натуральних засобів. Окрім цього пробіотики часто застосовуються у тваринництві як для лікування так і для підтримки здоров'я тварин. Продукція, яка містить пробіотичні бактерії, затребувана в якості корисного функціонального харчування, а також в лікувально-профілактичних цілях. Лікувально-профілактичні препарати з живих бактерій вже майже 80 років застосовуються в практичній охороні здоров'я. Однак їх недостатній антагонізм стосовно деяких патогенних бактерій і грибів, а також несприятлива екологічна обстановка, яка спричинила за собою зниження їх лікувальної дії, підштовхнули вчених до пошуку нових, більш ефективних мікроорганізмів використовуючи як генну так і біотехнологічну інженерії [1].

Для виготовлення пробіотиків застосовують різні групи спороутворюючих бактерій які відносяться до родів *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium* та *Sporolactobacillus*. Це найбільш древні і широко поширені в природі сапрофітні мікроорганізми, з якими протягом всієї історії свого існування стикалась людина. Незважаючи на те, що пробіотичні штами бацил є чужорідними по відношенню до мікрофлори кишечника людини і тварин, деякі корисні властивості роблять їх важливим арсеналом поповнення корисних для здоров'я біопрепаратів. Антагонізм щодо широкого кола патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і самостійна елімінація з шлунково-кишкового тракту представляють конструювання лікувально-профілактичних препаратів з пробіотичних бацил особливо перспективним. Привертає також його стимулюючий вплив на травлення, протиалергенна, антитоксична і загально зміцнююча дія на організм як людей так і тварин [8].

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимцясь А.А.			РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скροцька О.І.					16	135
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Враховуюче все вище сказане, обираємо мікроорганізми з роду *Bacillus* в якості перспективного продуцента оскільки у літературі найчастіше використовують мікроорганізми саме цього роду при одержанні Ендоспорину.

При опрацюванні літературних даних, на практиці для отримання біопрепарату виділяють наступні штами: *Bacillus subtilis* АМК – 122, *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, *Bacillus subtilis* 3.

На першому етапі вибору різні штами продуцентів порівнюються за показниками синтезу культивування. Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей синтезу з використанням бактерій роду *Bacillus* як продуцентів для виготовлення пробіотика наведено у табл. 2.1

Особливості культивування клітин *Bacillus subtilis*

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Bacillus subtilis</i> АМК – 122	пивна дробина – 10; меляса – 18; кукурудзяний екстракт – 3; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,11; K ₂ HPO ₄ – 0,24; CaCl ₂ – 0,22;	36	5,1 (7 · 10 ⁹ КУО/мл)	pH 6,8-7,2; 37 °С,	Оразова Н.Ш. , Маметова А.З. Изучение состава питательной среды для культивирования <i>Bacillus subtilis</i> для получения кормовой пробиотической добавки. Материалы VIII Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум 2016» (Шымкент, ЮКГУ им. М. Ауезова, 15 лютого–31 березня 2016 р.) С. 23–27. [9].
<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023	меляса – 15 MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,3; NaCl – 0,3; CaCO ₃ – 3; K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O – 0,2; KH ₂ PO ₄ – 0,2; кукурудзяний екстракт – 2	48	1,3 (5,7 · 10 ⁹ КУО/мл)	pH 6,8-7,2;; t = 30°С	Царенко І.Ю., Рой А.О., Курдиш І.К. Оптимізація живильного середовища для культивування <i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023. <i>Мікробіологічний журнал</i> . 2011, 73(2), С. 13-19 [10].
<i>Bacillus subtilis</i> 3	висівки пшеничні – 40 MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,9 KH ₂ PO ₄ – 0,5 крейда осаждена – 1 кукурудзяний екстракт – 1	27	5,9 (1,29 · 10 ¹⁰ КУО/мл)	pH 7,0 ; t = 28°С	Сираева З.Ю., Захарова Н. Г., Ильинская О. Н. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида бацизулин. <i>Естественные науки</i> . 2010, 152(4): 169-178. [11].

Розрахунок концентрації біомаси

Оскільки у джерелах, які використовувались для складання табл. 2.1, крім *Bacillus subtilis* 3 [11] відсутня інформація про концентрацію біомаси вказаних продуцентів, зробимо її розрахунки по джерелу азоту. У табл. 2.2 наведені дані по джерелу азоту у складі поживних середовищ.

Таблиця 2.2

Джерело азоту для культивування бактерій роду *Bacillus*

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Джерело азоту, г/л
<i>Bacillus subtilis</i> АМК – 122	меляса – 18; пивна дробина – 10; кукурудзяний екстракт – 3; MgSO ₄ ·7 H ₂ O – 0,11 K ₂ HPO ₄ – 0,24; CaCl ₂ – 0,22;	Меляса – 18; пивна дробина – 10; Кукурудзяний екстракт – 3
<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023	меляса – 15 кукурудзяний екстракт – 2; K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O – 0,2; KH ₂ PO ₄ – 0,2; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,3; NaCl – 0,3; CaCO ₃ – 3.	меляса – 15; кукурудзяний екстракт – 2

Розрахунок концентрації біомаси *Bacillus subtilis* АМК – 122

До складу меляси входить аміний азот (0,5 % до маси сухих речовин). Розрахуємо кількість азоту, що міститься у 18 г меляси. Вміст сухих речовин у мелясі становить 75 %, тобто у 18 г меляси міститься $18 \times 0,75 = 13,5$ г сухих речовин. Отже, вміст амінного азоту у мелясі становить $(0,5 \times 13,5) / 100 = 0,0675$ г. У 100 г пивної дробини міститься 25,8 г білків [12].

Отже у 10 г – 2,58 г білків ($10 \times 2,58 / 100$). Концентрація доступного для бактерій органічного азоту (за елементом N) білку становить 15%. Отже, $2,58 \times 0,15 = 0,387$ г азоту міститься у 10 г пивної дробини. H₂O

У кукурудзяному екстракті вміст доступного для бактерій органічного азоту (за елементом N) становить 1,9 %. Отже, у 3 г кукурудзяного екстракту міститься $(1,9 \times 3) / 100 = 0,057$ г азоту.

Сумарний вміст азоту $0,057 + 0,0675 + 0,387 = 0,5115 = 0,51$ г/л.

У клітині 10-14% азоту. Для розрахунків приймаємо 10%. Тоді концентрація біомаси *Bacillus subtilis* АМК – 122 буде $0,51 \times 10 = 5,1$ г/л.

Розрахунок концентрації біомаси *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023

У 15 г меляси міститься $15 \times 0,75 = 11,25$ г сухих речовин. Азот складає 0,5 % маси сухих речовин. Отже азоту буде $11,25 \times 0,005 = 0,05625$ г.

У 2 г кукурудзяного екстракту міститься $2 \times 0,019 = 0,038$ г азоту.

Сумарний вміст азоту $0,038 + 0,05625\text{г} = 0,09425$ г

Отже концентрація біомаси *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 буде $0,09425\text{г} \times 10 = 1,3$ г/л.

Проаналізувавши таблицю 2.1, можна зробити висновок, що кожний із представлених продуцентів біомаси для одержання пробіотика у процесі біосинтезу має свої особливості. Найвищий показник біомаси – 5,9 г/л за 27 год досягається при культивуванні *Bacillus subtilis* 3. У порівнянні з *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 він набагато кращий, тому що концентрація біомаси у 4,5 рази більша. Середнім показником концентрації біомаси є 5,1г/л, що досягається при культивуванні *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023.

Зміни кислотності (рН) середовища, температурного режиму, аерація надають значний вплив на вихід остаточних продуктів метаболізму бактерій. Ці зміни можуть залежати як від технологічних умов культивування, так і від фізіологічних особливостей посівного матеріалу.

У запропонованих біологічних агентів особливості культивування є майже однакові за виключенням невеликої різниці між температурою процесу біосинтезу (від 28 до 37°C). Тому даний фактор можна не враховувати при виборі біологічного агента.

Порівнюючи час, необхідний для культивування, можна побачити, що штам *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 має найбільший час культивування (48 год). У *Bacillus subtilis* АМК – 122 час культивування менший на 12 годин. Штам *Bacillus subtilis* 3 показав порівняно невелику тривалість культивування (27 годин), яка менша майже в 2 рази у порівнянні з *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 та на 9 годин у порівнянні з *Bacillus subtilis* АМК – 122, а також забезпечує максимальне продукування біомаси.

Така порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою для вибору біологічного агента. Тому на другому етапі порівнювали вартість поживних середовищ (табл.2.3).

Таблиця 2.3

**Вартість компонентів поживного середовища
для культивування *Bacillus subtilis***

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації(1,2,3, 4,5,6,7,8)
<i>Bacillus subtilis</i> АМК – 122	пивна дробина - 10	0,9	0,009	1
	меляса - 18	35	0,63	2
	кукурудзяний екстракт - 3	55	0,165	3
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,11	12	0,00132	4
	K ₂ HPO ₄ , - 0,24	190	0,0456	4
	CaCl ₂ - 0,22	13	0,00286	5
Вартість 1л середовища 0,85 грн				
<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023	меляса – 15	35	0,5	2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,3;	12	0,0036	1
	NaCl – 0,3;	4,90	0,00147	6
	CaCO ₃ – 3;	29,7	0,0891	4
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O – 0,2;	60	0,012	7
	KH ₂ PO ₄ – 0,2;	120	0,024	4
	кукурудзяний екстракт – 2	55	0,11	3
Вартість 1л середовища 0,74 грн				
<i>Bacillus subtilis</i> 3	висівки пшеничні – 40	2,9	0,116	8
	MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,9	12	0,0108	4
	KH ₂ PO ₄ – 0,5	120	0,06	4
	крейда осаджена – 1	3	0,003	9
	кукурудзяний екстракт – 1	55	0,055	3
Вартість 1л середовища 0,24 грн				

1. <https://kiev.flagma.ua> 2. <https://megasvit.ua> 3. <https://agro-smart.com.ua> 4. <https://prom.ua/> 5. <https://kaapri.com/> 6. <https://snabhim.com.ua> 7. <https://ua.bizorg.su> 8. <https://dnepropetrovsk.flagma.ua> 9. <http://prombaza77.com>

***Примітка 1** Ціни на компоненти поживних середовищ взяті з українських промислових інтернет магазинів, станом на 2020 рік.

У табл. 2.3 наведено вартість компонентів поживних середовищ за 1 л середовища для культивування. Середовище для культивування *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 дешевше за *Bacillus subtilis* АМК – 122 на 0,11грн. Це незначна різниця але порівнюючи ціну цих поживних середовищ з ціною поживного середовища для *Bacillus subtilis* 3 переконаємось, що вони є дороговартісними. Середовище для культивування *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в три рази дорожче ніж у *Bacillus subtilis* 3, а у *Bacillus subtilis* АМК – 122 середовище для культивування в 3,5 рази дорожче.

Це пояснюється тим, що в складі цих середовищ є відносно дорогий компонент такий як K_2HPO_4 , а у середовищі для культивування *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023– 122 крім нього ще використовують $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, що є також дорогим.

Отже, за даними наведеними у табл. 2.3 можна зробити висновок, що середовище для культивування *Bacillus subtilis* 3 у порівнянні з іншими є економічно вигіднішим на виробництві, оскільки його вартість в 3,5 рази дешевша ніж у *Bacillus subtilis* АМК – 122 та у 3 рази дешевше ніж у *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, концентрація біомаси за певний проміжок часу більша (5,9г/л за 27год) ніж у *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023(1,3г/л за 48год) та *Bacillus subtilis* АМК – 122(5,1г/л за 36год), доцільно використовувати саме цей продуцент.

Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.4).

Умовна вартість 1 г біомаси *Bacillus subtilis*

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Bacillus subtilis</i> АМК – 122	5,1	36	0,1417	0,85	0,17
<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023	1,3	48	0,0271	0,74	0,57
<i>Bacillus subtilis</i> 3	5,9	27	0.2185	0,24	0,041

Штам *Bacillus subtilis* АМК – 122 має дороге поживне середовище, середню у порівнянні з іншими концентрацію біомаси та час культивування. Кількості утвореної біомаси за годину на 0,1146 більша ніж у *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 але менша на 0.0768 у порівнянні з *Bacillus subtilis* 3. Має середню умовну вартість 1г цільового продукту.

Штам *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 у порівнянні з *Bacillus subtilis* 3 має майже в 2 рази більший час культивування, вихід концентрації біомаси (г/л) у даного штаму дуже низький(на 4,6 менше ніж у *Bacillus subtilis* 3 та на 3,8 менше ніж у *Bacillus subtilis* АМК – 122) , поживне середовище у порівнянні з іншими дороге. Кількість утвореної біомаси за годину дуже низьке. Умовна вартість 1г цільового продукту в три рази дорожча ніж у *Bacillus subtilis* АМК – 122 та на 0.529 дорожча ніж у *Bacillus subtilis* 3.

Штам *Bacillus subtilis* 3, на відміну від інших, є досить перспективним.

У прівнянні з *Bacillus subtilis* АМК – 122: на 0,8г більшу концентрацію біомаси, на 9 годин меншу тривалість культивування, на 0.0768 більшу кількість

утвореної біомаси за годину, вартість 1л середовища в 3,5 рази дешевша, умовна вартість 1г цільового продукту на 0.129грн дешевша.

У порівнянні з *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023: в 4,5 разів більшу концентрацію біомаси, в 2 рази меншу тривалість культивування, на 0,1914 більшу кількість утвореної біомаси за годину, вартість 1л середовища на 0,5 грн дешевша, умовна вартість 1г цільового продукту на 0,529грн дешевша. Окрім цього має простий склад поживного середовища.

Усе вище сказане вказує на те, що даний штам має значні переваги у порівнянні з іншими штамми. А оскільки при масовому виробництві препарату важливе дешеве поживне середовище, з доступних компонентів, цей продуцент займає стійкі позиції відносно попередніх.

На основі порівняльної характеристики біологічних агентів, що використовують для отримання Ендоспорину, було обрано *Bacillus subtilis* 3, з причин найбільшої економічної доцільності, через низьку вартість поживного середовища, високу концентрацію біомаси, що є вирішальним для даного препарату, оскільки у ньому головне максимально можлива концентрація біомаси при мінімальних затратах на поживне середовище і параметри культивування, а в даних параметрах та концентрації біомаси виграє саме цей штам, оскільки інші не дотягують у співвідношенні цін поживного середовища до вихідної концентрації біомаси.

Оптимальним середовищем за продуктивністю штамів *Bacillus subtilis* виявилось середовище, до складу якого входять пшеничні висівки – продукт переробки пшениці, та інші речовини, що забезпечує концентрацію біомаси 5,9 г/л.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті.

Ендоспорин представляє собою ліофілізовану біомасу. Основу препарату складає біомаса *Bacillus subtilis* та весь комплекс біологічно активних речовин, які продукуються даним штамом в середовище росту та внутрішньоклітинно, стабілізатор та кріопротектор. Пробіотик є досить ефективним як для лікування так і для профілактики різних захворювань тварин. Також він не шкідливий для тварин в дозах, що перевищують рекомендує в 200 разів.[3] Зважаючи на це його використовують в ветеринарії та сільському господарстві при дизбактеріозах, кишкових, гнійних інфекційних захворюваннях, ендометритах та інших запальних хвороб, а також як кормову добавку до раціону харчування.

В Україні представлено багато пробіотичних препаратів на основі біомаси *Bacillus subtilis*. Тому, для їх порівняння наводимо таблицю 3.1.

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Тимцяє А.А.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скροцька О.І.				25	135
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

РОЗДІЛ 3. Техніко-
економічне обґрунтування

21

Ветеринарні пробіотики, що містять *Bacillus subtilis* у складі препарату

Назва препарату	Форма випуску	Ціна за упаковку	Виробник	Норми використання
Субалін	Порошок	277 грн 1 кг	«ENZIM» Україна	1
Ендоспорин	Порошок	В продажі немає	ІМВ Україна	2
Ентеронормин	рідина	175 грн 250 мл	ООО «СГП «МБС» Україна	3
Ветом 3	порошок	112 грн 50 г	ООО НПФ «Дослідницький центр» Росія	4
Probion-forte	порошок	350 грн 1кг	«Woogene B&G» Korea	5
Ветавіт	порошок	47 грн 1 г	Vetoprof Україна	6
БПС-44	порошок	4,5 грн 1 г	Vetoprof Україна	7
Ветом 1.1	порошок	561 грн 500 г	ООО НПФ «Дослідницький центр »Росія	8
Тиопротектин	порошок	57,5 грн 10 табл	«Артеріум» Україна	9
Бациніл-К	рідина	3.85 USD 100 мл	Інститут мікробіології НАН Беларусь	10
Ветом 1.2	порошок	741 руб. 500г	ООО НПФ «Дослідницький центр »Росія	11

Примітка: Ціни на препарати взяті з інтернет магазинів, станом на 2020 рік.

1. <https://market.enzim.biz/kormovie-preparati/probiotiki/subalin>
2. http://irbis-nbu.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbu/cgiirbis_64.exe?C21COM=2&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&IMAGE_FILE_DOWNLOAD=1&Image_file_name=PDF/MicroBiol_2012_74_5_10.pdf
3. <https://www.uley.in/shop/enteronormin-40-gr-250-ml-i-jodis-se-200-ml-probiotik-ukraina/>
4. <https://prom.ua/p579735879-vetom-vetom-probiotik.html>
5. <https://ukrfeed.prom.ua/p793349894-probiotik-kormovoj-dlya.html>
6. <https://prom.ua/p309990735-vetavit-vetoprof-preparat.html>
7. <https://www.zoostore.com.ua/zoo/catalog.cfm?rid=86&bid=126&iid=1520>
8. <https://zoohelper.com.ua/p740625663-vetom-vetom-probiotik.html>
9. https://vetmarket.biz.ua/catalog/drugie/tioprotektin_20_tabl_kh_0_1_g_arterium/
10. <https://export.by/en/product/30440>
11. https://bagira-vet.club/catalog/koshki/lechenie_1/zhkt_1/vetom_1_2_500g.html

Проаналізувавши дану таблицю, бачимо, що препарат Ендоспорин не надходив до продажу в Україні, тому що не знайдено жодної інформації про вартість препарату. Стосовно інших препаратів, ціна відома, але у кожного препарату різна місткість упаковки. Зважаючи на це наводимо дані щодо норм використання кожного у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Норми використання пробіотиків, що містять *Bacillus subtilis* у складі препарату

Препарат	Вид						Джерело
	Свині	Велика рогата худоба	Коні	Бджоли	Домашні тварини	Птиця	
Субалін	-	-	-	-	100-200 *10 ⁶ КОЕ/кг маси тварини, 1 раз на добу, 5 днів	-	1
Ендоспорин	1г розчинений в дозі 50мл води, 1 раз на добу, 15-20 днів	1г розчинений в дозі 50мл води, 1 раз на добу, 15-20 днів	-	-	-	1г розчинений в дозі 50мл води, 1 раз на добу, 15-20 днів	2
Ентеронормин	-	-	-	25мл на добову норму сиропу з повтором через 5-7 днів	-	-	3
Ветом 1.2	1г розчинений в дозі 50мл води, 1 раз на добу, 15-20 днів	аналогічно	аналогічно	-	аналогічно	-	4
Ветом 3	1г розчинений в дозі 50мл води, 1 раз на добу, 15-20 днів	аналогічно	-	-	аналогічно	аналогічно	5
Probion-forte	500г/тону корму					500г/тону корму	6

Ветавіт	-	-	-	-	1г розчиняють в невеликій кількості води, 2 рази на добу, 5 днів	-	7
БПС-44	-	-	-	-	1гр розчиняють в 10мл води	-	8
Ветом 1.1	1г розчинений в дозі 50мл води, 1 раз на добу, 15-20 днів	аналогічно	-	-	аналогічно	аналогічно	9
Тиопротектин	-	-	-	-	-	0,5-1 таблетка, 2-3 рази в день, 14-20 днів	10
Бациніл-К	1 мл / 1 тварину в день 1, 3 дня	10 мл / 100 мл води / 1 тварину в день 1,3 дня	-	-	-	1л/100л води 5 днів в 2-3 цикла, інтервал 7-10 днів	11

1. <http://earthpapers.net/primenenie-probiotika-subalin-na-pushnyh-zveryah-semeystva-canidae>
2. <https://uapatents.com/6-14569-biopreparat-endosporin-dlya-likuvannya-i-profilaktiki-endometritiv-tvarin.html>
3. <https://www.uley.in/shop/enteronormin-40-gr-250-ml-i-jodis-se-200-ml-probiotik-ukraina/>
4. <https://www.vidal.ru/veterinar/vetom-1-2-30883>
5. <https://www.vidal.ru/veterinar/vetom-3-28167#dosage>
6. <https://ukrfeed.prom.ua/p793349894-probiotik-kormovoj-dlya.html>
7. <https://prom.ua/p309990735-vetavit-vetoprof-preparat.html>
8. <https://www.zoostore.com.ua/zoo/catalog.cfm?rid=86&bid=126&iid=1520>
9. <https://www.vidal.ru/veterinar/vetom-1-1-28165>
10. https://vetmarket.biz.ua/catalog/drugie/tioprotektin_20_tabl_kh_0_1_g_arterium/
11. <http://mbio.bas-net.by/prod/bacinil/>

Проаналізувавши таблицю 3.2, бачимо, що не всі пробіотики на основі *Bacillus subtilis* можна застосовувати для різних тварин. Деякі з них використовуються лише для певних тварин. Оскільки Ендоспорин використовують лише для свиней, великої рогатої худоби та птиці, ми повинні обрати яку із цих груп будемо забезпечувати ним. Також необхідно звернути увагу на конкуренцію з іншими виробниками. При забезпеченні свиней у нас буде 5 конкуруючих компаній, великої рогатої худоби – 4, птиці – 5.

Зважаючи на вище сказане, вирішено забезпечувати даним препаратом велику рогату худобу, оскільки конкуренція на ринку, порівняно з іншими, нижча.

Оскільки не було знайдено детальної інструкції по використанню Ендоспорину, вирішено забезпечувати велику рогату худобу Ендоспорином для профілактики дизбактеріозів, ендометритів.

За статистикою на 1 жовтня 2020 року по всій Україні було зареєстровано 3340,2 тис. голів великої рогатої худоби. (<https://ukrstat.org/uk>)

Наведемо таблицю 3.3 по кількості великої рогатої худоби у кожній із областей, щоб зручніше було обрати одну із них.

Кількість великої рогатої худоби по областях на 01 жовтня 2020

Область	Велика рогата корова, тис. голів
Вінницька	240,8
Волинська	126,6
Дніпропетровська	139,8
Донецька	65,2
Житомирська	184,5
Закарпатська	140,7
Запорізька	77,4
Івано-Франківська	134,7
Київська	114,0
Кіровоградська	91,3
Луганська	47,3
Львівська	202,6
Миколаївська	102,9
Одеська	153,2
Полтавська	223,3
Рівненська	101,8
Сумська	141,9
Тернопільська	158,8
Харківська	161,2
Херсонська	88,9
Хмельницька	229,9
Черкаська	156,4
Чернівецька	86,4
Чернігівська	170,6

Як можна побачити у Вінницькій області ,за даними статистики, зареєстровано найбільшу кількість голів великої рогатої худоби(240,8тис. голів). Виходячи з цього, вирішуємо забезпечувати Ендоспорином Вінницьку область.

Потребу в Ендоспорині будемо розраховувати на кількість великої рогатої худоби, для лікування та профілактики ендометритів та дизбактеріозів.

Для цього порахуємо необхідну кількість препарату для забезпечення даної області.

Як було вказано в табл. 3.2, 1г розчиняють з водою в дозі 50 мг води, 1 раз / добу протягом 15-20 днів.

$$\text{Тобто: } 1\text{г} * 240\,800 * 1 * 20 \text{ днів} = 4\,816\text{кг}$$

Оскільки, у сухому препараті близько 90 % – це наповнювач, і лише 10 % припадає на біомасу, її кількість:

$$4\,816 * 0.1 = 482 \text{ кг}$$

Враховуючи наявні на ринку пробіотики (табл. 3.1 і 3.2), будемо проводити розрахунки для забезпечення 10% великої рогатої худоби від вказаної кількості.

$$482\text{кг} * 0.1 = 48\text{кг}$$

Знаючи концентрацію біомаси (5,9 г/л), яку синтезує штам *Bacillus subtilis* 3 [11], ми можемо розрахувати кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 48кг :

$$5,9 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$48\,000 \text{ г} - X$$

$$X = 8136 \text{ л} = 8,136 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини.}$$

Враховуючи всі сумарні витрати на виробництві (15%), необхідно отримати таку кількість препарату:

$$V_{\text{кр}} = 8,136 / 0,85 = 9,6 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини/рік.}$$

Отже, потужність виробництва становить 9,6 м³.

3.2. Розрахунок кількості виробничих циклів та герметичного об'єму ферментера для культивування *Bacillus subtilis* 3

Для забезпечення потреби ендоспорину в Вінницькій області необхідно виробляти 9,6 м³ культуральної рідини на рік.

1) Кількість продукту на добу. Прийmemo кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 31, тоді кількість продукту на добу ($V_{\text{д}}$) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 9,6 / 31 = 0,3 \text{ м}^3 / \text{добу}$$

2) Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{\text{кр}}$):

$$V_{кр0} = K1 * V_d * T_{цф} / 24 = (1,1 * 0,3 * 37) / 24 = 0,51 \text{ м}^3/\text{цикл}.$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (37 год), що включає час біосинтезу (27 год), та час підготовки ферментера – 10 год. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд – 2 год, перевірка на герметичність – 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, відвантаження культуральної рідини – 1 год; $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій (1,1-1,5).

3) Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі $E_{ф} = 0,1$ становить:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 0,51 / (1 - 0,1) = 0,57 \text{ м}^3.$$

4) Геометричний об'єм ферментера для отримання $0,57 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення $0,6$ має становити:

$$V_{г} = V_{ф} / K_{зап} = 0,57 / 0,6 = 0,95 \text{ м}^3, \text{ найближчий ферментер } 1 \text{ м}^3.$$

$$\text{Перевіряємо коеф. заповнення: } K_з = 0,57 / 1 = 0,57.$$

4) Кількість циклів на рік:

$$N_{цк} = V_d / V_{крц} = 9,6 / 0,51 = 19 \text{ циклів/рік}$$

3.3. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл необхідно отримати $V_{кр} = 0,51 \text{ м}^3$ культуральної рідини, але слід врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10% ($E_{ф}$).

$$V_{роб.1} = V_{кр1} - E_{ф} = 0,51 - 0,1 = 0,57 \text{ м}^3$$

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

Для культивування необхідний ферментер, геометричний об'єм якого становить:

$$V_{ф.1} = V_{роб.1} / K_з = 0,57 / 0,6 = 0,95 \text{ м}^3$$

Найближчий за номінальним об'ємом ферментер $V_{сф} = 1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 0,57 / 1 = 0,57$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.11} + X_{ф} = 0,571 + 0,1 = 0,52 \text{ м}^3$$

де $X_{ф}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 0,57 - 0,52 = 0,05 \text{ м}^3 (50 \text{ л})$$

Необхідно отримати 0,05 м³ посівного матеріалу, але слід врахувати втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10% ($E_{ф}$).

$$V_{роб.2} = V_{пм11} - E_{ін} = 0,051 - 0,1 = 0,056 \text{ м}^3$$

Посівний матеріал (0,056 м³) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{ін1} = V_{роб.2} K_з = 0,056 \cdot 0,6 = 0,093 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{ін1} = 0,1 \text{ м}^3$

Уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = V_{роб.2} V_{ін1} = 0,056 \cdot 0,1 = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.21} + X_{ін} = 0,0561 + 0,1 = 0,051 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 0,056 - 0,051 = 0,005 \text{ м}^3 (5 \text{ л})$$

Для одержання 5 л посівного матеріалу розрахунки проводяться аналогічно.

$$V_{роб.3} = V_{пм21} - E_{ін} = 51 - 0,1 = 5,6 \text{ л}$$

Посівний матеріал (5,6 л) для засівання інокулятора можна отримати під час культивування продуцента у апараті об'ємом:

$$V_{ін.2} = V_{роб.3} K_з = 5,6 \cdot 0,6 = 9,3$$

Найближчим за номінальним об'ємом інокулятор $V_{ін2} = 10 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = V_{\text{роб.3}} V_{\text{ін2}} = 5,610 = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} + X_{\text{ін}} = 5,61 + 0,1 = 5,71 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 5,6 - 5,1 = 0,5 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 0,5 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}} = 500 / 750 \times 0,2 = 4 \text{ колб}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочних колб.

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у 1 м³ ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,6 складається з 3 стадій.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату у біологічного агента – *Bacillus subtilis*

Ростовим субстратом для біосинтезу біомаси пробіотика за допомогою *Bacillus subtilis* є пшеничні висівки, що складаються з різних складових (здебільшого з крохмалю) [13]. При катаболізмі крохмаль під дією фермента амілази розкладається на глюкозу яка і залучається до біосинтезу.

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху глюкози катаболізм цукрів – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes для цього штаму, наводимо схему перетворення глюкози (рис 4.1).

Глюкоза за участю глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.199) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомеразі (КФ 5.3.1.9) перетворюється на β -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктози 6-фосфат у β -D-фруктозу 1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозу 1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомеразі (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеронфосфат. До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат 2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Тимцясь А.А.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.				37	135
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					

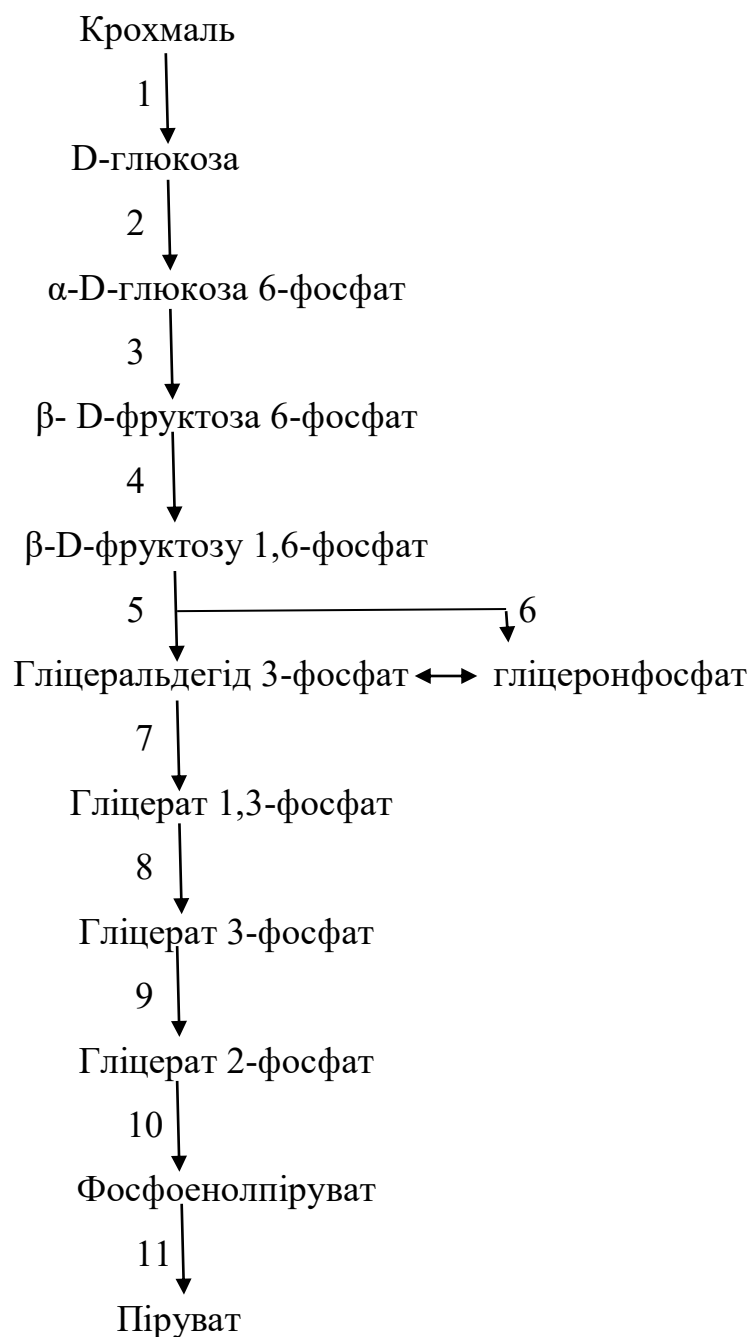


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса

Ферменти: 1 – амілаза; 2 – глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.199); 3 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 – фосфоглюкокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); 5 – фруктозодифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 6 – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); 7 – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 9 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 10 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 11 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Так як цільовим продуктом є біомаса клітин, необхідно навести синтез основних складових : ліпідів, білків, нуклеїнових кислот та полісахаридів.

Перед синтезом цих складових необхідно синтезувати їх попередників та розкласти крохмаль з залученням фермента амілази для подальшого синтезу необхідних компонентів.

Спочатку проходить процес гліколізу. Після цього Ацетил КоА, що утворився використовується в багатьох процесах. Зокрема він необхідний для функціонування ЦТК, який виконує життєво важливі функції: основне джерело НАДН(у дихальному ланцюгу окиснення генерує АТФ); інтермедіати ЦТК є вихідними для процесів біосинтезу.

Так попередниками амінокислот (складових білків) є Ацетил КоА(Лізин), 2-оксоглутарат(глутамат, глутамін, пролін, аргінін). Також Ацетил КоА необхідний для синтезу жирних кислот. Оксалоацетат необхідний для синтезу аспартату, з якого потім синтезується аспарагін, метіонін, треонін і ізолейцин. Є попередники біосинтезу амінокислот і в гліколізі: піруват (аланін, валін, лейцин), 3-фосфогліцерат (серин, гліцин, цистеїн; триптофан).

Глюкозо-6-фосфат необхідна для функціонування пентозофосфатного шляху, у якому рибулозо-5-фосфат є попередником біосинтезу АТФ та ГТФ (складових пуринових нуклеотидів). Також пентозофосфатний цикл постачає НАДФН для конструктивного метаболізму. Попередниками для синтезу піримідинових нуклеотидів є аспартат та карбамоїлфосфат.

Окрім цього у пентозофосфатному циклі синтезуються еритрозо-4-фосфат та фосфорибозил-пірофосфат, які необхідні для синтезу родини ароматичних амінокислот і гістидину.

Попередником для синтезу полісахаридів зокрема для пептидоглікану є фруктозо-6-фосфат (з гліколізу).

Для біосинтезу ліпідів необхідними є Фруктозо-1,6-дифосфат та гліцеральдегід-3-фосфат які під дією ферментів утворюють діоксиацетонфосфат,

який є попередником синтезу ліпідів. Також для синтезу ліпідів залучаються жирні кислоти.

Так пуринові та піримідинові нуклеотиди утворюють нуклеїнові кислоти (ДНК чи РНК), а використовуючи амінокислоти у рибосомах синтезуються необхідні білки.

Наведено схему біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт (Згідно з KEGG) у якій детально зображено які ферменти залучаються у тій чи іншій реакції.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

5.1.1.1. Вибір умов і способу культивування.

Спосіб культивування *Bacillus subtilis* 3 обираємо на основі фізіолого-біохімічних ознак продуцента. Тому важливим є визначення таких умов:

1. Для культивування *Bacillus subtilis* 3 необхідно створити кисневі умови, так як продуцент є облигатним аеробом. Для забезпечення таких умов використовують барботер для подачі кисню, перемішуючий пристрій для інтенсифікації масообмінних процесів та піногасник.

2. В мікробіологічній промисловості використовують два способи культивування мікроорганізмів – поверхневий і глибинний. В промислових умовах поверхнєве культивування використовується не так часто, через обмежене застосування. Це пояснюється низьки рівнем механізації та автоматизації технологічного процесу, невисокою продуктивністю ферментаційного обладнання. Окрім цього при поверхневому культивуванні низька ступінь використання компонентів поживного середовища, що впливає на концентрацію біомаси. У зв'язку з викладеним вище, культивування *B. subtilis* 3 для одержання Ендоспорину вигідніше здійснювати глибинним способом.

3. Режим культивування обираємо періодичний. Процес ферментації проводять до стаціонарної фази розвитку культури, так як в цій фазі кількість клітин перестає збільшуватись, спостерігається максимальна біомаса і максимальна сумарна кількість клітин. Причинами вибору періодичного культивування в основному є малотоннажні і широкий асортимент продуктів, що виробляються,

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Тимцясь А.А.					41	135
Перевір.		Скороцька О.І.						40
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

а також особливості культивування тих чи інших їх продуцентів, що не дозволяє уніфікувати як ферментери, так і їх технологічне оснащення. Також в нашому випадку необхідно виділити максимальну кількість життєздатних клітин та спор, тому вибираємо періодичний спосіб культивування [14].

4. Виробниче культивування та вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 27 °C і рН 7,0(нейтральне), аерація 180 об/хв. Таким чином, культивування *Bacillus subtilis* 3 ,для одержання біомаси, здійснюється в аеробних умовах, глибинним способом у періодичному режимі протягом 27 години при дотриманні усіх правил асептики.

5.1.1.2. Вибір типу ферментера

Залежно від умов культивування біологічного агента конструкція і оснащення ферментера може відрізнятися. Визначившись зі способом культивування та фізіологобіохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов.

1. У процесі культивування продуцента подача аераційного повітря в ферментер забезпечує відведення надлишку CO₂ з середовища. Окрім цього ферментер повинен бути оснащений датчиками рO₂ (для контролю аеробних умов), газоаналізатором (для контролю концентрації CO₂)/

2. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач з частотою обертів 180 об/хв [11].

Механічні мішалки за конструкцією досить різноманітні. Найбільш простими за влаштуванням є мішалки з плоскими лопатями встановленими перпендикулярно або похило до напрямку їх руху. Для поліпшення перемішування рідини частіше застосовують мішалки з горизонтальними і вертикальними лопатями або так звані рамні мішалки, у яких нижня горизонтальна лопать має радіус кривизни.

У тих випадках, коли при перемішуванні необхідно видаляти осад або рідину зі стінок апарату, для інтенсифікації процесу теплообміну застосовують якірні мішалки, зовнішній контур яких відповідає контурах dna і корпусу апарату. Турбінні мішалки застосовують для швидкого розчинення і емульгування. У

поєднанні з апаратом їх використовують для диспергування і в поєднанні з барботером для процесів взаємодії газу з рідиною. Для поліпшення перемішування маси рідини по всій висоті застосовують пропелерні мішалки з декількома пропелерами і дифузором [15]. Оскільки культивування продуцента біомаси для одержання Ендоспорину не передбачає встановлення перемішуючого пристрою певної особливої конструкції і типу, то він обирається довільно.

Для процесу отримання біомаси з поживного середовища, яке має не високу в'язкість, а процес біосинтезу потребує інтенсивного перемішування та аерування доцільно використовувати якірну мішалку з частотним регулятором обертів.

3. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

4. Щоб запобігти можливого утворення піни будемо використовувати механічний спосіб піногасіння, принцип дії якого полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата, яка по команді датчика буде обертатися і розбивати піну.

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

З метою інтенсифікації масо- і енергообміну клітин з середовищем розроблені апарати аеробної глибинної ферментації. Але ці апарати мають більш складну конструкцію.

Ферментери з комбінованим підведенням енергії являть собою циліндричну посудину, усередині якої розташована механічна мішалка і барботер. В апаратах цього типу підведення енергії до газової фази здійснений для аерації, а до рідкої фази - для перемішування [16].

Зважаючи на те, що об'єм ферментатора у нашому випадку становить 1 м^3 . коефіцієнт заповнення становить $0,6 = 60\%$. Обираємо ферментер-біореактор фірми «BIORUS» повним об'ємом у 1000 л з нержавіючої сталі [17].

Ферментери відрізняються великою функціональністю і підходять для періодичної ферментації. Всі дані вимірювань і контрольні параметри відображаються на кольоровому сенсорному екрані. Ферментер в стандартній

комплектації оснащений насосами, за допомогою яких виконується подача кислоти, лугу, піногасника і поживного середовища.

Подача повітря в ферментер здійснюється через стерилізуючий фільтр, через ротаметр. Система комплектується кільцевих барботером. На лінії виходу газу з ферментера встановлений конденсор для конденсації вологи, що випаровується. Контроль температури здійснюється шляхом подачі охолодженої води в металеву сорочку. Автоматичний контроль піногасіння здійснюється за допомогою електрода датчика піни [18].

При вирощуванні аеробних мікроорганізмів вміст ферментера безперервно аерується пропусканням під тиском стерильного повітря, що утворює безліч дрібних бульбашок. Повітря доставляє кисень і, проходячи через апарат, видаляє CO₂ [19].

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

Отже, для проведення виробничого біосинтезу необхідно замовити даний ферментер та підготувати все необхідне для його експлуатації.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадій підготовки аераційного повітря.

Оскільки *Bacillus subtilis* є факультативно аеробними бактеріями [20], високий рівень аерації при накопиченні біомаси в ферментерах не потрібен. Зважаючи на це підготовка стерильного аераційного повітря при культивуванні є однією з важливих задач на біотехнологічному підприємстві.

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи.

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки та індивідуальних фільтрів. Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед кожним ферментером або інокулятором. Головні фільтри заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється близько 98%

мікроорганізмів-контамінантів. Використання ж індивідуальних фільтрів, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, дає змогу отримати повітря зі ступенем очистки 99,9999%

Пористі матеріали для фільтрів грубої та тонкої очистки відрізняються великим різноманіттям. Їх можна розділити на чотири групи: волокнисті з нетканого матеріалу, мікроструктура яких нагадує багаточарові, частково перекриваючі сітки, папири та картони, що мають більш щільну структуру, спечені керамічні та порошкові зернисті матеріали, що мають звивисті канали з періодичним звуженням та розширенням по всій товщі матеріалу і пористі мембрани-плівки, маючи ситовий механізм фільтрації, розмір пор котрих визначає розмір фільтруючих частинок. Перші три групи мають неситовий тип фільтрації, а четверта ситовий.

В фільтрах грубої бактеріальної очистки застосовують першу групу матеріалів, частіше за все зустрічаються скловолокнисті матеріали з діаметром пор 7-21 мкм. Їх основним недоліком є слабка стійкість до стерилізації гострою парою.

Матеріали з базальтового волокна з середнім діаметром пор 26 мкм являються більш стійкими але вони менш поширені в виробництві.

Неткані матеріали з антимікробних целюлозних волокон не потребують стерилізації гострим паром, можуть бути використані для стерилізуючого фільтрування.

Основним недоліком волокнистих фільтрів є зміна розміру пор в процесі експлуатації, а також через потрапляння вологи на сам фільтр, що може призвести до небажаних проскоків сторонніх матеріалів.

Спечені зернисті матеріали, як кераміка, скловолокно або металокераміка мають контролюючу структуру, хімічно інертні, легко піддаються методам стерилізації, мають високу міцність, дешеві та прості в виготовленні. Їх головний недолік це невисокий ступінь очистки повітря який варіюється в межах від 65% до 95%. [21]

Проаналізувавши ці данні можна підібрати фільтруючі матеріали для різних етапів очистки повітря.

Для грубої очистки повітря на головних фільтрах, прийнято рішення використовувати рулонні повітряні фільтроматеріали класу очистки G4 які виробляються з висококласної фільтрувальної сировини, що представляє собою неткане полотно, а саме синтетичні волокна 100% поліестеру, вироблене методом термічного скріплення при температурі понад 100°C. Завдяки спеціальній прогресивній структурі, фільтрувальний матеріал G4 гарантує високу пилоємність і результативність очищення повітря до 95%.

Для фільтрів тонкої (HEPA) прийнято взяти фільтроматеріал середнього класу очистки, оскільки готовий продукт використовують для тварин та не потребує високої чистоти.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.

Синтез біомаси, як основи препарату «Ендоспорин» здійснюється упродовж 330 днів. Оскільки культивування *B.subtilis* 3 здійснюється у 1 м³ ферментері, весь процес виробництва можна здійснювати в одному приміщенні.

Обладнання слід розташувати так, щоб до нього був забезпечений вільний доступ як для прибирання так і для технічного обслуговування. Відстань між окремими апаратами має становити 1м один від одного, а відстань від апарата до стіни 1 м.

Площа приміщення, у якому буде проходити процес виробництва, що складається з ферментера об'ємом 1м³, інокуляторів – 100 та 10л та реакторів об'ємом 130 та 25л буде дорівнювати 48 м² (6×8).

Висота стін становить 6 м.

Загальна площа стін для приміщення становить

$$((6 \times 6) + (6 \times 8)) \times 2 = 168\text{м}^2.$$

Загальна площа підлоги – 48м².

Необхідно розрахувати витрати дезінфікуючих засобів. Приблизно на 1 м² витрачається 100 мл робочого розчину. Приймаємо, що обладнання потрібно мити перед кожним виробничим циклом - 196 разів, підлога миється кожного робочого дня , загалом 330 разів, а стіни, вікна та двері раз на місяць, загалом 11 разів на рік.

Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити або дезінфікувати для всіх приміщень (табл. 5.1)

Загальна площа миття та дезінфекції робочих приміщень на виробництві

Об'єкт миття або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту (м ² , м ³)	Кількість миттів або дезінфекцій за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² , м ³
Обладнання, інвентар, комунікації	1,26 м ³	196	*247 м ³
Підлога	48	330	15 840
Стіни, двері, вікна	168	11	1 848

Загальні нормативні вимоги, що пред'являються до миючих та дезінфікуючих засобів.

Технічний регламент визначає обов'язкові вимоги до мийних засобів а також до поверхнево-активних речовин входять до їх складу.

Миючий засіб - будь-яка речовина або препарат, що містить мило та / або інші поверхнево-активні речовини, призначені для прання або очищення. Миючий засіб може бути в формі рідини, порошку, пасти, бруска, плитки, таблетки і т.п.

Поширюється на:

миючі засоби, призначені для прання або очищення і введені в обіг на території України для використання споживачем;

допоміжні миючі засоби, призначені для замочування, полоскання або відбілювання виробів з тканин;

пом'якшувачі тканини, які використовуються в процесах, які доповнюють прання;

засоби для очищення матеріалів, виробів, механізмів, механічних пристроїв, транспортних засобів та допоміжного обладнання, інструментарію, апаратури тощо,

призначені для використання у побутовій сфері;

інші препарати, призначені для використання під час прання і очищення.

Вимоги до миючих засобів:

Рівень повного біологічного розкладу ПАР, що входять до складу мийного засобу, повинен становити за 28 днів не менше 60 відсотків (по двоокису вуглецю) або 70 відсотків (за загальним органічним вуглецем).

У разі, якщо рівень повного біологічного розкладу ПАР, що входять до складу мийного засобу, нижче зазначених величин, для промислових миючих засобів повинно застосовуватися вимога щодо первинного біологічного розкладу ПАР, що входять до складу мийного засобу.

Рівень первинного біологічного розкладу ПАР, що входять до складу мийного засобу повинен становити не менше 80 відсотків. Методи контролю за ДСТУ 7283: 2012 і ДСТУ 7284: 2012.

Миючі засоби:

Миючі засоби поділяють за призначенням, консистенцією, видом миючої речовини, змісту миючої речовини та іншими ознаками. За призначенням миття ділять на господарські, спеціальні (медичні, технічні та ін.). За консистенцією розрізняють миючі засоби тверді (гранульовані, порошкові), мазеподібні (пасти) і рідкі.

Найбільш широке застосування знайшли порошкові засоби. Зручні миючі засоби у вигляді гранул і паст. Рідкі засоби легко розчиняються, добре дозуються.

Залежно від виду миючої речовини миючі засоби поділяють на мила і синтетичні мийні засоби. Кількість миючих речовин в засобі коливається від 5 до 85%. Більшість мийних засобів господарського призначення містять 10-75% миючих речовин

Санітарна підготовка приміщень — один з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти. Ціль такої обробки — зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень. Дезінфекція поверхонь приводиться, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40—60% від їхнього вихідного вмісту. При виборі дезінфікуючого засобу необхідно враховувати не тільки його бактерицидні

властивості і спектр дії, але і можливу токсичність для людини. Рекомендується при прибиранні застосовувати 2—6% розчин перекису водню або інші дезінфікуючі засоби. Хорошими дезінфікуючими властивостями володіють пари формальдегіду.

Рекомендується чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1–3 місяці з метою запобігання появі стійких штамів мікроорганізмів.

Миючі та дезінфікуючі засоби слід контролювати на мікробіологічну чистоту. Їх розчини потрібно зберігати у попередньо очищеній тарі та суворо дотримуватись строків придатності.

Дезінфікуючі засоби:

Для дезінфекції підлоги та стін обираємо хімічний метод, оскільки інші способи ми не можемо застосовувати. Миття будемо проводити методом протирання поверхності використовуючи необхідний для цього інвентар та миючий засіб.

Миття обладнання проводиться методами циркуляції робочого розчину в системі СІР – мийка. Заповнення резервуара ферментера або інокулятора робочим розчином складатиме близько 20% від свого максимального об'єму кожного обладнання відповідно. Інокулятор об'ємом 10л та реактор на 25л митимемо власноруч.

Критерії для класифікації

Дезінфікуючі засоби мають кілька критеріїв для поділу на групи. Перший – по типу випуску. Вони можуть випускатися у вигляді:

- рідини;
- суспензії;
- порошку;
- гранул;
- гелю;
- спрею;
- серветок з просоченням;
- таблеток.

Другий критерій - в залежності від того, яка діюча речовина лежить в основі дезінфектантів:

Спирт. Не залишає слідів, швидко випаровується, дешево коштує.

Хлор. Такі склади мають широкий спектр знезаражувальної дії. При використанні слід пам'ятати, що вони можуть викликати корозію металевих поверхонь.

Феноли. Вигідна особливість таких засобів в тому, що вони створюють захисну плівку, яку нелегко видалити з дезінфікуючої поверхні. Цим вони дозволяють довго зберігати чистоту в приміщенні.

Альдегіди. Мають великий спектр дії, негативно впливають навіть на спори грибів. Легко проникають до місць скупчення мікробів на матеріалах, при цьому не викликаючи корозію металів.

Перекис водню. Не мають характерного запаху, малотоксичні і вважаються одними з найбільш безпечних для навколишнього середовища. Можна знезаражувати стійкі до корозії металеві поверхні, скло та пластмасу.

Третинні аміни. Малотоксичні і мають хороші миючі характеристики. Діють проти більшості штамів мікроорганізмів.

Четвертинні аміни. Малотоксичні, ефективні проти патогенних штамів мікроорганізмів. Використовуються для знезараження обладнання і поверхонь.

Органічні сполуки. В основному служать для дезінфекції систем гемодіалізу.

Гуанідинів. Нетоксичність дозволяє використовувати їх і в харчовій промисловості. При нанесенні на предмети вони утворюють стійку плівку.

Комбіновані дезінфікуючі засоби. Складаються з декількох перерахованих вище активних діючих речовин і пригнічують широкий спектр мікробів і бактерій.

Обґрунтування вибору дезінфікуючих розчинів

Приготовані миючі та дезінфікуючі розчини потрібно зберігати у попередньо очищеній тарі та суворо дотримуватись строків зберігання. Дезінфікуючі розчини мають відповідати таким вимогам:

- бактерицидна дія;
- хімічна стійкість;
- не ушкодження поверхонь обладнання.

Миючі та дезінфікуючі засоби, що використовуються в зонах класів А та В

перед використанням мають бути стерильними.

На підприємстві використовуються такі дезрозчини:

для дезінфекції обладнання використовують: розчин хлораміну та розчин каустичної соди;

для дезінфекції приміщень: розчин перекису водню 3%,6%, дексоцид.

Щоб уникнути резистентності патогенних мікроорганізмів до дії миючих засобів, необхідно використовувати засоби з різними діючими речовинами, тому обираємо декілька з них для використання. Для цього складаємо таблицю орієнтовного розрахунку потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на 2020 рік. Також вони повинні бути в «Державному реєстрі дезінфекційних засобів» і мати Інструкцію (чи Методичні вказавки) по застосуванню.

Таблиця 5.2

Орієнтовний розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на 2020 рік

№ з/п	Найменування підрозділів об'єкта	Кількість підрозділів	Площа, що підлягає дезінфекції, кв. м		Дезінфікуючий засіб			Кратність обробок			Потреби в деззасобах, л (кг)			
			При поточному прибиранні	При генераль-ному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину, %	Норма витрати робочого розчину на 1 кв. м	На добу	На місяць	с/на рік	На одну обробку		На місяць	На рік
											При поточному прибиранні	При генераль-ному прибиранні		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	Обладнання, інвентар, комунікації,	3	1,26 м ³	1,26 м ³ +216м ²	Засіб дезінфекційний ErsoChlor Wash	гіпохлорит натрію в перерахунку на актив-ний хлор – 5-10%, сода каустична - 7-15%	100мл		18	196	1,26	23	184	2018
	Підлога,		48					30	330	4,8				
	Стіни, вікна, двері		168					1	11	17				
2	Стіни, вікна, двері	2	168	216	Дівосан Форте	надоцтова кислота - 15,0 %	100мл		1	11	17	22	161	1769
	підлога		48					1	30	330	5			
3	Стіни, вікна, двері	2	168	216	Біопагdez	2-пропанол 9,0%,	100мл		1	11	17	22	161	1769

	підлога		48			хлоргексидину біглюконат 0,45%, перекис водню 0,3%		1	30	330	5			
4	Обладнання, інвентар, комунікації	1	1,26 м ³	1,26 м ³	ІнструСефДес	7,0 - Біс(3-амінопропіл) додециламін; 6,3 - дидецилметил- поліоксіетил- амоніумпропіонат	100мл		18	196	1,26	1,26	23	247
5	Обладнання, інвентар, комунікації	1	1,26 м ³	1,26 м ³	Септофан	полігексаметиленгуанідін гідрохлорид (ПГМГ ГХ) – 0,25±0,025%, алкілдиметилбензиламоній хлорид – 10,0±0,5%, дидецилдиметиламоній хлорид – 7,5±0,5%, діоктилдиметиламоній хлорид – 7,5±0,5%, 2-пропанол – 5,0±0,5%)	100мл		18	196	1,26	1,26	23	247
6	Стіни, вікна, двері	2	168	216	Сурфаніос преміум	N-(3-амінопропіл)-N- додецилпропан-1,3-діамін - 4,59, дидецилдиметиламоній хлорид - 2,25	100мл		1	11	17	22	161	1769
	підлога		48			1		30	330	5				

Отже, проаналізувавши таблицю 5.2 можна зробити висновок, що для миття обладнання, інвентарю та комунікацій обираємо еко-хлор, так як він є досить сильною лужною речовиною (рН=12,5) і являється універсальним миючим засобом. Також еко-хлор екологічно безпечний речовина на відміну від звичних миючих засобів, які містять фосфати. Ще однією перевагою є те, що натрій гідроксид є найдешевшим миючим засобом і це допоможе значно скоротити витрати виробництва.

Для миття стін, підлоги, вікон та дверей «Дівосан Форте» та «Біопагdez». Зокрема останній миючо-дезінфікуючий засіб володіє досить широким спектром антимікробної дії, не псує обробляючі об'єкти, засіб не зумовлює подразнюючу дію при контакті зі шкірою та при взаємодії із слизовими оболонками очей. Також має пролонговану дію та є економічно доцільним. Дані миючо-дезінфікуючі засоби використовують з інтервалом в 3 місяці, що дозволяє запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

Тому, будемо змінювати дані засоби на інші представлені в таблиці, щоб запобігти розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

5.1.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез біомаси *Bacillus subtilis* 5,9 г/л за 27 годин досягається за умов росту штаму *Bacillus subtilis* 3 на середовищі такого складу (г/л):

висівки пшеничні – 40;

MgSO₄ · 7H₂O – 0,9;

KH₂PO₄ – 0,5;

CaCO₃ – 1;

кукурудзяний екстракт – 1.

Відповідно до розрахунків процес біосинтезу складається з 4 стадій: вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 10 та 100л, а також виробничий біосинтез біомаси у ферментері 1м³. Зважаючи на це підібрано відповідні ферментери. Окрім цього опираючись на склад поживного середовища підберемо необхідні для його приготування реактори, збірники і т. д.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 1м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Підготовка посівного матеріалу відбувається у три

стадії (в колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 10 та 100 л). Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,5 л), для вирощування в інокуляторах і виробничого біосинтезу – безпосередньо у самих апаратах при рН 7.

Окрім цього, до складу входять пшеничні висівки та кукурудзяний екстракт. Оскільки у пшеничних висівках 65% складають вуглеводи, то необхідною є стадія їх попередньої обробки (суспендування з подальшим заварюванням). Далі заварені пшеничні висівки використовують на приготування композиції А.

5.1.4.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для культивування *Bacillus subtilis* 3, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації певних компонентів)(табл. 2.3.1):

Композиція А: пшеничні висівки та кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112°C, 0,05 МПа ,30 хв)

Композиція Б: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа)

Композиція В: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа)

Композиція Г: крейда осаджена(режим стерилізації: 131°C, 50 хв, 0,15 МПа)

Процес приготування композицій відбувається у необхідних для цього колбах. Пшеничні висівки, які входять до композиції А необхідно попередньо заварити, а солі магнію та калію готувати окремо.

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

5.1.4.2.1 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в ферментері об'ємом 10л

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: пшеничні висівки та кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112°C, 0,05 МПа ,30 хв)

Композиція Б: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа)

Композиція В: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа)

Композиція Г: крейда осаджена(режим стерилізації: 131°С, 50 хв, 0,15 МПа)

Процес приготування композицій відбувається у необхідних для цього колбах. Пшеничні висівки, які входять до композиції А необхідно попередньо заварити, а солі магнію та калію готувати окремо.

5.1.4.2.2 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в ферментері об'ємом 100л

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: пшеничні висівки та кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112°С, 0,05 МПа ,30 хв)

Композиція Б: KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа)

Композиція В: крейда осаджена(режим стерилізації: 131°С, 50 хв, 0,15 МПа)

Спочатку необхідно заварити пшеничні висівки(100об/хв при 80°С), тому що це сприяє желатинізації крохмалю, що міститься , а отже, і доступності цього субстрату для мікроорганізму [22,13]. Після цього додаємо розраховану кількість кукурудзяного екстракту і стерилізуємо разом, оскільки температура стерилізації однакова (112°С). Для приготування цієї композиції вирішено використовувати реактор-змішувач об'ємом 15л оснащений сорочкою та перемішувачим пристроєм. Подачу в ферментер вирішено здійснювати перильстатичним насосом.

Об'єднуємо фосфорні солі з солями магнію в одну композицію(Б) для економії витрат на виробництві. Щоб не утворився осад фосфату магнію, спочатку готують суміш у колбі, розчиняючи у невеликій кількості води при перемішуванні. Потім вносять у збірник та самопливом подають у стерильний ферментер об'ємом 100л доливають залишок води і при перемішуванні доводять рН до 4,5 розчином НСІ та стерилізують.

Крейду (композиція Г) стерилізуємо окремо від солей, оскільки вона нерозчинна у воді і потребує жорсткіші умови стерилізації. Враховуючи

невеликий об'єм композиції, стерилізація проводиться в автоклаві. Подаємо у ферментер самоплином.

5.1.4.3 Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Середовище ділять на такі композиції:

Композиція А: пшеничні висівки та кукурудзяний екстракт (режим стерилізації: 112°C, 0,05 МПа, 30 хв)

Композиція Б: K_2HPO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, 0,15 МПа)

Композиція В: крейда осаджена (режим стерилізації: 131°C, 50 хв, 0,15 МПа)

Композиція А готується аналогічно, заварюємо пшеничні висівки після чого додаємо розраховану кількість кукурудзяного екстракту. Для приготування використовуємо реактор-змішувач об'ємом 120л, подаємо у ферментер перильстатичним насосом.

Об'єднуємо фосфорні солі з солями магнію в одну композицію(Б) для економії витрат на виробництві. Щоб не утворився осад фосфату магнію, спочатку готують суміш у колбі, розчиняючи у невеликій кількості води при перемішуванні. Потім самопливом подають у стерильний ферментер доливають залишок води і доводять рН до 4,5 розчином HCl та стерилізують. Підкислення відбувається у ферментері, оскільки він оснащений датчиком рН, на відміну від збірника для якого цей датчик потрібно додатково купувати, що економічно не вигідно.

Композицію В готують у колбі після чого стерилізують її у автоклаві та подають самопливом у ферментер.

5.1.5 Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Оскільки в поживних середовищах для ферментерів об'ємом 100л та 1м³ ми об'єднали фосфорні солі з солями магнію, є необхідність використання розчинів для регуляції рН, а саме NaOH та HCl .

Для того, щоб визначити спосіб приготування даних розчинів (кислоти і лугу) і визначитися з необхідними для цього колбами чи збірниками, розрахуємо

кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на дві стадії виробництва (табл. 5.3). Дані, наведені у табл. 2.4, свідчать про те, що розчин HCl на відміну від NaOH готують у колбах меншого об'єму. Це пояснюється тим, що розчин лугу потрібно стерилізувати, а розчин кислоти – ні. Також на кожен літр композиції солей додають 2мл титрувального агента, тобто 69мл на об'єм 34,6л та 712мл на 356л.

Таблиця 5.3

**Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів
поживного середовища**

Об'єм середовища, л	Об'єм композиції солей, л	HCl (6%)		NaOH(6%)	
		Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
51 56	34,6	69	у колбі на 100мл	69	у колбі на 200 мл
520 570	356	712	у колбі на 1л	712	у збірнику на 2 л

Піногасник. До складу поживного середовища входить кукурудзяний екстракт, який при перемішуванні у ферментерах буде утворювати піну. Для зменшення рівня піни використовуємо механічний піногасник та датчик рівня піни. Використання механічного піногасника зменшить економічні витрати ніж при використанні органічного чи хімічного піногасника.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

5.2.1. Обґрунтування стадій виділення цільового продукту

Пробіотики, органічні препарати, що містять мікроорганізми корисні для сільського господарства з точки зору забезпечення стабільності мікрофлори тварин, яких вирощують, а також для кращого накопичення маси тварин. Окрім цього пробіотики також використовують і для людей.

Завданням виробництва пробіотиків являється максимальне накопичення життєздатних клітин, збереження їх життєздатності на всіх стадіях технологічного

процесу, приготування на їх основі готових форм препаратів із збереженням активності протягом гарантійного терміну придатності.

Препарат Ендоспорин відноситься саме до таких препаратів. Основу препарату складають живі клітини бактерій *Bacillus subtilis* 3. Це грампозитивні мікроорганізми, як мають вигляд незабарвленої прямої палички, розмірами приблизно 0,7мкм в товщину та 2-8мкм в довжину. Зазвичай даний препарат випускають у порошкоподібному, висушеному вигляді в флаконах чи ампулах, де окрім живих клітин входить стабілізатор, що складається з сахарози та желатину. Кількість живих клітин у одній упаковці має бути $4-5 \cdot 10^9$. Масова частка вологи у сухому концентраті не більше 5%. [3] Зважаючи на те, що даний препарат використовують для тварин, необхідності в його високій очистці немає.

5.2.2. Обґрунтування способу відділення клітинної біомаси з культуральної рідини

Після культивування *Bacillus subtilis* 3 культуральну рідину (0,51 м³) збирають у збірник об'ємом 750л.

Далі необхідно відділити біомасу *Bacillus subtilis* 3 з культуральної рідини та в кінці отримати біомасу. Для відділення бактеріальних клітин існує безліч методів, серед яких найчастіше використовують флотацію, фільтрацію, центрифугування. [23]

Флотація – це процес розділення малих твердих частинок в водній суспензії чи розчині, оснований на адсорбції частинок на границях розділу фаз у відповідності з їх поверхневою активністю. Схему флотатора показано на рис. 5.1

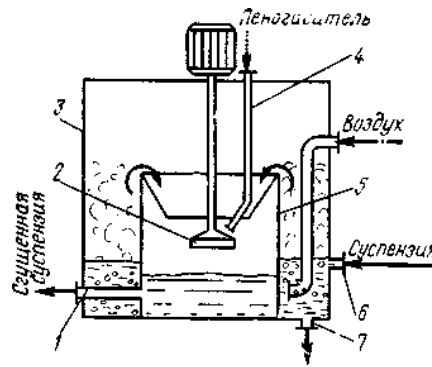


Рис. 5.1 Схема флотатора

1 – штуцер для виходу суспензії, що згущує; 2 – механічний піногасник; 3 – корпус; 4 – труба подачі води; 5 – внутрішній стакан; 6 – штуцер для введення дріжджової суспензії; 7 – штуцер для виведення освітленої рідини.

Процес здійснюють в спеціальних апаратах – флотаторах. Вони є циліндровою місткістю, в якій встановлений стакан меншого діаметру. Кільцевий простір між стінками корпусу і стакана розділений вертикальними перегородками на декілька секцій; перегородка між першою і останньою секціями суцільна (доходить до дна), а інші до дна не доходять. У нижній частині секцій, встановлені барботери, а у верхній частині центрального стакана – механічний дисковий піногасник. Дріжджова або бактеріальна суспензія подається в першу, найбільшу секцію флотатора і послідовно проходить через всі секції, перетікаючи під вертикальними перегородками. Через барботери подається повітря, і відбуваються інтенсивне піноутворення і флотація клітин. Піна, що утворюється, переливається через верхній край внутрішнього циліндра і потрапляє в зону дії пристрою для механічного піногасіння за необхідності, на його диск додатково подають воду або хімічний піногасник. Зібрана у внутрішньому стакані згущена суспензія дріжджів, відводиться через штуцер і поступає на сепаратор для подальшої концентрації. Звільнену від клітин рідину після попереднього очищення скидають в каналізацію. Втрати клітин на стадії флотації складають зазвичай 5 – 7%.

Найчастіше даний метод використовують для згущення клітин дріжджів і мікроміцетів. Головним недоліком даного методу є невисокий ступінь розділення біомаси. [23]

Оскільки *Bacillus subtilis* 3 – грампозитивні бактерії, що утворюють спори, даний метод недоцільно використовувати для відділення живих клітин.

Для відділення живих клітин також можна використовувати метод фільтрації. Це процес розділення неоднорідних систем за допомогою пористих перегородок, що пропускають дисперсійне середовище та затримують дисперсну тверду фазу.

Існує багато фільтруючих систем (барабанні, стрічкові, тарільчасті фільтри, фільтри – преси, мембранні фільтри). Усі вони базуються на однаковому принципі – затримці біомаси на пористій фільтруючій перегородці. [24]

До переваг барабанних вакуум фільтрів відноситься неперервність роботи та повна автоматизація роботи. Недоліки – неможливо змінити час фільтрування, складність, висока вартість, невелика поверхня фільтрування. [25]

На рисунку 5.2 наведено схему стрічкового фільтра. Перевагами є можливість осадження крупних частинок під дією сили тяжіння (завдяки чому фільтрація прискорюється), зручність промивки, можливість роботи з тонким шаром осаду. Однак, стрічкові фільтри мають малу поверхню фільтрації, малий коефіцієнт використання фільтруючої тканини, вимагають рівномірної подачі суспензії. [26]

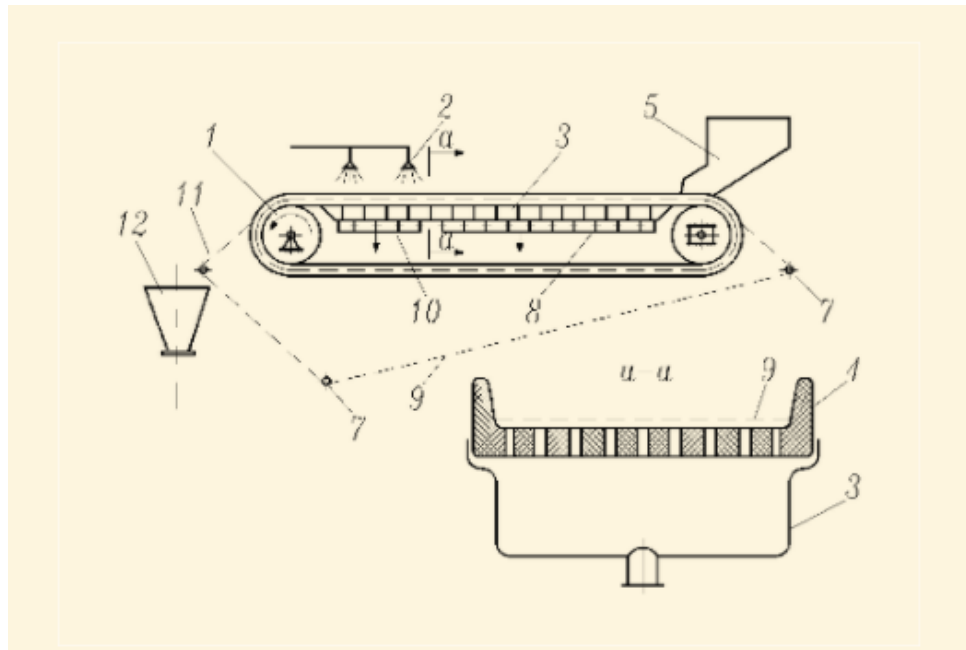


Рис. 5.2 Схема стрічкового фільтра

1 - приводний барабан; 2 - форсунки; 3 - вакуум-камери; 4 - нескінченна гумова стрічка; 5 - лоток для подачі суспензії; 6 - натяжний барабан; 7 - натяжні ролики; 8 - колектор фільтрату; 9 - фільтруюча тканина; 10 - колектор промиваючої рідини; 11 - валик для знімання осаду; 12-бункер для осаду.

1. Головними недоліками тарільчастих фільтрів є великі розміри, а також складність при знятті осаду та очистці граней. [27]

Рідше використовують рамні фільтр-преси періодичної дії з ручним вивантаженням осаду (рис. 5.3).

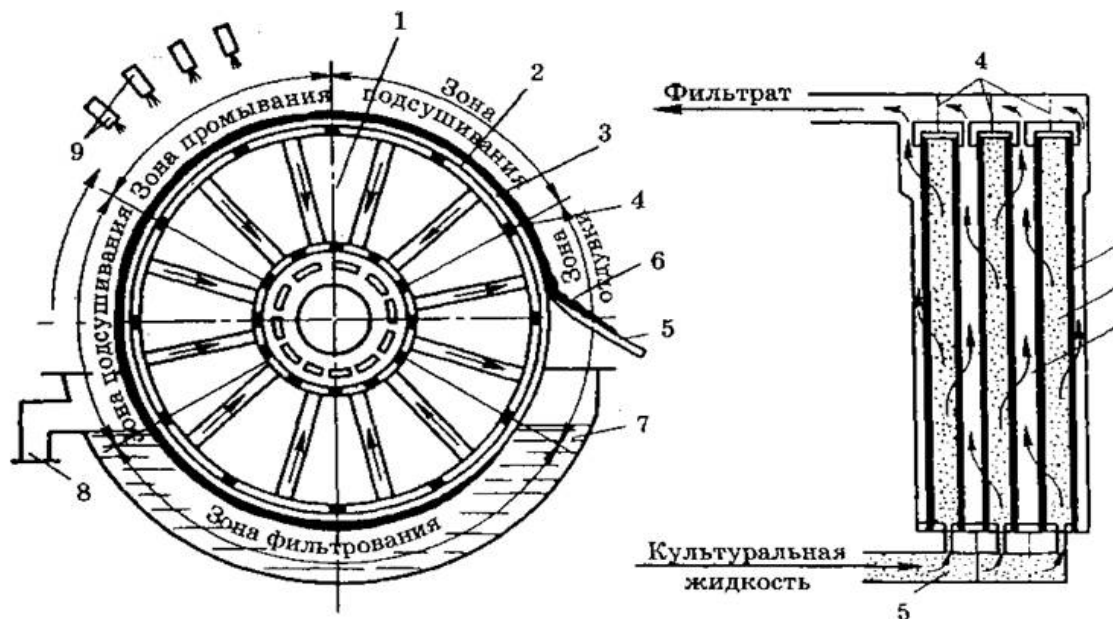


Рис. 5.3. Схема роботи барабанного фільтра та рамного фільтр – преса

З їх допомогою можна отримувати прозорі фільтрати, але ці фільтри працюють періодично без регенерації фільтруючої поверхні. Продуктивність фільтр-преса менша, ніж барабанного вакуум-фільтра.[28]

Оскільки, використовуючи даний фільтр є ймовірність пошкодити клітини, а операція вивантаження відбувається вручну, вирішуємо його не використовувати.

Оскільки клітини *Bacillus subtilis* 3 мають великі розміри, вони будуть забивати фільтри, окрім цього розглянувши та проаналізувавши усі переваги та недоліки різних фільтрів, вирішуємо не використовувати даний метод при відділенні біомаси.

Найбільш доцільним у технології виробництва є застосування методу центрифугування. Центрифугування – осадження зважених в рідині частинок із застосуванням відцентрової сили. Схема роботи представлена на рис. 5.4 [29]

Даний метод потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування. Тому він виправдовує себе, якщо: а) виникає необхідність максимального звільнення культуральної рідини від інших часток; б) суспензія фільтрується повільно; в) необхідно налагодити безперервний процес сепарації в умовах, коли фільтри розраховані тільки на періодичне дію. [30]

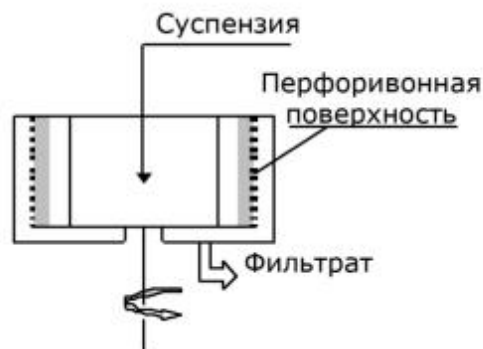


Рис. 5.4 Схема роботи центрифуги

Процес центрифугування здійснюють в відцентрових машинах, які представлені двома основними видами: центрифуги, рідинні відцентрові сепаратори. Розрізняють центрифуги періодичної та безперервної дії.

Порівняно з іншими способами розділення, при центрифугуванні вологість осаду менша. У порівнянні з фільтруванням відцентрове осадження розмежовує суспензії з жорсткою дрібнозернистою фазою, величиною 5-10мкм. Також швидкість розділення сумішей в центрифугах віща, ніж у фільтрах. [31]

Досить поширеними є осаджувальні центрифуги безперервної дії зі шнековим вивантаженням осаду типу ОГШ, що використовуються для поділу низько- і середньоконцентрованих суспензій.

Горизонтальне розташування осі циліндричного ротора з концентрично закріпленим всередині нього шнеком є головною конструктивною особливістю даних центрифуг. Він використовується в якості пристрою для вивантаження осаду.

Також дана особливість застосовується і в фільтруючих центрифугах типу ФГШ. Дані машини використовують для поділу висококцентрованих суспензій з крупнозернистою дисперсійною складовою.

Отриманий при цьому осад накопичується на поверхні сита і за необхідності може промиватись рідиною, що подають через промивний трубопровід. Щоб відділити використану промивну рідину в кожусі центрифуги є спеціальна камера. Осад після промивання транспортується до широкої частини ротора де скидається в камери збору осаду. [32]

Сепараторами називають центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном. Даний тип центрифуг досить поширений в біотехнологічній промисловості.

Сепаратори концентрують осад до вологості близько 60-90%. Сьогодні існують герметичні сепаратори, що дозволяють вести процес сепарування в автоматизованому режимі та при оптимально підібраних специфічних умов для конкретних культуральних рідин.

На сьогоднішній день є 3 види сепараторів: сепаратор-прояснювач, сепаратор-роздільник, сепаратор-згущувач. В залежності від об'єму поділяють за системою видалення осаду: періодичне, ручне, безперервне.

Вибираємо сепаратор с механічним вивантаженням осаду під дією відцентрових сил. Осад в такому сепараторі вивантажується періодично, після припинення подачі суспензії.

Сепарація має свої переваги у порівнянні з іншими способами, а саме:

- оброблення матеріалу відбувається з найменшими втратами активної речовини;
- більш висока інтенсивність процесу за рахунок більшої рушійної сили;
- процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше приміщень, легше здійснити мийку устаткування [33].

Для обробки суспензій або поділу емульсій, що містять 6-15% осаду вологістю 80-85% призначені соплові сепаратори безперервного вивантаження осаду. При цьому забезпечується безперервність вивантаження осаду і процесів сепарації. У цих сепараторах осад разом з частиною рідини компонента безперервно віддаляється через отвори сопел, розташованих на периферії, або через днище підстави ротора. На відмінну від інших центрифуг в сепараторі є пакет конічних тарілок, закріплених на валу ротора [34].

Такий сепаратор використовують для досягнення меншої кількості вологи. Наявність застійних зон між соплами, з яких осад не вимивається є недоліком цих сепараторів. Отже, унеможливиємо використання такого сепаратора.

Для відділення дрібних частинок від рідин для освітленої рідини використовують двофазний дисковий (тарілчастий) сепаратор. У порівнянні з центрифугою коефіцієнт поділу у нього набагато вище і коефіцієнт поділу досягає 12000G.(Для центрифуги близько 3000 G)

Вміст твердої речовини не повинен бути занадто високим при використанні дискового сепаратора для розділення матеріалу. Зазвичай це дрібні частинки з вмістом твердої речовини в межах 3%, що підходить для відділення біомаси *Bacillus subtilis* [35].

Істотним недоліком сепараторів є швидка забиваемість міжтарілчастого простору, тому потрібно періодично чистити. Звертаючи увагу на даний недолік та на значно вищий коефіцієнт поділу у сепаратора, обираємо тарілчастий сепаратор з механічним відвантаженням. Він забезпечить максимальне відділення біомаси клітин з найменшими втратами.

Вибір сепаратора. Із обґрунтування способів відділення біомаси, був обраний двофазний дисковий сепаратор (рис.5.5).

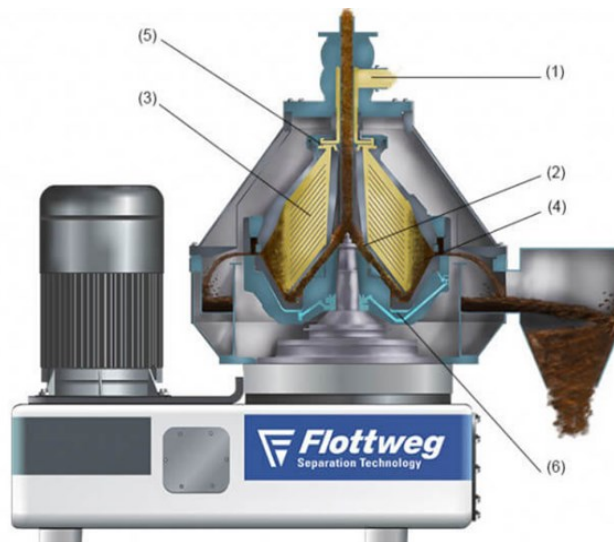


Рисунок 5.5 Тарілчастий сепаратор

Суміш, яку необхідно розділити, надходить через стаціонарну вхідну трубу (1) в розподільник обертового барабану (2). Там вона прискорюється до обертової швидкості барабана сепаратора. Важливо, щоб при розподілі суміші не виникали непотрібні зрізуючі зусилля, що руйнують малі частинки чи створюють емульсії. На зовнішній стороні основи розподільника передбачені прорізи або отвори, через які продукт, що відокремлюється надходить в простір з дисками. Поділ відбувається у внутрішньому просторі між дисками сепаратора (3). Тверда речовина під дією відцентрової сили виходить назовні і накопичується в камері твердої речовини (4). Рідкі фази проходять через простір між дисками і також під дією відцентрової сили виходять в протилежну сторону до осі барабана, а далі витікають через диск поділу фаз (грейфер) або водозлив (5). Зібрана тверда речовина виходить по окремій випускній лінії (вивантаження твердої фази). Гідравлічний розвантажувальний механізм відкриває барабан сепаратора у виступаючій частині корпусу центрифуги, де збираються тверді речовини. Після виходу твердої фази барабан сепаратора знову закривається. Це відбувається за кілька секунд. [35].

Обираємо сепаратор ALFA LAVAL BTAX 205 (виробник: BIORUS®, Росія).

BTAX 205 це повністю автоматична сепараційна установка. Вона забезпечує промисловий рівень продуктивності в пілотних масштабах і розроблена спеціально для відділення клітин з культуральної рідини.

Конструкція є виключно асептичною і підтримує CIP і SIP. Спеціально розроблена система ущільнень повністю виключає ризик контамінації продукту і навколишнього середовища. Охолоджуюча сорочка ротора забезпечує ефективний контроль температури, а також низький рівень шуму. Спеціальна система вивантаження твердої фази гарантує низькі втрати продукції і більш високу концентрацію твердих частинок. Промивні форсунки зрошують зовнішню частину ротора і внутрішню частину кожуха рами, забезпечуючи максимальну асептику.

Сепараційний установка складається з центрифуги типу ВТРХ 205SGD-34CDP з таймером і фіксованим обсягом вивантаження твердої фази. Центрифуга встановлена на міцній опорній рамі, яка включає в себе необхідні труби для робочих рідин. Вивантаження твердої фази здійснюється за допомогою насоса, що стерилізується паром. Вбудована електрична система включає в себе стартер, ПЛК та пневматичний пристрій.

Всі матеріали, що контактують з середовищем, виготовлені з високоякісної нержавіючої сталі. Прокладки виготовляються з Нітрилу, Вітону, або EPDM еластомірів на вимогу [36].

Таблиця 5.4.

Технічні характеристики сепаратора ALFA LAVAL ВТАХ 205:

Максимальна пропускна здатність	1,2 м ³ /год
Максимальне прискорення	12800g
Швидкість обертання ротора	9650 об/хв
Потужність двигуна	6,5 кВт
Рівень звукового тиску	<80 дБ(А)

5.2.3. Обґрунтування способу сушіння та сушарки

Висушування є одним з найбільш досконалих процесів стабілізації властивостей продуктів біологічного (рослинного, тваринного, мікробіологічного) походження і дозволяє зберігати дані продукти в звичайних умовах тривалий час. Крім того, зменшена маса дозволяє значно знизити транспортні витрати і витрати на тару.

Необхідно відзначити, що зневоднення - важкий технологічний процес, який часто є вирішальним етапом виробництва, що впливає на якість продукції, що випускається.[37]

Нам необхідно висушити біопрепарат на основі живих клітин *Bacillus subtilis*. І обов'язковою умовою є життєздатність клітин після сушіння. Потрібно підібрати оптимальні умови які б не спричинили руйнування клітин внаслідок сушіння. Тобто м'які умови сушіння. Тому наступним етапом роботи є визначення методу сушіння.

Конвективний метод висушування найчастіше здійснюють у камерних сушильних установках. Камерні сушарки є апаратами періодичної дії, що працюють при атмосферному тиску. Їх використовують в малотоннажних виробництвах при невисокій температурі сушіння. [37]

Серед головних недоліків даного методу є:

- 1) велика тривалість сушіння, тому що шар висушується нерухомо;
- 2) нерівномірність сушіння;
- 3) втрати тепла при завантаженні і вивантаженні камер;
- 4) важкі і негігієнічні умови обслуговування і контролю процесу;
- 5) порівняно велика витрата енергії через недостатню повноту використання тепла сушильного агента (особливо в кінцевий період сушки).[38]

Тому, проаналізувавши недоліки відмовляємось використовувати даний метод.

У сушарках з псевдозрідженим шаром процес сушіння протікає в шарі частинок, що знаходяться в підвішеному стані. За конструкції поділяють на однокамерні і багатокамерні. Через можливість чіткого дотримання правил GMP і поєднання декількох операцій в одному апараті їх досить часто використовують в медичній промисловості. Швидкість газу підбирається таким чином, щоб вона потрапила в діапазон між швидкістю початку псевдооживлення і швидкістю витання дрібних частинок. У псевдооживленому стані частки піддаються турбулентному стану. Тому в даному випадку існує висока ймовірність втрати продукту, також це вимагає вільного руху частинок. Зважаючи на це, липкі або клейкі матеріали не

будуть рухатися вільно, тому використовувати дане обладнання буде практично неможливо.[39]

На відміну від конвективного методу, при контактному способі, випаровування вологи відбувається за рахунок передачі тепла продукту через нагріту поверхню.[40]

Основною перевагою кондуктивної сушки є значна інтенсивність, обумовлена високим коефіцієнтом теплопередачі між гарячою поверхнею і матеріалом, завдяки чому він швидко зневоднюється. Цей спосіб сушіння відрізняється малими витратами енергії, порівняльної простотою і невисокою вартістю обладнання.[41]

Недоліки методу:

Продукт піддається механічній дії - його зрізають ножами, потім розмелюють в порошок, тому якість нижче.

При зіткненні продукту з нагрітими поверхнями відбувається необоротна теплова коагуляція білків; термічний розклад цукрів і зміна кольору.[42]

Зважаючи на те, що при механічній дії та при нагріві через поверхню будуть пошкоджуватись клітини, даний метод не використовуємо.

Для висушування можуть використовувати розпилюючі сушарки.

Сушка методом розпилення - це процес отримання висушеного продукту шляхом випаровування вологи з продукту.

Установка має камеру циліндричної форми. Розпилена в камері емульсія, суспензія або пастоподібні матеріали контактують з гарячим сушильним агентом (повітрям або топковим газом) і внаслідок чого зневоднюються.

Такий метод найбільш ефективний для отримання дрібнодисперсного сипучого порошку або гранул.[43]

Висушуваний продукт у вигляді розчину або суспензії подається в верхню частину апарату і розподіляється в об'ємі сушарки у вигляді тонких крапель. Краплі взаємодіють з гарячим сушильним агентом, інтенсивно втрачають вологу і опускаються на дно апарату під дією сили тяжіння. Швидкість подачі газу в цьому

випадку повинна бути менше (приблизно в 2 рази) швидкості витання дрібних частинок. Завдяки цьому вони будуть повільно опускатися вниз у процесі сушки. [44]

Серед переваг розпилюючих сушарок виділяються наступні:

1. Скорочення часу сушильного процесу, який проходить протягом п'ятнадцяти-тридцяти секунд. При цьому всі корисні речовини продукту зберігаються, і він не втрачає своїх первинних властивостей і вітамінів, які не окислюються.

2. Легкість в управлінні сушінням, яка полягає у виборі параметрів на панелі обладнання: розміру часток, залишкової вологості, ваги продукту, температури.

3. Готовність до використання виробленого продукту, який не вимагає додаткових засобів обробки, наприклад, подрібнення. Ступінь розчинності продукту дуже висока.

4. Відсутність необхідності у великій кількості робочого персоналу. Устаткування виконує об'ємний спектр робіт, не вимагаючи до себе великої уваги, так як процес сушіння повністю автоматизований.

5. Відсутність корозійних процесів на внутрішній поверхні сушильної камери в результаті повного висихання частинок продукту.

6. Наявність великого діапазону температур для сушки.

7. Можливість виробництва багатокомпонентного продукту шляхом попереднього змішування необхідних речовин в рідкому вигляді. Можна виробляти і одночасне розпилення різних речовин безпосередньо в камерній сушарці. [45]

Недоліками даної сушарки є:

1. Для висушування використовуються камерні сушарки з великими габаритними розмірами.

2. Висока вартість розпилювального обладнання для висушування продукту в рідкому стані.

3. Високий доля споживання електричної енергії, що обумовлюється тим, що без попереднього хорошого нагріву сушильної камери, знижується якість сушки, і продукт виходить зіпсованим.

4. Невелика маса кінцевого продукту, який набуває порошкоподібний вигляд, що змушує виробника шукати додаткові кошти до його «обваження», наприклад, брикети. [46]

Оскільки, вкористовуючи даний метод 75% клітин втрачають свою життєздатність, при контакті з сушильним агентом, температура якого більше 100 °С, така сушарка не підходить для данного продукту.

Досить часто використовують сублімаційні сушарки. Ліофілізація – метод висушування біологічних об'єктів і харчових продуктів в замороженому стані під вакуумом. При цьому вода видаляється із замороженого матеріалу шляхом випаровування льоду, минаючи рідку фазу. Ліофілізація широко застосовується в ветеринарії, медицині і харчовій промисловості для тривалого збереження бактерій, вірусів, грибів, діагностичних і лікувальних біопрепаратів, тканин, продуктів. При ліофілізації вода з об'єктів видаляється без порушення нативної структури білків; в препаратах різко сповільнюються або припиняються біохімічні реакції, в результаті чого вони стають більш стійкими до факторів зовнішнього впливу і зберігають первинні властивості протягом тривалого періоду зберігання.[47]

Головним недоліком є висока вартість обладнання. Переваги такого способу висушування - відсутність впливу високих температур на препарат, збереження дисперсної фази препарату, можливість використання летючих розчинників. [48]

Метод ліофілізації дозволяє отримувати сухі тканини, препарати, продукти без втрати їх структурної цілісності і біологічної активності.[49]

Для захисту білків від денатурації при ліофілізації їх поміщають в спеціальні середовища з різних хімічних речовин, таких як, наприклад, глюкоза, солі, гліцерин, органічні аніони. При ліофілізації більшість білків не денатурується і може довго зберігатися при помірному охолодженні (близько 0 ° С). Ліофілізовані тканини і препарати при зволоженні відновлюють свої первинні властивості.50 [50]

Ліофільна сушка трудомісткий процес: підготовка препарату до сушіння повинна бути ретельною, для повного висихання потрібно високий вакуум, сам процес досить тривалий і вимагає великих енерговитрат. Але зважаючи на те, що

даний пробіотик містить термолабільний мікроорганізм у своєму складі, а також на необхідність зберегти максимальну кількість живих клітин вирішуємо використовувати даний метод сушіння. Тому додатковою стадією є приготування захисного середовища, а також його змішування з відділеною вологою біомасою.

Вибір ліофільної сушарки.

Сублімаційне сушіння, також відоме як ліофілізація, в основному, використовується для видалення води з чутливих продуктів, не пошкоджуючи їх. Таким чином, вони можуть бути збережені довгий період, а згодом відновлені водою.

Продукт, який повинен бути висушений, заморожується при атмосферному тиску. Потім на початковому етапі сушіння (первинна сушка) відбувається видалення води (льоду) сублімацією; а на другому етапі (вторинна сушка) - вода (лід) видаляється десорбцією. Сублімаційне сушіння виконується в умовах вакууму.

Умови, при яких відбувається процес, визначають якість ліофілізованого продукту. Під час процесу сублімаційного сушіння необхідно враховувати наступні аспекти:

Заморожування: перетворення основного продукту шляхом відводу тепла для створення стану, придатного для сублімації. Швидкість заморозки, склад основного продукту, вміст вологи, в'язкість рідини і наявність речовин, що не кристалізується - всі ці фактори визначають форму і розмір кристалів льоду, що утворюються і впливають на подальший процес сублімації.

Точка замерзання чистої води - 0°C . Якщо присутні інші речовини, точка замерзання буде варіюватись і це необхідно враховувати при виборі найбільш відповідної технології заморожування.

Для фармацевтичної продукції використовуються два різних методи заморозки: заморозка в контакті з охолодженою поверхнею і динамічна заморозка / заморозка обертанням в охолоджуючій ванні.

Перший метод - це технологія статичної заморозки, в якій універсальна сублімаційна сушарка повинна володіти функціоналом регулювання інтенсивності заморозки, в залежності від конкретного продукту і контролю швидкості заморозки.

Другий метод використовується, якщо необхідно заморозити велику кількість рідкої продукції і висушити в колбах або великих пляшках. В результаті використання правильної технології заморозки буде отримано заморожений продукт, відповідний для сублимації, тобто однорідний і максимально тонкий для скорочення часу сушіння.

Окрім цього в подальшому необхідно контролювати температуру при якій відбуватиметься сушіння а також дотримання необхідного вакууму в сушарці.[51]

Зважаючи на все вище сказане, було обрано ліофільну сушарку LyoBeta 5PS, виробник «МикроБио» (Росія) (Рис.5.6.) з можливістю задавати індивідуальну програму сушіння в автоматичному режимі. Відображення всіх функцій кожної системи на дисплеї в кольорі і в реальному часі.[52] Також наведено технічні характеристики у таблиці 5.5



Рисунок 5.6. Ліофільна сушарка LyoBeta 5PS

Технічні характеристики ліофільної сушарки LyoBeta 5PS:

Характеристика	Одиниці	LyoBeta 5PS
Кількість полиць	шт.	5
Розміри полиць, (Ш x Д)	мм	338 x 450
Корисна площа полиць	м ²	0.75
Відстань між полицями	мм	54
Діапазон температур полиць	°С	-60 до +80
Місткість конденсатора	кг	30
Місткість конденсатора за 24 год	кг	18
Кінцева температура конденсатора	°С	-80
Споживана потужність	кВт	8
Електроживлення	В/Гц	230/І фаза/50
Поток вакуумного насоса	м ³ /год	9
Вага	кг	760
Розміри, Ш x В x Д	мм	1245x1974x818

5.2.4. Обґрунтування способу подрібнення

Оскільки, після процесу ліофільного висушування, препарат на піддонах знаходиться у вигляді пластин, з'являється необхідність його подрібнення для зручності використання. Також можливий такий момент як зробити розлив перепарату перед сушкою, що дозволило б виключити стадію подрібнення, але спричинить до втрати однорідності та часткової загибелі клітин, тому стадію подрібнення потрібно провести.

Всі машини, що використовують для подрібнення, умовно поділяються на дві групи: дробарки і млини. До перших відносяться апарати, що застосовуються для дроблення великих шматків, а до других – для отримання тонко подрібненого порошкоподібного матеріалу з малим розміром частинок.

За принципом дії дробарки поділяють на конусні, що руйнують матеріал між двома конічними поверхнями, одна з яких рухається ексцентрично по відношенню до іншої; валкові, розчавлює матеріал між двома валками, що обертаються назустріч

один одному; - ударної дії, в яких дроблення здійснюється в основному за рахунок удару матеріалу молотками. (рис. 5.7.)

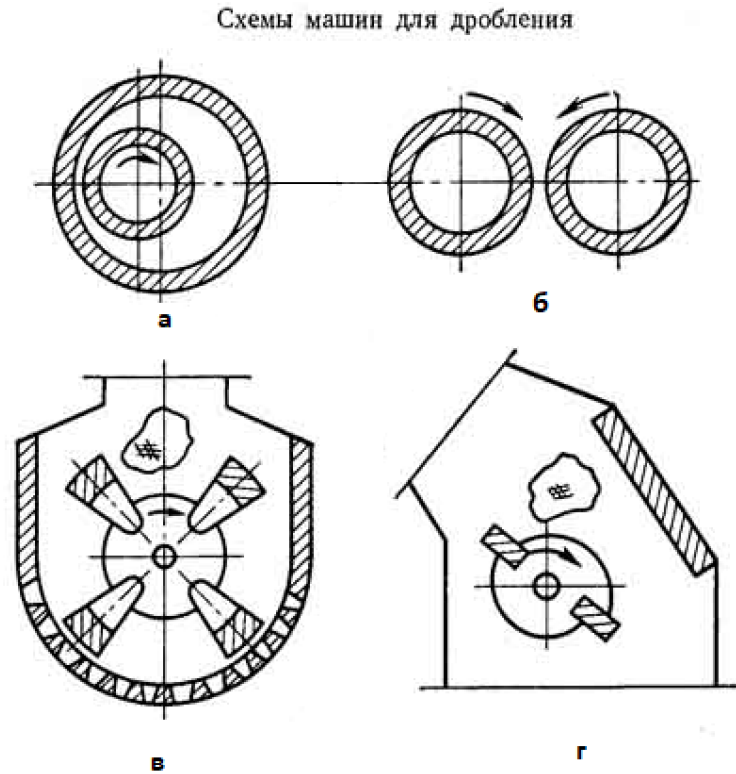


Рисунок. 5.7. Схема дробарок: а) конічні, б) валкові, в) молоткові ударної дії, г) роторні ударної дії

У свою чергу, за принципом дії млина поділяються на:

- барабанні, подрібнюють матеріал в обертовому або вібруючому барабані;
- ударні, подрібнюють матеріал ударами шарнірних або жорстко закріплених молотків;
- струменеві, що руйнують матеріал за рахунок тертя і зіткнення його частинок між собою і об стінки камери.(рис. 5.8) [53]

Схеми машин для помола

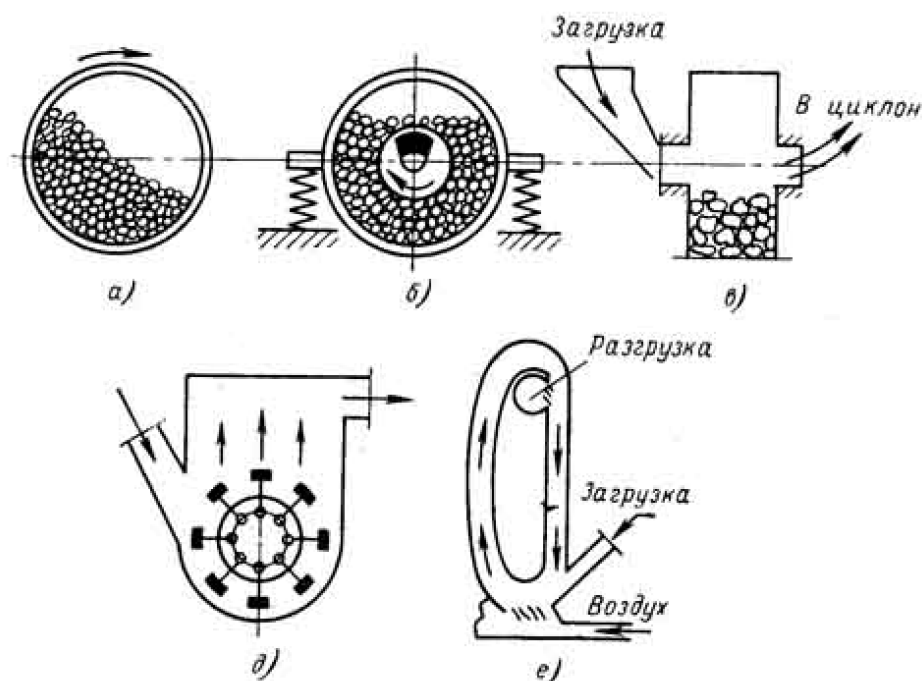


Рисунок. 5.8. Схема млинів: а), б), в) барабанні, д) ударні, е) струменеві

Оскільки, у готовому пробіотику має бути максимальна кількість живих клітин, необхідно обрати найменш згубний спосіб подріблення. Для цього порівнюємо дані машини.

Валкові дробарки призначені для середнього і дрібного подріблення м'яких матеріалів і матеріалів середньої міцності. Валковая дробарка працює наступним чином. Матеріал, який підлягає подрібленню, подається зверху, зтягується в зазор між обертовими назустріч один одному валками і подрібнюється за рахунок роздавлювання і часткового стирання.

Дані дробарки використовують для великої кількості речовин, яку необхідно подрібнити. Зважаючи на все вище сказане відмовляємось використовувати дані дробарки.

Це стосується також конусних дробарок, дробарок і млинів ударної дії, тому відмовляємось використовувати їх також.[54]

Досить поширеними є струйні мельниці. Завдяки особливостям принципу подрібнення продукт перемелюється тільки за рахунок зіткнення частинок між

собою. Підведення енергії для подрібнення відбувається за рахунок стисненого повітря.

Інтегрований динамічний повітряний класифікатор розміщений в одному корпусі з млином і може бути легко перебудований на необхідну тонину помелу з електронного блоку управління. Це дозволяє отримати будь-яку необхідну тонину помелу і гарантує відмінну відтворюваність якості.

Більш того, млин дозволяє подрібнювати термочутливі або легкоплавкі речовини, в базовій конфігурації в безперервному режимі.[55]

Тому, зважаючи на все вище сказане, обираємо струйну дробарку GMSM30.

Вибір дробарки. Із обґрунтування способу подрібнення було обрано струйну дробарку.

Залежно від конструктивних особливостей розрізняють наступні типи струменевих дробарок:

з вертикальною трубчастою камерою для надтонкого подрібнення матеріалів (середній розмір одержуваних часток менше 1 мкм) – даний тип нам не підходить, оскільки самі живі клітини маю розміри $2—5 \times 0,4-0,6$ мкм і при подрібненні вони будуть зруйновані;

млини з плоскою помольною камерою для надтонкого подрібнення матеріалів (середній розмір одержуваних часток менш 10 мкм) – не використовуємо через великі втрати живих клітин;

млини з протитечійною камерою для тонкого подрібнення матеріалів (середній розмір одержуваних часток менш 60 мкм) – обираємо даний тип дробарки через найменші втрати в процесі подрібнення.[56]

Зважаючи на сказане раніше, було обрано струйну дробарку GMSM30, Австрія. Потужністю 0,37 кВт. Продуктивністю 20кг/год із вбудованим ситом для просіювання[57]

5.2.5. Обґрунтування форми випуску препарату.

Оскільки пробіотичний препарат Ендоспорин можливо випускати у двох варіантах (у вигляді розчину чи у сухому ліофілізованому стані) необхідно обрати один із них.[58]

Для цього порівнюємо їх.

Переваги та недоліки рідких лікарських форм наведено у таблиці 5.4

Таблиця 5.4

Переваги та недоліки рідких лікарських форм

Рідкі лікарські форми	
Переваги	різноманітність складу та способу застосування
	зниження шкідливої дії деяких лікарських речовин
	маскування неприємного смаку та запаху
Недоліки	менш стабільні при зберіганні
	швидше піддаються мікробіологічній контамінації
	незручні при транспортуванні
	уступають по точності дозування іншим лікарським формам

Зважаючи на те, що препарати у вигляді порошку швидше піддаються мікробіологічній контамінації вирішуємо не використовувати рідку лікарську форму.

Далі розглянемо переваги та недоліки препаратів у вигляді порошку, що наведені у таблиці 5.5.

Переваги та недоліки порошкоподібної форми

Рідкі лікарські форми	
Переваги	простота в технології виготовлення
	зручність дозування
	зручність транспортування
	зручність зберігання
	універсальність складу
Недоліки	зміна властивостей речовини під дією навколишнього середовища
	, втрата кристалізаційної води
	зміна під дією вологи
	можлива подразнююча дія на слизову оболонку деяких компонентів
	неможливість приймати в несвідомому стані
	незручні та неприємні для прийому

Так як даний препарат використовують для тварин, вимоги до нього менш жорсткі у порівнянні з препаратами, які використовують для людей. Окрім цього нам не потрібно маскувати неприємний смак чи запах та до препарату не входять шкідливі речовини, щоб знижувати їх дію. Зважаючи на це та усі переваги порошкоподібних лікарських засобів переконуємось у доцільності виготовлення препарату Ендоспорин у вигляді порошку.

Після процесу культивування *Bacillus subtilis* 3 необхідно обрати схему виділення та очищення цільового продукту. Ендоспорин у сухій формі готують наступним чином: готову культуральну рідину відділяють від біомаси, отримують біомасу у вигляді пасти з вологістю 70-80% після чого змішують з стабілізатором та висушують. Після висушування подрібнюють утворені платини на підібраній дробарці та упаковують у обрану нами упаковку.

Отже, для виділення ендоспорину будемо застосовувати такі методи:

- 1) Відділення біомаси яка утворилася внаслідок культивування з культуральної рідини;
- 2) Висушування, для отримання готового продукту.
- 3) Подрібнення препарату після сушіння
- 4) Пакування продукту.

5.2.6. Обґрунтування кінцевої форми продукту

Ендоспорин в сухій формі являє собою активну культуру висушених клітин *Bacillus subtilis* в суміші з стабілізатором (сахароза, желатин). В 1 г сухого препарату повинно міститися не менше 400-500 млн життєздатних клітин. Біологічно активні речовини можуть повністю або частково втрачатись при висушуванні, проте життєздатні клітини швидко відновлюють здатність їх продукувати. Висушений та подрібнений препарат фасують в поліетиленові пакети по 0,2 кг, оскільки на фермах може бути одночасно від 200 і більше одиниць великої рогатої худоби, а доза для однієї 1гр розчинений у 50мл води (для 200 одиниць – 200г препарату розчиненого у 10л води) так як вони найбільш поширений пакувальний матеріал, а також дешевий порівняно з іншими. Пакети зберігають при температурі не вище +20 °С протягом 3-4 місяців. Тобто сухий Ендоспорин має більший термін придатності, унеможлиблюється зменшення життєздатності клітин, а пакети по 0,2 кг зручні у використанні та дозуванні.

5.2.7. Обґрунтування стадії пакування цільового продукту

Ендоспорин – висушені живі клітини бактерій разом з наповнювачем.

При виборі упаковки необхідно враховувати властивості самого цільового продукту та умови його зберігання. Необхідно обирати таку тару, яка захищала б цільовий продукт від пошкоджень, сприяла безпечному транспортуванню, надійності швів, стійкістю до температур та збереженню клітин. Після виробництва даний пробіотичний препарат відразу поступає на ферми, тому обирати дороговартісну упаковку не має сенсу.

За один цикл виробництва виготовляється приблизно 17 кг продукту, доречно обрати невеликі упаковки по 0,2 кг.

Класифікують тару наступним чином:

за матеріалом: картонні, полімерні, металеві, паперові, скляні, тканеві, комбіновані;

за формою: м'які, тверді, напівтверді;

за габаритами: мало-, велико- та середньогабаритні.

Також є одноразові, багаторазові, виробничі чи торгові.

Відмирання мікроорганізмів при зберіганні в сухому стані залежить, в основному, від трьох чинників: вологості біокомпоненту, температури зберігання і наявності кисню в упаковці.

Поліетиленова упаковка є найбільш дешевим варіантом і має наступну характеристику:

можливість використання при підвищених температурах без втрати експлуатаційних властивостей;

морозостійкі зі збереженням міцності;

стійкість до деформації, стискання, розривів;

повітрянепроникні і захист від вологи;

захист від УФ впливу;

інертність від хімічних речовин, захист від мікроорганізмів;

можливість нанесення стійких зображень. [59]

Доцільним буде використання поліетиленових пакетів, виготовлених з плівки високого тиску, одношайні, оскільки вони найбільш підходять для нашого виробництва, а також недорогі.

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення і очищення цільового продукту.

1.3.1 Обґрунтування стадії змішування з захисним середовищем.

Зважаючи на наявність стадії висушування, з'являється необхідність попереднього змішування відділеної біомаси з стабілізатором. Це необхідно нам,

оскільки готовий препарат являє собою певну кількість живих клітин, а стабілізатор діє як електролітний буфер і оберігає від швидкої дегідратації[60]

Протектори на основі гліцерину з використанням допоміжних речовин, зокрема сахарози, є найбільш вивченими захисними середовищами для бактерій. Як кріопротектор його застосовують в концентраціях 10-20%. Збільшення концентрації понад 30% призводить до зменшення кількості живих бактерій.[61]

Часто використовують захисне середовище з гліцерину та сахарози але воно не дає високий відсоток виживання клітин. Склад захисного середовища 5% маніт , 10% гліцерин дає кращий результат по виживанню клітин при висушуванні (близько 75%). Зважаючи на те, що маніт є діуретиком, використання даного складу захисного середовища недоцільне, оскільки може погано впливати на тварин.[62]

Також можна використовувати гліцерин, як захисне середовище але це буде дороговартісно. Окрім цього відсоток живих клітин в межах 50-55%, що є недостатньо високим показником.

Досить часто використовують захисне середовище до складу якого входить желатин та сахароза. Даний склад зумовлює високу кількість живих клітин після висушування.(виживає близько 70% живих клітин).[63]

Пропонується використовувати стабілізатор з желатином та сахарозою. Так як вони дозволяють ефективніше порівняно з іншими захистити клітини від руйнування[3]

5.4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

а. об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{кр} = 0,51 \text{ м}^3$; КП «Основи проектування»;

б. концентрація біомаси у КП $C_{БМ} = 5,9 \text{ г/л}$ ($5,9 \text{ кг/м}^3$) – АБС

с. втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 13% (прийнято для розрахунку ТЕО КП «Основи проектування»): початкова кількість цільового

продукту, яка поступає з КР складає $0,51\text{м}^3 \times 5,9\text{кг}/\text{м}^3 = 3,01$ кг; кінцева кількість (з урахуванням 15% втрат) має становити 2,6 кг.

Таблиця 5.5

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 15%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 3 Зберігання культуральної рідини	КР	0,51 м ³ (510 л)	-	0,51 м ³ (510 л)	Збірник КР 0,75 м ³
ТП 7. Відділення біомаси з культуральної рідини						
2	ТП 7.1 Сепарування культуральної рідини	Біомаса	3,1 кг (0,51×5,9) АСБ, з урахуванням 90% вологості 5,9 кг	0,115 кг (5%)	5,6 кг	Сепаратор продуктивністю 1,2 м ³ /год (розрахунок на 26хв роботи)
		Фугат	504,1 л (510-5,9)	-	504,1 л	-
ТП 8 Підготовка біомаси до сушіння						
3	ТП 8.1. Змішування біомаси з захисним середовищем	Біомасу змішують з захисним середовищем (1:3)	22,4 змішаної біомаси з захисним середовищем (5,6кг+16,8кг(6,72 кг сахарози+1,68кг желатину +8,4л питної води)	0,4 кг (1 %)	22кг	Реактор - змішувач об'ємом 30л

ТП 9. Сушіння біомаси						
4	ТП 9.1. Заморожування препарату	Біомаса з захисним середовищем	22кг	-	-	Ліофільна сушарка з площею полиць 0,6-1,2м ² , кількість полиць 11
	ТП 9.2. Сушіння у ліофільній сушарці	Вологий осад	22кг	-	-	
		Висушена біомаса з захисним середовищем (вологість 5%)	-	14,2 кг (90% вологи)	15 кг	Пересувна ємність об'ємом 20 л
ТП 10. Подріблення препарату						
5	ТП 10.1. Подріблення препарату у струйній дробарці	Висушена біомаса з захисним середовищем (вологість 5%)	15 кг сухого препарату	0,4кг (2%)	14,2 кг	Дробарка продуктивністю 20 кг/год
ТП 11. Змішування з наповнювачем						
6	ТП 11.1. Змішування біомаси з наповнювачем	Подрібнена та просіяна біомаса з захисним середовищем	51,2 препарату (14,2 кг+ наповнювач (желатин,саха роза) 37кг)	0,5кг (1%)	50,6кг	Збірник об'ємом 55 л
ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження						
7	ПМВ 12.1. Фасування та пакування продукту в	Подрібнений та просіяний препарат (вологість 5%)	50,6 кг	-	-	Фасувально- пакувальний апарат потужністю 100-

	пакети	Упакований у пакети (по 0,2 кг)	-	0,6 (1%)	50 кг	150 уп/год
--	--------	---------------------------------	---	----------	-------	------------

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у табл. 6.1.

Таблиця 6.1.

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр грубої очистки повітря панельний, фільтруючий матеріал: синтетичні волокна – поліестер. Продуктивність 1950 м3/год E= 80-90%[64]
К-3	Компресор	1	Компресор AIR 500 фірми «Tesla Weld», тиск 8 бар, продуктивність 500л/хв[65]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Водяний теплообмінник охолоджувач PGK 100-50-3-2,0 фірми «Systemair», продуктивністю 1152 м3/год[66]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний РВ 500.15.00 фірми «REMEZA», об'ємом 500 л та робочим тиском 16 атм.[67]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний теплообмінник-нагрівач VBR фірми «Systemair», продуктивністю 1200 м3/год[68]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр HEPA, фільтруючий матеріал: мікроскловолокно. Продуктивність 1880 м3/год. E=99,995%[69]
ФІ-8	Фільтр індивідуальної очистки	3	Фільтри індивідуальної очистки ULPA фірми «Alhstrom», фільтруючий матеріал – скловолокно. E=99,999 95%

НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.		Тимцясь А.А.			
Перевір.		Скряцька О.І.			
Реценз.					
Н. Контр.					
Затверд.		Пирог Т.П.			
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Аркушів
				88	135
			Кафедра БТМ		

ІН-9	Ферментер (інокулятор)	1	Інокулятор BIOSTAT® Cplus, матеріал нержавіюча сталь AISI 304, 316L, для вирощування інокулята оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискування, рН метром, механічним піногасником, манометром та термометром. Кількість обертів мішалки 180 об/хв. Робочим об'ємом 10л. Габаритні розміри, м (ДхШхВ) 1,9х1,02х0,75 [70]
Д-10	Ваговий дозатор	1	Дозатор виробництва НВП "Профпак" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,2% [71]
Р-11	Реактор-змішувач	1	Реактор об'ємом 15 л, фірми ООО "КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА" матеріал сталь AISI 316L, оснащений сорочкою та перемішувачим пристроєм. Загальна, швидкість перемішування 100об/хв,[72]
Н-12	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний Ragazzini PSF3 продуктивністю 0,054 м ³ /час, потужністю насосів 0,18 кВт.[73]
ФІ-13	Фільтр індивідуальної очистки	3	Фільтри індивідуальної очистки ULPA фірми "Alhstrom", фільтруючий матеріал – скловолокно. Е= 99,999 95%
ІН-14	Ферментер (інокулятор)	1	Інокулятор BIORUS-SJA, матеріал нержавіюча сталь AISI 316L, для вирощування інокулята оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискування, рН метром, механічним піногасником, манометром та термометром. Кількість обертів мішалки 180 об/хв. Робочим об'ємом 100л. Габаритні розміри, м (ДхШхВ) 1,3х0,7х0,6 [74]
Д-15	Ваговий дозатор	1	Дозатор виробництва НВП "Профпак" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,2%[71]
Р-16	Реактор-	1	Реактор об'ємом 120 л, фірми «Технолог», оснащений

	змішувач		сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальна, швидкість перемішування 100 об/хв, максимальна температура 140°C, габаритні розміри, м (ДхШхВ) 0,8x0,75x1,45 [75]
Н-17	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний 253D, продуктивністю бл/хв, потужністю насосів 0,14 кВт[76]
ФІ-18	Фільтр індивідуальної очистки	3	Фільтри індивідуальної очистки ULPA фірми "Alhstrom", фільтруючий матеріал – скловолокно. Е=99,999 95%
Ф-19	Ферментер	1	Ферментер BioFlo Pro фірми «New Brunswick Scientific» матеріал нержавіюча сталь 316 L, оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискування, рН метром, механічним піногасником, манометром та термометром. Кількість обертів мішалки 180 об/хв. Робочим об'ємом 1000л. Габаритні розміри, м (ДхШхВ) 1,5x1,38x2,18 [77]
Н-20	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий, виробник Leo, продуктивністю 50л/хв, потужністю насосів 0,18 кВт [78]
З-21	Збірник	1	Збірник об'ємом 0,75 м ³ , Габаритні розміри згідно ДСТУ. h= 438 мм, d=265,2 мм, Матеріал корпусу нержавіюча стал[79]:
Н-22	Насос	1	Насос відцентровий, виробник Leo, продуктивністю 200 л/хв потужністю насосів 1,5 кВт [80]
С-23	Сепаратор	1	Сепараційна установка ALFA LAVAL BTAX 205, виробник BIORUS®, матеріал нержавіюча сталь, швидкість 7000 об/хв, продуктивністю 1,2 м ³ /год. Габаритні розміри, м (ДхШхВ) 1,67x2,93 x1,97 [36]
Д-24	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор виробництва НВП "Профпак" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,2%[81]
Д-25	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор виробництва НВП "Профпак" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність

			зважування становить 0,2%[81]
P-26	Реактор – змішувач	1	Реактор - змішувач об'ємом 30л, фірми «ХімМікс», з нержавіючої сталі типу AISI 316, оснащений перемішувачем. Має герметичні вузли завантаження та вивантаження. . Габаритні розміри, м (ДхШхВ) 0,93х0,76х2,3 [82]
ЛС-27	Ліофільна сушарка	1	Пілотна ліофільна сушарка LyoBeta 5PS (Росія). Місткість 30кг. Матеріал корпусу нержавіюча хімічна сталь. Габаритні розміри, м (ДхШхВ) 0,818х1,245х1,974, [52]
ДР-28	Струйна дробарка	1	Струйна дробарка GMSM30, Австрія. Потужністю 0,37 кВт. Продуктивністю 20кг/год. Габаритні розміри (ДхШхВ) 1,45 х 0,8 х 1,4 [83]
Д-29	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор виробництва НВП "Профпак" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,2%[81]
Д-30	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор виробництва НВП "Профпак" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,2%[81]
3-31	Збірник для змішування біомаси з наповнювачем	1	Збірник об'ємом 55л [84]
ФПА-32	Фасувально-пакувальний апарат	1	Фасувально-пакувальний автомат «Стабіло», продуктивність 60 упак/хв, макс об'єм дози 1 кг, робочий тиск 0,6 МПа, потужність 1,5 кВт, дозатор в комплектації, габарити (ДхШхВ) 1,5х1х3. Виробник: «НПП Сервіс Пак» (Україна)[85]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу біомаси, необхідної для виготовлення пробіотика Ендоспорину, включає в себе: підготовка стерильного аераційного повітря, підготовку і стерилізацію поживних середовищ та технологічний процес, що включає в себе підготовка посівного матеріалу і біосинтез біомаси *B. subtilis* 3.

Технологічну схему біосинтезу *B. subtilis* 3 наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря.

Забір повітря здійснюється повітрязбірником (ПЗ-1) на висоті близько 10 м від рівня землі.

Повітрязбірник представляє собою металеву трубу діаметром 200 мм.

ДР 1.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток.

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром до 150, 300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення (Ф-2) використовують фільтр касетного типу. Як фільтруючий матеріал обираємо синтетичне волокно- поліестер. Ступінь очищення становить $E = 80-90 \%$.

ДР 1.3. Стиснення повітря.

Компресування повітря здійснюється у компресорі (К-3) при тиску 8 бар, при цьому повітря нагрівається до температури 120-200 °С.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Повітря охолоджують до температури 25°С в теплообміннику-охолоджувачі (Т-4). При охолодженні стисненого повітря виділяється 60 – 70 % вологи, яка відділяється краплевловлювачем.

ДР 1.5. Нагрівання повітря.

Для аерації поживного середовища під час культивування необхідно подавати повітря приблизної температури, що і культуральна рідина, тому повітря

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7.Опис технологічної схеми біосинтезу цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Тимцясь А.А.					92	135
Перевір.		Скроцька О.І.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		

нагрівають до температури 37 °С в теплообміннику-нагрівачі (Т-6).

Повітря подається в ресивер (Р-5) для акумуляції та стабілізації термодинамічних показників. В ресивері вирівнюється тиск та пульсації потоку повітря. Також ресивер має конденсато-відвідний канал.

ДР 1.6. Очищення на головному фільтрі

В якості фільтра для тонкого очищення (Ф-7) використовується фільтр типу НЕРА, фільтруючий матеріал якого представлений тканиною Петрянова.

Повітря, проходячи крізь фільтр, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить $E = 99,995\%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Для очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр які заповнені надтонкими мембранами. Фільтр виготовляються в вигляді фільтропатронів чи капсул.

Фільтр встановлюють перед кожним інокулятором, посівним апаратом і забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення $E = 99,999\ 95\%$

Стерилізація фільтра проводиться гострою парою разом з інокуляторами, посівним апаратом та ферментером без вилучення фільтруючих елементів з корпусу фільтра

ДР 2. Підготовка розчинів титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування (6%) розчину HCl

ДР 2.1.1 HCl для розчину солей (об'єм середовища 57л)

У колбу об'ємом 100мл наливаємо 69мл дистильованої H_2O та додаємо 4мл концентрованої HCl. Перемішуємо.

ДР 2.1.2 HCl для розчину солей (об'єм середовища 570л)

У колбу об'ємом 1л наливаємо 800мл дистильованої H_2O та додаємо 45мл концентрованої HCl. Перемішуємо.

ДР 2.2. Приготування (6%) розчину NaOH

ДР 2.2.1 NaOH для стабілізації рН розчину солей (об'єм середовища 57л)

У колбу об'ємом 200мл наливаємо 69мл дистильованої H_2O та додаємо 4,3г

попередньо зваженого на технічних вагах NaOH, перемішуємо. Стерилізуємо в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв.

ДР 2.2.2 NaOH для стабілізації рН розчину солей (об'єм середовища 570л)

У колбу об'ємом 2л наливаємо 712мл дистильованої H₂O та додаємо 43г попередньо зваженого на технічних вагах NaOH, перемішуємо. Стерилізуємо в автоклаві при 131°C упродовж 40 хв.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування в колбах на качалках.

Для вирощування культури необхідно приготувати 0.5 л поживного середовища. Джерело вуглецю в середовищі – висівки пшеничні. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 500 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Пшеничні висівки	40	20	А	150
Кукурудзяний екстракт	1	0,5(мл)		
Вода		150(мл)		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,25	Б	150
Вода		150 (мл)		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,9	0,45	В	150
Вода		150 (мл)		
CaCO ₃	1	0,5	Г	50

Вода		50(мл)		
------	--	--------	--	--

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

ДР 3.1.1.1. Попередня обробка пшеничних висівок

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 20 г пшеничних висівок. Наважку поміщують у колбу об'ємом 250мл і суспендують додаючи 150мл питної води, потім поступово нагрівають вміст до 80°C на водяній бані, витримуючи при такій температурі упродовж 25 хв заварюють.

ДР 3.1.1.2. Додавання дріжджового автолізу та стерилізація композиції А

За допомогою піпетки відбирають 0,5мл кукурудзяного екстракту та додають його у колбу з завареними пшеничними висівками та перемішують, закривають колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C (тиск – 0,05 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,25 г K_2HPO_4 . Наважку переносять в колбу об'ємом 300 мл, додають 150 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,45 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважку переносять в колбу на 300 мл, додають 150 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 0,5 г CaCO_3 . Наважку переносять в колбу на 100 мл, додають 50 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (тиск – 0,15 МПа) протягом 50 хв.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л

Для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л необхідно приготувати 5,6 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 0,5 л — загальний об'єм середовища, яке потрібно приготувати – 5,1 л. Необхідно враховувати дозу інокуляту, що буде вноситися в апарат (10 %), а також кількість конденсату, утворюваного під час стерилізації поживного середовища в ферментаторі (10 %). Тому для приготування 5,6л поживного середовища необхідно $5,6 \cdot 20\% = 1,12$ л води.

Вміст компонентів для приготування 5,6 л поживного середовища наведено у табл. 8.2.

Таблиця 7.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,6 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 5,6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції V, л
Пшеничні висівки	40	224	А	0,95
Кукурудзяний екстракт	1	5,6(мл)		
Вода		0,95(л)		
КН ₂ РО ₄	0,5	2,8	Б	1,74
Вода		1,74 (л)		
МgSO ₄ ·7Н ₂ О	0,9	5	В	1,74
Вода		1,74 (л)		
СаСО ₃	1	5,6	Г	0,05
Вода		0,05(л)		

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

ДР 3.2.1.1. Попередня обробка пшеничних висівків

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 224 г пшеничних висівків. Наважку поміщують у колбу об'ємом 2л і суспендують додаючи 0,95л питної води, потім поступово нагрівають вміст до 80°C на водяній бані, витримуючи при такій температурі упродовж 25 хв заварюють.

ДР 3.2.1.2. Додавання дріжджового автолізу та стерилізація композиції А

За допомогою піпетки відбирають 5,6мл кукурудзяного екстракту та додають його у колбу з завареними пшеничними висівками, перемішують, закривають колбу ватно – марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C (тиск – 0,05 МПа) упродовж 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 2,8 г K_2HPO_4 . Наважку переносять в колбу на 4л, додають 1,74 л дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважку переносять в колбу на 4л, додають 1,74 л дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація композиції Г.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 5,6 г CaCO_3 . Наважку переносять в колбу на 100мл, додають 0,05л дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °C (тиск – 0,15 МПа) протягом 50 хв.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 100 л.

Для культивування в інокуляторі об'ємом 100 л необхідно приготувати 56 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують

рідкий посівний матеріал об'ємом 5 л — загальний об'єм середовища, яке потрібно приготувати – 51 л. Необхідно враховувати дозу інокуляту, що буде вноситься в апарат (10 %), а також кількість конденсату, утворюваного під час стерилізації поживного середовища в ферментаторі (10 %). Тому для приготування 56л поживного середовища необхідно $56-20\%=44,8$ л води.

Вміст компонентів для приготування 56 л поживного середовища наведено у табл. 8.3.

Таблиця 7.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 56 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 56 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Пшеничні висівки	40	2,24	А	9,6
Кукурудзяний екстракт	1	0,056(л)		
Вода		9,6(л)		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,025	Б	34,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,9	0,05		
Вода		34,6 (л)		
CaCO ₃	1	0,056	В	0,6
Вода		0,6(л)		

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

ДР 3.3.1.1. Попередня обробка пшеничних висівків

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-10) у реактор об'ємом 15л (Р-11) зважують 2,24 кг пшеничних висівків і суспендують додаючи 9,6л холодної води, потім

поступово нагрівають вміст до 80 °С подачею пари у сорочку апарату і, витримуючи при такій температурі упродовж 25 хв проводять заварювання при 80 об/хв.

ДР 3.3.1.2. Додавання дріжджового автолізу та стерилізація композиції А

Використовуючи мірний стакан відбирають 56мл кукурудзяного екстракту та додають його у реактор з завареними пшеничними висівками, перемішують за допомогою мішалки. Стерилізують за допомогою гострої пари, подачу пари здійснюють через нижній спуск апарату. Температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 25г K_2HPO_4 та 50г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять в колбу на 2л, додають 1л дистильованої води, перемішують. Об'єм композиції вносять у збірник та самопливом подають у стерильний ферментер об'ємом 100л(I-14), додають 33,6л водопровідної води. Вмикають перемішуючий пристрій і при перемішуванні доводять 6%-м розчином HCl (від ДР 2.1.1.) рН середовища за показником датчика рН до 4,5. Стерилізація відбувається при температурі 131 °С (тиск – 0,15 МПа) гострою парою протягом 40 хв.

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 56г CaCO_3 . Наважки переносять в колбу на 1л, додають 600мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.4 Підготовка та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1м³

Для культивування в інокуляторі об'ємом 1м³ необхідно приготувати 570 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 50 л — загальний об'єм середовища, яке потрібно приготувати – 520 л. Необхідно враховувати дозу інокуляту, що буде вноситися в апарат (10 %), а також кількість конденсату, утворюваного під час стерилізації

поживного середовища в ферментаторі (10 %). Тому для приготування 570л поживного середовища необхідно $570 \cdot 20\% = 456$ л води.

Таблиця 7.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 570 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 570 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Пшеничні висівки	40	22,8	А	95
Кукурудзяний екстракт	1	0,57(л)		
Вода		95(л)		
КН ₂ РО ₄	0,5	0,285	Б	356
МgSO ₄ ·7Н ₂ О	0,9	0,513		
Вода		356(л)		
СаСО ₃	1	0,57	В	5
Вода		5(л)		

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А.

ДР 3.4.1.1. Попередня обробка пшеничних висівків

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-15) у реактор об'ємом 120л(Р-16) зважують 22,8 кг пшеничних висівків і суспендують додаючи 95л холодної води, потім поступово нагрівають вміст до 80°C подачею пари у сорочку апарату і, витримуючи при такій температурі упродовж 25хв проводять заварювання при 80об/хв.

ДР 3.4.1.2. Додавання дріжджового автолізу та стерилізація композиції А

Використовуючи мірний стакан відбирають 570мл кукурудзяного екстракту та додають його у реактор з завареними пшеничними висівками, перемішують за

допомогою мішалки. Стерилізують за допомогою гострої пари, температура стерилізації – 112 °С (тиск – 0,05 МПа), тривалість – 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 285г K_2HPO_4 та 513г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять в колбу на 5л, додають 2л дистильованої води, перемішують. Об'єм композиції вносять у збірник та самопливом подають у стерильний ферментер об'ємом 1м³ (Ф-19), додають 354л водопровідної води. Вмикають перемішуючий пристрій і при перемішуванні доводять 6%-м розчином HCl (від ДР 2.1.2.) рН середовища за показником датчика рН до 4,5. Стерилізація відбувається при температурі 131 °С (тиск – 0,15 МПа) гострою парою протягом 40 хв.

ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В.

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 570г CaCO_3 , переносять в колбу на 10л, додають 5л водопровідної води, перемішують. Після цього розливають по 2,5л у дві колби об'ємом 5л, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С (тиск – 0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування захисного середовища

ДР 4.1. Попередня обробка желатину.

Через об'ємно ваговий дозатор (Д-24) у реактор об'ємом 30л (Р-26) зважують 1,7 кг желатину та суспендують додаючи 8,4 л холодної питної води, потім поступово нагрівають вміст до 60-65°C подачею пари у сорочку апарату і, витримують при такій температурі у продовж 1-3 хвилин при 50 об/хв.

ДР 4.2. Змішування з сахарозою

Через об'ємно-ваговий дозатор (Д-25) у реактор об'ємом 30л(Р-26) зважують 6,72 кг сахарози та перемішують при 80 об/хв та температурі 60°C протягом 1-3хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП.5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Bacillus subtilis* 3 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (МПА – м'ясо–пептонний агар) у темряві, при температурі $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1...2 рази на місяць. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури з колекційної

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при $t = 27 \pm 1^\circ\text{C}$ (13 год) при рН 7.

ТП 5.3 Вирощування інокуляту на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування 13 год, температура 28°C .

ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у простерилізовану колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять 150 мл розчину композиції А (від ДР 3.1.1.2), 150 мл розчину композиції Б (від ДР 3.1.2), 150 мл розчину композиції В (від ДР 3.1.3), 50 мл розчину композиції Г (від ДР 3.1.4). Перемішують і розливають по 125 мл в 4 стерильні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus subtilis* 3, вирощену на сусло – агарі, вносять 10 мл дистильованої води, за допомогою петлі суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують суспензію з однієї пробірки.

Після вирощування бактерій у колбах на качалці (180 об/хв) упродовж 13 год при 28°C , посівний матеріал, в асептичних умовах, з колб переносять в інокулятор об'ємом 10л через засівний пристрій.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л.

В асептичних умовах у збірники вносять: перший - 0,95 л композиції А (від ДР 3.2.1.2.), другий – 1,74л стерильного розчину композиції Б (від ДР 3.2.2), третій – 1,74л композиції В (від ДР 3.2.3), четвертий-0,05л композиції Г (від ДР 3.2.4) і самопливом вони поступають в інокулятор об'ємом 10 л(ІН-9). Після цього подають посівний матеріал із засівної колби через засівний пристрій інокулятора (від ТП 5.4).

Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 28 °С, тривалість – 13 год. Швидкість перемішування становить 180 об/хв. Після закінчення культивування посівний матеріал перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 100 л(І-14).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В асептичних умовах в інокулятор об'ємом 100 л(ІН-14) ,з 34,6л стерильного розчину солей (ДР 3.3.2.), за допомогою перистальтичного насоса(Н-12) перекачують 9,6л композиції А (від ДР 3.3.1.2). Окремо 0,6 л стерильної композиції В (від ДР 3.3.3) вносять у збірник та самопливом подають у ферментер. Вмикають перемішувачий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.2.1.) рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Перекачують посівний матеріал із інокулятора через трубу перетискання (від ТП 5.5). Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 28 °С, тривалість – 13 год. Швидкість перемішування становить 180 об/хв. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в ферментер об'ємом 1 м³.(Ф-19)

ТП 6. Біосинтез

ТП 6. Виробниче культивування

У ферментер об'ємом 1 м³(Ф-19) з 380л стерильною сумішшю солей (ДР 3.4.2) з реактора за допомогою перистальтичного насоса(Н-17) перекачують 95 л композиції А (від ДР 3.4.1.2). У збірник заливають 5 л стерильної композиції В (від ДР 3.4.3) та самопливом вона поступає у ферментер. Вмикають перемішувачий пристрій і доводять 6%-м розчином NaOH (від ДР 2.2.2.) рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Перекачують посівний матеріал із інокулятора через

трубу перетискання(від ТП 5.6). Перемішуючим пристроєм слугує якірна мішалка, якою обладнаний ферментер. Параметри культивування: $t = 28^{\circ}\text{C}$, частота обертів перемішуючого пристрою 180 об/хв і постійна аерація впродовж 27 год. Параметри завершення процесу: концентрація біомаси 5,9 г/л.

ТП 7. Відділення біомаси з культуральної рідини

ТП 7.1. Сепарування культуральної рідини

У збірник культуральної рідини об'ємом $0,75\text{м}^3$ (З-21) перекачують насосом (Н-20) весь об'єм культуральної рідини з виробничого ферментера. Після цього відкривають кран подачі пари в рубашку та підігривають культуральну рідину до 29°C , для покращення швидкості сепарування, вмикають мішалку на 100 обертів та підтримують даний режим перемішування упродовж усього терміну зберігання 1-2 доби з урахуванням всіх технологічних моментів.

Для початку відкривають донний клапан збірника (З-21). Після цього вмикають сепаратор (С-23), та встановлюють швидкість обертання ротору: 7000 об/хв. Вмикають насос відцентровий (Н-22), подають певну кількість культуральної рідини зі збірника (З-21) у сепаратор, де розділяють на тверду фазу та супернатант. Після порційного сепарування по закінченню цієї кількості у збірнику (З-21) процес завершують. Біомасу відвантажують вручну на пересувний піддон та переміщують з ємності для збору біомаси.

ТП 8. Підготовка біомаси до сушіння.

ТП 8.1. Змішування біомаси з захисним середовищем

Відкривають вентиль з біомасою котра буде потрапляти до реактора об'ємом 30л (Р-26) подають відділену біомасу та змішують з захисним середовищем при 80 об/хв, протягом 3-5хв при температурі 25°C .

ТП 9. Сушіння біомаси

ТП 9.1 Заморожування препарату

Біомасу змішану з захисним середовищем у ручному режимі завантажують в ліофільну сушарку (ЛС-27) на полиці, максимальна заповненість ліофільної сушарки становить 23 кг. Після цього проводять заморожування при поступовому зниженні температури до -40°C протягом 10 годин.

ТП 9.2 Сушіння у ліофільній сушарці

Після заморожування препарат висушують при температурі +25-30 °С під вакуумом протягом 18 годин. Процес сушіння в ліофільній сушарці призводить до отримання продукту з відносною вологістю не більше 8-10 %.

ТП 10. Подрібнення препарату

ТП 10.1. Подрібнення і просіювання препарату у струйній дробарці

Висушений препарат з полиць ліофільної сушарки вручну подають на струйну дробарку (ДР-28) та перемелюють. Перемелений, висушений продукт просіюють за допомогою вбудованого сита з діаметром пор від 1см до 0,01 см, подають у збірник (З-31).

ТП 11. Змішування з наповнювачем

ТП 11.1. Змішування біомаси з наповнювачем

У збірник (З-31) через об'ємно ваговий дозатор (Д-29) подають 18,5кг желатину та через об'ємно ваговий дозатор (Д-30) додають 18,5 кг сахарози після чого додають перемелений висушений та просіяний продукт. Вмикають мішалку на 100 об/хв, перемішують.

ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 12.1. Пакування у поліетиленові пакети

У бункер пакувальної машини (ФПА-32) завантажують сухий продукт вручну через окремі ємності із збірника (З-31). Встановлюють на приймач пакувального матеріалу блок з поліетиленовими мішками. Встановлюють вагову кількість на автоматичному дозаторі пакувальної машини у значенні 0,2 кг, встановлюють продуктивність 100-150 уп/год. Запускають пакувальну машину. Завершують процес пакування після вичерпування кількості продукту.

ПМВ 12.2. Групове пакування

Пакети завантажують на палету з дерева та обмотують поліетиленовою плівкою. Додають документацію та сертифікати якості і відправляють на склад. Наносять номер партії та серії.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.

Контроль технологічного процесу ведеться відповідно до вимог GMP. У процесі виробництва контролюють відповідність сировини, допоміжних матеріалів, контролюють санітарний стан цехів та робочих місць, виконання регламентованих технологічних операцій і виконання технологічних режимів роботи. На підставі аналізу критичних точок виробництва складають карту постадійного контролю. До переліку контрольних точок входять лише ті, які безумовно, потрібні для забезпечення коректного ходу технологічного процесу і випуску якісної продукції, що відповідає вимогам. У таблиці 8.1. наведена карта постадійного контролю доферментаційних процесів виробництва лимонної кислоти

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НОУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Розроб.		Тимцясь А.А.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.І.					106	135
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Карта постадійного контролю біосинтезу біомаси *Bacillus subtilis*

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1, Кх 1.1.2 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.1.3 Миття з'ємних частин обладнання	З'ємні частини обладнання, мийний розчин, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції	$t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 1.1.4 Миття обладнання	Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	$t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 1 - 2\text{ год}$
Кт 1.1.5 Перевірка на герметичність Б	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	$P = 0,07\text{ МПа}$, $\tau = 30\text{ хв}$
Кт 1.1.6 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$P = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 1\text{ год}$

Продовження табл. 8.1

1	2	3	4	5
Кт 1.2 Грубе очищення повітря	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 = 80-90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P=0,35–0,5 МПа t=200–250 °C
Кт 1.4 Охолодження повітря	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25–30 °C
Кт 1.4.1 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W = 60-70 %
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 37 °C
Кт 1.6 Тонке очищення повітря	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	E = 98%
Кт 1.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,999 %

Продовження табл. 8.1

1	2	3	4	5
Кт 3.1.1.1 Попереднє приготування пшеничних висівків	Пшеничні висівки, температура, час, швидкість перемішування	Термометр технічний, годинник, тахометр,	Під час обробки пшеничних висівків	$\tau = 25$ хв, $t=80^{\circ}\text{C}$, $n=80$ об/хв
Кт, Км 3.1.1.2 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $t=112^{\circ}\text{C}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 50$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ Відсутність мікробіоти
Кт 3.2.1.1 Попереднє приготування пшеничних висівків	Пшеничні висівки, температура, час, швидкість перемішування	Термометр технічний, годинник, тахометр,	Під час обробки пшеничних висівків	$\tau = 25$ хв, $t=80^{\circ}\text{C}$, $n=80$ об/хв
Кт, Км 3.2.1.2 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $t=112^{\circ}\text{C}$ відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, тиск	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 50$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ Відсутність мікробіоти
Кт 3.3.1.1 Попереднє приготування пшеничних висівків	Пшеничні висівки, температура, час, швидкість перемішування	Термометр технічний, годинник, тахометр,	Під час обробки пшеничних висівків	$\tau = 25$ хв, $t=80^{\circ}\text{C}$, $n=80$ об/хв
Кт, Км 3.3.1.2 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $t=112^{\circ}\text{C}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність, рН	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ відсутність мікробіоти, рН 4,5
Кт, Км 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт 3.4.1.1 Попереднє приготування пшеничних висівок	Пшеничні висівки, температура, час, швидкість перемішування	Термометр технічний, годинник, тахометр,	Під час обробки пшеничних висівок	$\tau = 25$ хв, $t=80^{\circ}\text{C}$, $n=80$ об/хв
Кт, Км 3.4.1.2 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $t=112^{\circ}\text{C}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність, рН	Манометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ відсутність мікробіоти, рН 4,5
Кт, Км 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, тиск	Манометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t=131^{\circ}\text{C}$ Відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	$t = 28^{\circ}\text{C}$, $\tau = 13$ год, 180 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.5 Вирощування посівного матеріалу в	Посівний матеріал, тривалість вирощування,	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	$t = 28^{\circ}\text{C}$, $\tau = 13$ год, 180 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти

інокуляторі	температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури			
Кт, Км 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, рН, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	t = 28 °С, τ = 13 год, 180 об/хв, рН=7,0 Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6 Виробничий біосинтез	Культуральна рідина, КУО, температура, рН, тривалість, культивування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, рН-метр мікробіологічний контроль, непрямий метод визначення біомаси за оптичною густиною	Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год	t = 30 °С, τ = 48 год, рН=7,0 відсутність сторонньої мікробіоти, n=42,7 г/л

8.2. Мікробіологічний контроль

Упродовж культивування періодично (кожні 9 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, а також вмісту джерела вуглецю(крохмалю у пшеничних висівках) і азоту(амінний азот).

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами (МПА) і мікроскопуванням. Мікроскопіювання проводиться для контролю МАФAM та БГКП, тобто перевірки культуральної рідини на контамінацію. Нижче наведено фотографії *Bacillus subtilis* з під мікроскопом(рис.8.1).

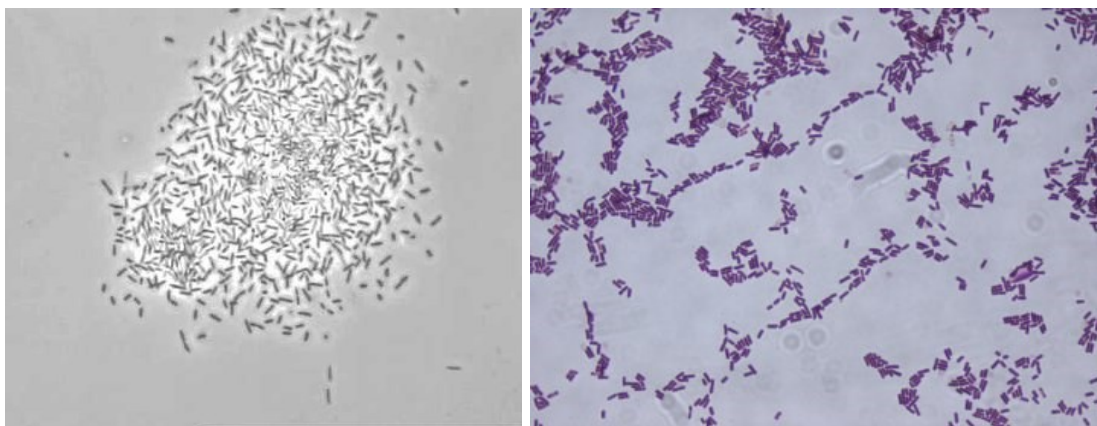


Рис.8.1. Bacillus subtilis під мікроскопом.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з суцільним агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для виявлення дріжджів і грибів.

Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, накривають накривним скельцем і розглядають з об'єктивом 40х, а також мікроскопують препарат з імерсійною системою.

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

фарби зливають. На мазок наносять розчин Люголя і через 1 хвилину його зливають. Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2 хв наносять фуксин Пфейффера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопіюють. За методом Грама грампозитивні мікроорганізми зафарбовуються в синьо-фіолетовий колір[86]

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.

8.3.1. Концентрація біомаси.

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії при 590 нм з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл стерильної води вносимо по 1 мл культуральної рідини.

Суміш збовтується, потім вимірюють оптичну гуστину, отримані дані перераховують за калібрувальним графіком в напівлогарифмічних координатах(залежність оптичної густини від концентрації біомаси)

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.[87,88]

8.3.2. Концентрація цільового продукту.

Визначення концентрації життєздатних клітин

Найважливішим завданням для отримання даного пробіотика є отримання необхідної кількості життєздатних клітин бактерій під-час культивування. Для визначення використовувався метод **Коха** (визначення кількості життєздатних мікроорганізмів).

Суть методу: посів досліджуваної проби культуральної рідини з ферментера чи інокулятора на щільне поживне середовище (МПА) в чашки Петрі і подальший підрахунок колоній, що вирости. Робота проводиться в три прийоми: приготування розведень, посів в чашки, підрахунок колоній, що вирости.[89]

8.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

8.3.3.1. Визначення концентрації вуглецю.

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Bacillus subtilis* з пшеничні висівки, до складу яких входять вуглеводи (крохмаль) [90].

Метод Бертрана – Шорля

Суть методу полягає у відновленні вуглеводами двоцвальної міді з розчину Фелінга до одновалентного оксиду міді. Виділений осад Cu_2O розчиняють в кислому розчині сульфату заліза (3+) і утворену при цьому еквівалентну кількість сульфату заліза (2+) титрують розчином перманганату калію.

Реактиви:

- розчин Фелінга I: 10 г кристалогідрату сульфату міді (II) і 0,04 г метиленовий синій розчиняють в дистильованій воді, доводять до 1 л в мірній колбі;
- розчин Фелінга II: 50 г сегнетової солі, 4 г жовтої кров'яної солі і 75 г гідроксиду натрію розчиняють послідовно в дистильованій воді в порцеляновій чашці, після охолодження доводять до 1 л.

Метод аналогічний методу Бертрана, але проба попередньо гідролізується на киплячій водянній бані при визначенні олігосахаридів - 10 хв, а при визначенні полісахаридів - 40 хв. Для гідролізу проба змішується з 2н HCl в співвідношенні 1:1. Потім проводять визначення вуглеводів методом Бертрана. Калібрувальна крива будується по сахарозі, яка також піддається попередньому гідролізу [91].

Техніка визначення: культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають, переносять у центрифужні пробірки та центрифугують при 1500 об/хв 15-20 хв, далі відцентрифуговану суспензію фільтрують через фільтрувальний папір, фільтрат відбирають у окрему ємність для аналізів.

У конічну колбу послідовно вносять по 20 мл розчинів Фелінга I і II, розчини змішують, потім доливають 20 мл фільтрату, отриманого з культуральної рідини. Вміст колби перемішують і нагрівають до кипіння, кип'ятять протягом 3 хв, рахуючи від появи перших бульбашок. Після цього колбу знімають з вогню,

ставлять в похилому положенні для кращого осідання випавшого закису міді і гарячу рідину зливають з осаду закису міді на скляний фільтр №4 або азбестовий фільтр, спеціально приготовлений в скляній трубці.

Розчин фільтрують у колбу Бунзена при невеликому розрідженні, уникаючи по можливості попадання осаду на фільтр. Після зливання всієї рідини на фільтр колбу і фільтр промивають кілька разів гарячою дистильованою водою до зникнення лужної реакції промивних вод.

Щоб уникнути переходу закису міді в окис при зіткненні з повітрям осад під час фільтрування повинен перебувати під водою. Після закінчення промивання осаду водою фільтрат з колби Бунзена виливають, а колбу ретельно промивають спочатку водопровідною водою, потім споліскуюють дистильованою водою. У конічну колбу до осаду закису міді доливають невеликими порціями 20-30 мл розчину сірчаноокислого заліза, кожен раз зливаючи розчин на фільтр.

У присутності сірчаноокислого заліза осад закису міді відновлює еквівалентну кількість сірчаноокислого окису заліза в сірчаноокислу закись заліза, кількість якої визначається титруванням розчином перманганату калію який окислює його в сульфат заліза (III).

Після розчинення закису міді колбу і фільтр промивають кілька разів дистильованою водою, поєднуючи всі промивні води в колбі Бунзена. Потім вміст колби титрують перманганатом до незникаючого слабо-рожевого забарвлення.

Кількість мілілітрів перманганату, який пішов на титрування, множать на титр, виражений по міді, і визначають число міліграмів міді. Потім за отриманим кількості міді знаходять відповідну кількість вуглеводу і розраховують його процентний вміст (x) за формулою:

$$X1 = GV \cdot 100g \cdot 20 \cdot 1000 \quad (5.1)$$

де G - кількість вуглеводу, знайдене по таблиці, мг;

V - об'єм мірної колби, мл;

g - навішування досліджуваної речовини, г;

20 - кількість випробуваного розчину, мл [92].

8.3.3.2. Визначення концентрації амінного азоту

Основним джерелом азоту в середовищі є кукурудзяний екстракт та пшеничні висівки.

Метод формольного титрування (метод Стевенса) базується на здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот. Аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу.

Хід визначення. Амінний азот визначається двома титруваннями - дослідним і контрольним.

Контрольне титрування: До 20 см³ дистильованої води додають 1 см³ формола, 5 крапель фенолфталеїну і 3 см³ 0,2 н. розчину соляної кислоти. Отриманий розчин титрують 0,2 н. розчином NaOH до появи яскраво-малинового фарбування (рН 9,1). Розраховують обсяг титранту, який пішов на контрольне титрування ($V_{\text{контроль}}$): $V_{\text{контроль}} = V_{\text{NaOH}} - V_{\text{HCl}}$, де V_{NaOH} - обсяг розчину лугу, що пішов на титрування; V_{HCl} - об'єм розчину соляної кислоти, взятий на аналіз.

Дослідне титрування. До 20 см³ випробуваного розчину додають 5 крапель фенолфталеїну, 1 см³ формола і титрують 0,2 н. розчином NaOH до яскраво-малинового забарвлення, однаковою з контрольною пробою. При цьому $V_{\text{досл}} = V_{\text{NaOH}}$.

Обчислення результатів:

$$m(\text{N}) = (V_{\text{досл}} - V_{\text{контроль}}) 2,8 \text{ мг / мл},$$

де $m(\text{N})$ - маса амінного азоту в пробі, взятої на аналіз; $V_{\text{досл}}$ - обсяг розчину лугу, що пішов на титрування; $V_{\text{контроль}}$ - об'єм розчину титранту, який пішов на контрольний дослід; 2,8 - титр розчину гідроксиду натрію по амінного азоту [93].

8.4. Показники якості готового продукту.

8.4.1. Визначення масової частки вологи.

Метод визначення води висушуванням.

Суть методу: висушування речовини до постійної маси і визначення зменшення маси речовини.

Техніка визначення:

Стаканчик для зважування висушують до постійної маси і зважують (результат зважування в грамах записують з точністю до четвертого десяткового знака). В стаканчик поміщають 5 г аналізованого препарату і зважують (результат зважування в грамах записують з точністю до четвертого десяткового знака). Стаканчик для зважування з аналізованим препаратом поміщають в термостат, трохи відкривши кришку і сушать при температурі 105-110°C до постійної маси. Перше зважування проводять після висушування протягом 2 год, наступні – через кожну годину, поки не буде досягнута постійна маса. Стаканчик з аналізованою речовиною із закритою кришкою перед кожним зважуванням поміщують для охолодження в ексікатор з прожареним хлоридом кальцію (або з іншим осушувачем) і витримують перед зважуванням кожного разу один й той же самий час, але не менше 30 хв.

Обробка результатів.

Масову частку води (X_1) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X_1 = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m}, \quad (4.1)$$

де m_1 - маса бюкси з препаратом до висушування, г;

m_2 - маса бюкси з препаратом після висушування, г;

m - маса навішування препарату, г.

За результат аналізу приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, відносно розходження між якими не перевищує розбіжність, що допускається, рівне 10%. [94]

8.4.2 Визначення числа життєздатних клітин *Bacillus subtilis*

Визначення кількості живих бактеріальних клітин в 10 г готового продукту дозі проводять методом серійних розведень в 0,9% розчині натрію хлориду з

наступним висівом на середовище Гаузе № 2. Визначення кількості живих бактерій проводять методом Коха.

Суть методу: посів досліджуваної проби на щільне поживне середовище (МПА) в чашки Петрі і подальший підрахунок колоній, що вирости. Робота проводиться в три прийоми: приготування розведень, посів в чашки, підрахунок колоній, що вирости.

Бактерії *B. subtilis* 3, що входять до складу препарату, при зростанні на середовищі Гаузе№2 утворюють великі сірувато-матові колонії, шорсткі з фестончатими краями, добре знімаються з агару.[95]

Склад середовища Гаузе №2:

30 мл бульйону Хоттінгера з вмістом амінного азоту 700 мг

5 г сухого пептону

5 г Натрію хлориду

10г Глюкози

30 г Агару мікробіологічного

До 1000 мл Води очищеної

Примітка.

Приготування бульйону Хоттінгера (вміст амінного азоту 700 мг).

Гідролізат Хоттінгера 24,0 г

Натрію хлорид 5,0 г

Вода очищена до 1000 мл

Стерилізація в автоклаві при температурі $(112 \pm 5)^\circ\text{C}$ протягом (20 ± 1) хв. Термін зберігання поживного середовища протягом 6 міс при температурі від 2 до 8°C в стерильних герметичних контейнерах (флаконах).[96]

8.4.3. Визначення числа клітин сторонніх мікроорганізмів

Зафарбовування за Ціль – Нільсеном - метод зафарбовування мікроорганізмів для виявлення кислотостійких мікобактерій (збудників туберкульозу, микобактериозов, лепри), актиноміцетів та інших кислотостійких мікроорганізмів. Кислотостійкість мікроорганізмів обумовлена наявністю в клітинах ліпідів, воску і оксикислот.

Методика:

1. Фіксований на полум'ї мазок суспендованого препарату у стерильній воді та роблять фіксовний препарат, після чого покривають смужкою фільтрувального паперу, наливають на неї карболовий розчин фуксину і підігрівують; при появі пару припиняють нагрівання і залишають фарбу на препараті ще на кілька хвилин (2-3 хвилини). Давши препарату охолонути, видаляють пінцетом папірець і обмивають мазок водою.

2. Для освітлення препарату використовують 5-10% водним розчином сірчаної кислоти протягом 3-5 секунд (до жовтуватого відтінку мазка). Замість сірчаної кислоти можна застосувати 5% розчин азотної або 3% розчин соляної кислоти.

3. Мазок ретельно промивають водою.

4. Споліскують 96 ° спиртом.

5. Знову промивають водою.

6. Дофарбовують протягом 3-5 хвилин леффлеровською метиленою синькою або водним розчином 1: 1000 малахітової зелені або метилової зелені.

7. Фарбу змивають водою і препарат висушують.

Мікроскопічна картина: туберкульозні палички - рубіново червоні, інші, за винятком збудника паратуберкульозу, кислото - і спиртостійких сапрофітів, - сині. Зазначеним методом досягається одночасне випробування бацил на кислото - і спиртостійкість.[97]

У мазках, приготовлених з зразків препарату і забарвлених за Цілем-Нільсеном, повинні бути присутніми вегетативні клітини синього кольору і рожеві спори.

Визначення відсутності сторонніх мікроорганізмів і грибів проводять відповідно до Загальної Фармакопейної Статті «Мікробіологічна чистота» методом посіву штрихом.[96]

Метод посіву штрихом

Чашку Петрі з агаризованим поживним середовищем ділять на 4 - 5 секторів.

Посів з вихідного розведення випробуваного зразка починають в першому секторі, ретельно втираючи суспензію петлею в агар. Потім цією ж петлею продовжують посіви в другому і наступних секторах. В останніх секторах повинні рости ізольовані колонії.[98]

8.4.4. Визначення зовнішнього вигляду і кольору

Зовнішній вигляд і колір визначають візуально по кожній одиниці фасування в момент відбору точкової проби. 5 г досліджуваного препарату поміщають на гладку чисту поверхню аркуша білого паперу і візуально визначають зовнішній вигляд і колір, переміщуючи при природному світлі. (порошок сірувато білого кольору)

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ЕНДОСПОРИНУ

Загальна схема сушіння пробіотика Ендоспорину зображена на рисунку 9.1.

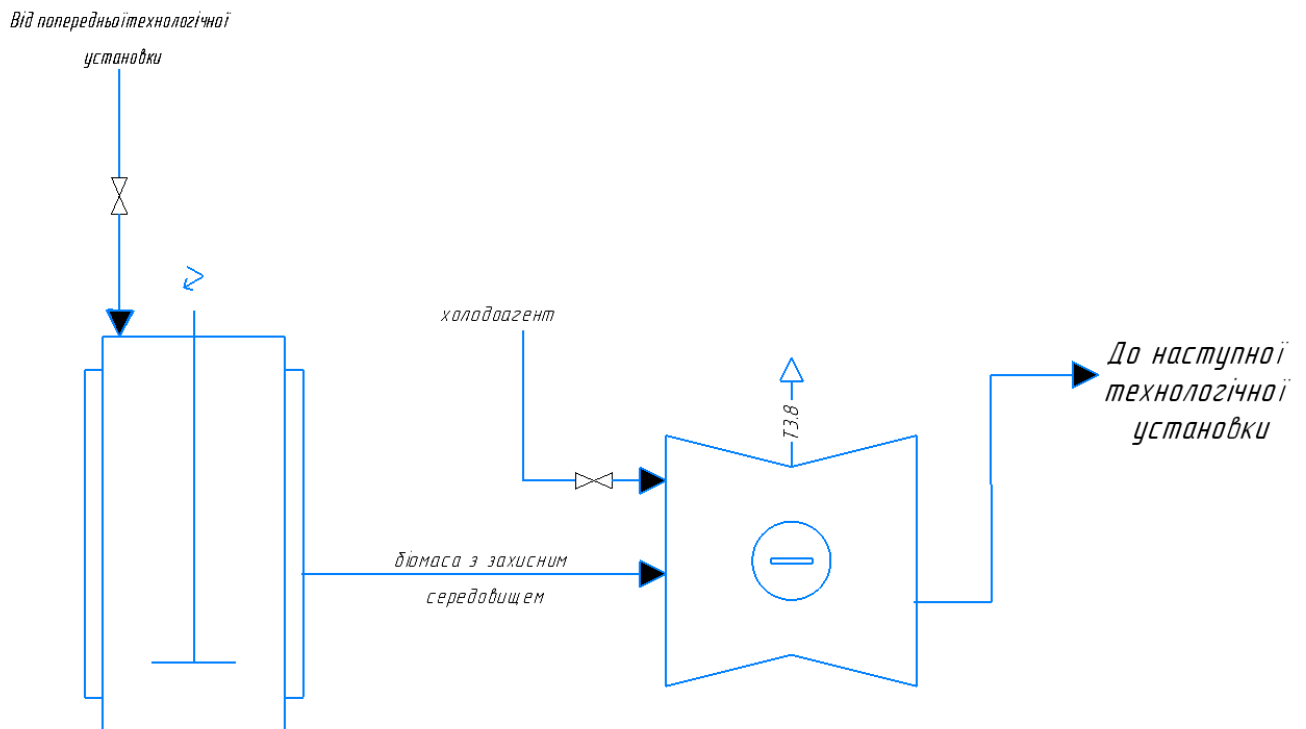


Рис. 9.1. Машинно-апаратна схема етапу сушіння ендоспорин

Біомаса *Bacillus subtilis* після попередніх етапів подається у реактор змішувач, де змішується з захисним середовищем. У реакторі – змішувачі контролюємо рівень суміші, кількість обертів мішалки за хвилину та температуру суміші до етапу сушіння. Далі у ручному режимі біомасу змішану з захисним середовищем завантажують в ліофільну сушарку на полиці. Після цього проводять заморожування та сушіння. На етапі заморожування контролюється температура процесу. (шляхом подачі холодоагента) На етапі сушіння контролюється температура процесу (шляхом подачі теплого повітря), тиск (вакуум) в апараті та кінцева вологість продукту.

Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати рівень рідини у реакторі-змішувачі з сигналізацією досягнення

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимцяє А.А.			РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва Ендоспорину	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.І.					122	135
Реценз.						121		
Консульт.		Клименко О.М.				Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

верхнього припустимого рівня і управління клапаном подачі (1в). У схемі буде використаний тільки один електрод, який встановлюється в точці яка відповідає верхньому припустимому рівню. Сигналізація про досягнення верхнього рівня передбачається на АРМі оператора-технолога.

У другому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати температуру суміші при змішування перед подачею його у наступні технологічні апарати, яка має регламентоване значення 36⁰С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання температури передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок вмикання чи вимикання подачі води у рубашку апарату (2в).

У третьому контурі здійснюється контроль та регулювання перемішування компонентів за допомогою мішалки, яка приводиться в дію мотором (М1). Частота обертів мотора мішалки регулюється виконавчим механізмом (2а), регламентоване значення 80 об/хв Спостереження за зміною частоти обертів здійснюється на АРМі оператора-технолога зі збереженням цих змін у архіві. Сигналізація про відхилення, пуск та зупинка мотора передбачається також на АРМі оператора-технолога. Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB1).

У четвертому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати температуру заморожування(регламентоване значення поступове зниження до-40⁰С) та після даного процесу температуру нагрівання препарату, яка має регламентоване значення 30⁰С. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання температури заморожування передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок вмикання чи вимикання подачі холодоагенту (4в). Для регулювання температури сушіння передбачається її стабілізація на заданому значенні за рахунок вмикання чи вимикання нагрівача пристрою.

У п'ятому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати тиск у ліофільній сушарці. Реалізовано це за допомогою

перетворювача тиску Сапфір 22ДВ з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 5а).

У шостому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати вологість продукту, щоб знати коли закінчити процес. Вологість кінцевого продукту має регламентоване значення 5%. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві.

Таблиця 9.1.

Завдання на розробку системи автоматизації

№ з. п.	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Реактор – змішувач	Рівень рідини в апараті	70%±3%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
2	Реактор – змішувач	Температура середовища в реакторі	36±3°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вмикання/вимикання нагрівача пристрою
3	Реактор - змішувач	Обертів мішалки за хвилину	80 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	АРМ оператора
4	Ліофільна сушарка	Температура заморожування	-40°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вмикання/вимикання подачі холодоагенту
		Температура сушіння	30°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вмикання/вимикання

						нагрівачого пристрою
5	Ліофільна сушарка	Тиск (вакуум) в апараті	136 Па	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
6	Ліофільна сушарка	Вологість пробіотика після процесу сушіння	5%	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

Специфікація засобів автоматизації

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1а	Рівень	В агрегаті	Контактний датчик рівня, з вихідним сигналом по напрузі	SITRN S L Pointek CLS 200	ДП «Сименс Україна» м.Київ
2а	Частота обертів за хвилину	По місцю	Частотний перетворювач для двигунів середньої потужності. Потужність 0.75кВт 1-ф/220 В, номінальний струм 4,2 В	VFD00 7EL21 A	Delta Electronics (Тайвань)
3а	Температура	В агрегаті	Датчик термоперетворювач опору діапазон (-40 ...+180)°С, з уніф. вих. сигнал 4...20 мА	ТСМ- 100	ООО "ФІРМА КОНТРАГЕН Т, Україна
5а	Тиск	В агрегаті	Безконтактний перетворювач тиску. Межа вимірювання 1,5 МПа, вих. Сигнал 4-20мА, клас точності 0,25	Сапфі р 22ДВ	«Авітех»
2б 3б	Температура Рівень	На щиті	Електропневмоперетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
2в 3в	Температура Рівень	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20...100 кПа, крутячий момент – 5...30 нм/бар, кут повороту – 90°	KUP	Kobold
4а	Вологість	По місцю	Ємнісний датчик відносної вологості, діапазон вимірювань 0...100%, клас точності 2, показник інерції 2хв	ДВ УТ- 02-НІН	ПАО „Тера”, Україна

КМ1	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В	3RT2015 -1AP01	SIEMENS
SA1	Перемикач	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB3210 -2DA11	SIEMENS
SB1 SB2	Перемикач	На щиті	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

Отже, в результаті автоматизації даної ділянки по виробництву ендоспорину передбачено скорочення кількості витрат ресурсів, серед яких сировина та електроенергія, а також підвищення якості цільового продукту, що супроводжується поліпшенням умов праці задіяного персоналу. Такі фактори сприятливо вплинуть на економічний аспект виробництва.

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

Технологія одержання біомаси *Bacillus subtilis* 3, як основи Ендоспорину включає доферментаційні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація розчинів для титрування, приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу та ферментаційні технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, біосинтез) та післяферментаційні технологічні процеси (центрифугування, змішування з захисним середовищем, розлив у стерильні флакони, заморожування, висушування у сублимаційній сушарці, закривання флаконів в стерильних умовах).

1) Санітарна підготовка виробництва. Даний етап включає щоденне і генеральне прибирання приміщення із застосуванням миючих засобів «Дівосан Форте» і «Біопагdez». Після обробки відпрацьований мийний розчин надходить до каналізації. Миття резервуарів обладнання здійснюють за допомогою СІР-мийки із застосуванням засобу «EcoChlor Wash». Після обробки промивна вода надходить до каналізації, а відпрацьований розчин «EcoChlor Wash» повторно використовується для обробки у СІР-мийці. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії невеликих об'ємів рідких відходів.*

2) Приготування і стерилізація розчинів для титрування. Етап передбачає підготовку 6% розчину гідроксиду натрію і 6% розчину хлоридної кислоти. Розчини подаються для регуляції рівня рН до 7,0 під час отримання посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 100л і виробничого біосинтезу в ферментері 1м³. Рідкі відходи на даному етапі виробництва можуть утворюватися лише у випадку невідповідності титрувальних розчинів нормативним показникам і рівню асептики. Так, *відходи титрувальних агентів не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.*

					НУХТ БТЕК 04.02.08 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Тимцясь А.А.			РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.І.					129	135
Реценз.						12		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

3) Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу. На даному етапі існує можливість виявлення невідповідності сировини заявленим нормам із наступним її відбракуванням. Тверді відходи даних етапів представлено пакувальними матеріалами від сировини для приготування поживного середовища. Передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

4) Підготовка посівного матеріалу. Етап передбачає отримання і масштабування посівного матеріалу в інокуляторах. Зважаючи на те, посівний матеріал використовується для засіву ферментера і, як наслідок, виробничого біосинтезу, відходи від посівного матеріалу не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.

Варто зауважити, що культура-продуцент *B. subtilis* належить до аеробів, під час культивування необхідно забезпечити достатній рівень аерації поживного середовища. Відповідно, у процесі культивування виникає великий об'єм відпрацьованого повітря. Оскільки продуцент належить до спороутворювальних бактерій, відпрацьоване повітря на виході з інокулятора буде містити аерозоль бактеріальних спор. Так, передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

5) Виробничий біосинтез. Даний етап передбачає отримання біомаси *B. subtilis* 3, як основи препарату «Ендоспорин». Оскільки культуральна рідина з біомасою далі надходить до збірника для виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. Відпрацьоване повітря на виході з виробничого ферментера містить аерозоль бактеріальних спор. Передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

6) Центрифугування в сепараторі. Даний етап передбачає центрифугування культуральної рідини з біомасою в сепараторі при 7000об/хв 10хв для їх розділення.. Отриману біомасу відправляють на наступний етап виділення продукту. Відходом даного етапу є відділена культуральна рідина. Так, передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії великих об'ємів рідких відходів.*

7)Змішування із захисним середовищем. До одержаної біомаси додають захисне середовище (сахарозу, желатин). Тверді відходи даних етапів представлено пакувальними матеріалами від сировини для захисного середовища. Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів.

8)Розлив на піддони ліофільної сушарки. Після змішування з захисним середовищем, розливають у піддони сублимаційної сушарки та заморожують. Даний етап не передбачає утворення рідких відходів.

9)Висушування у сублимаційній сушарці. Даний етап передбачає виділення залишкової вологи із Ендоспорину шляхом сушіння у сублимаційній сушарці за темп. 25-30 °С, тривалість сушіння 18 ± 1 годин. Масова частка вологи у сухому конц. Не більше 5%. Процес супроводжується виділенням газу-носія—відпрацьованого повітря, який містить аерозоль механічних часток. Передбачаємо, що *даний етап є місцем емісії газоподібних відходів.*

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

10.2.1.1. Розрахунок об'ємів відходів.

Для щоденного прибирання готують 1% розчин «Дівосан Форте», тому за один цикл виробництва (38,2 год \approx 1,5 доби) витрачається 7,2 л робочого розчину, який після відпрацювання зливається в каналізацію. За весь цикл виробництва проводять одне генеральне прибирання 3% розчином «Біопагdez». Річний об'єм відходів – 22 л. Миття обладнання здійснюють 1,5% розчином «EcoChlor Wash», об'єм відходів за один цикл – 184 л. Усі мийні засоби є безпечними для навколишнього середовища і мають клас безпеки – IV.

За один цикл виробництва ендоспорину отримують $0,51 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Беручи до уваги, що у культуральній рідині концентрація біомаси становить 5,9 г/л, приблизний об'єм відцентрифугованої біомаси за один цикл складає: $510 \times 5,9 = 3009 \text{ г} = 3 \text{ кг}$. Виходячи з цього кількість відцентрифугованої культуральної рідини становить $510 - 3 = 507 \text{ л}$.

Оскільки до складу відходів входять спори, частки ПС, та інші речовини, що виділяють клітини при їх культивуванні, приймаємо клас безпеки даних рідких відходів – III. Узагальнена характеристика рідких відходів наведена у табл. 10.2.

10.2.1.2. Заходи для зменшення об'ємів рідких відходів.

Для зменшення об'єму відпрацьованого миючого розчину «EcoChlor Wash» пропонуємо використовувати СІР-мийку, яка дає можливість повторно використовувати мийний розчин після його фільтрування. Об'єм рідких відходів при центрифугуванні не можливо значно зменшити, оскільки нам необхідно повністю відділити біомасу від культуральної рідини.

Табл. 10.1

Характеристика рідких відходів у виробництві ендоспорину

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (л)	Клас небезпеки
1% розчин «Дівосан Форте»	Надоцтова кислота, перекис водню, оцтова кислота, танГідроксидифосфосфонову кислоту та воду демінералізовану	7,2	IV
3% розчин «Біопагdez»	2-пропанол, хлоргексидину біглюконат, перекис водню	22	IV
1,5% розчин «EcoChlor Wash»	гіпохлорит натрію в перерахунку на активний хлор, сода каустична	184	IV
Відцентрифугована культуральна рідина	Спори, ПАР, залишки складових поживного середовища (пшеничні висівки, кукурудзяний екстракт, крейда, солі)	507	III
	Усього:	5 906	

10.2.1.3. Утилізація рідких відходів.

Біохімічне очищення стічних вод виробництва здійснюють в мембранному біореакторі(МБР). Проте, зважаючи на наявність у складі стічних вод

ізопропілового спирту, для його кращого вилучення рекомендують додатково застосовувати поліфункціональні каталізatori окиснення. Внесення в реакційну суміш, яка складається із стічних вод і активного мулу, гетерогенних металокомплексних каталізаторів. Гетерогенні металокомплексні каталізatori, внесені в реакційну суміш стічних вод і активного мулу, окиснюють забруднювачі за рахунок здатності до оборотного зв'язування кисню за допомогою координованих іонів перехідних металів. У свою чергу, мікроорганізми активного мулу іммобілізуються на каталізаторі, проте не знижують його каталітичну здатність, а навпаки підвищують її. Прикладом такого каталізатору є діоксид титану, який не розчиняється у воді і легко може бути видалений у відстійниках[99].

Процес очищення рідких відходів здійснюється за наступною схемою. Спершу відбувається вилучення твердих і завислих часток на решітках і пісковловлювачах з подальшою механічною очисткою вод у первинних відстійниках. Після цього стічна вода надходить до аеротенку в який надходить каталітичний окиснювач і циркулюючий активний мул, а також стиснене повітря. Далі реакційна суміш надходить до вторинного відстійника, де вона звільняється від суспензії активного мулу. Після цього вода надходить до реактора змішування, куди надходить хлор для знезараження води. Знезаражена вода надходить у контактний резервуар, звідки може випускатися у водойми, або повторно використовуватись для технічних цілей.

Узагальнений процес утилізації рідких відходів наведено на рис. 10.1

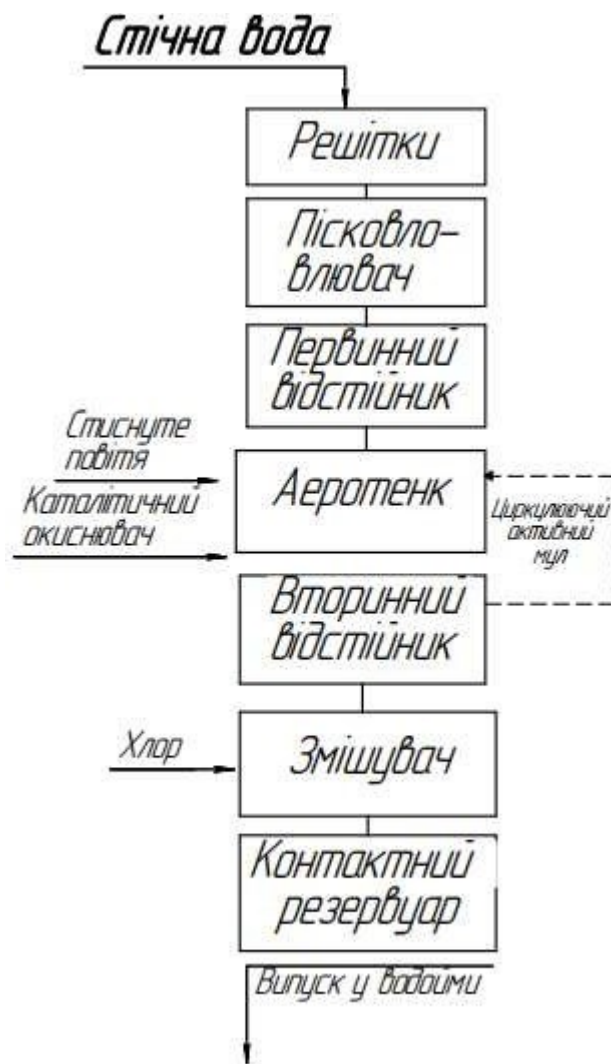


Рис. 10.1. Утилізація рідких відходів

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.

10.2.2.1. Розрахунок об'ємів відходів.

Тверді відходи етапу санітарної підготовки виробництва і підготовки поживних середовищ представлені пакувальною тарою для мийних засобів і компонентів поживного середовища. Тара для мийних засобів виготовлена із поліетилену високої щільності, який піддається вторинній переробці. Деякі компоненти поживного середовища поставляються в упаковці з полівініл хлориду, який важко піддається вторинній переробці і тому його заборонено утилізувати разом з іншими видами пластику.

Характеристика твердих відходів у виробництві ендоспориноу

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва (кг)	Клас небезпеки
Пластикова тара для мийних засобів	PEHD-2 – поліетилен високої щільності	0,3	IV
Упаковка для компонентів поживного середовища	HDPE-2 – поліетилен високої щільності, PVC-3 – полівініл хлорид	0,3	IV
	Усього:	0,6	

10.2.2.2. Утилізація твердих відходів.

Зважаючи на невеликі обсяги твердих відходів на даному виробництві, необхідності зменшення їхніх обсягів немає.

Для утилізації тари від миючих засобів і компонентів поживного середовища їх попередньо сортують і відправляють до пунктів прийому вторсировини.

10.2.3. Система знешкодження газоподібних викидів.**10.2.3.1. Розрахунок об'ємів відходів.**

Газоподібні відходи утворюються на етапі отримання посівного матеріалу, виробничого біосинтезу, сушіння препарату. У складі газоподібних відходів наявний вуглекислий газ і аерозоль бактеріальних спор.

Тривалість процесу отримання посівного матеріалу складає 26 год, а виробничого біосинтезу – 27 год. Для аерації середовища використовують стерильне повітря зі швидкістю аерації – 1 л/хв. У виробничому приміщенні встановлюють 3 ферментаційні апарати. Таким чином, приблизний об'єм відпрацьованого повітря буде становити: $2 \times (60 \times 26) + 1 \times (60 \times 27) = 4\,740$ л (4,74 м³).

Для розрахунку об'єму відпрацьованого повітря під час процесу сушіння приймаємо, що ліофільна сушарка має продуктивність $G = 50$ кг/хв зі витратою

сушильного агента – 0,4 л/с. Тривалість сушіння 30 кг Ендоспорину складе 156 хв. Так, розрахунковий об’єм сушильного агента і відповідно об’єм відпрацьованого повітря становить: $156 \times (0,4 \times 60) = 3\,744$ л (3,7 м³).

Оскільки наш препарат представляє собою ліофілізовану біомасу живих клітин, то газоподібні відходи матимуть клас небезпеки – IV.

10.2.3.2. Заходи для зменшення об’ємів газоповітряних відходів.

Для зменшення об’ємів газоповітряних відходів, що містить вуглекислий газ та інші складові (спори, частки ПС і т. п.), пропонується спочатку профільтрувати його використовуючи фільтри грубою та тонкої очистки. Після цього його можна використовувати в якості субстрату при вирощуванні деяких мікроорганізмів або водоростей. Для зменшення обсягів газоподібних відходів при процесі сушіння передбачають використання сушарок з економною витратою сушильних агентів.

Табл. 10.3.

Характеристика газоподібних відходів у виробництві Ендоспорину

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об’єм відходів на 1 цикл виробництва, м ³	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Вуглекислий газ, аерозоль бактеріальних спор, та ПС	22,3	IV
Відпрацьоване повітря після сушіння	Аерозоль механічних часток від сухого Ендоспорину	3,7	III
	Усього:	26,0	

10.2.3.3. Утилізація газоповітряних відходів.

Утилізацію газоповітряних відходів можна здійснювати фізико-хімічним методом. Відпрацьоване повітря за допомогою циркуляційного насоса надходить до трьохсекційної абсорбційної камери. У якості рідкого сорбенту у камері використовують водний розчин перекису водню або хлораміну. Даний етап є першим ступенем очищення повітря від аерозолі спор. Для другого ступеня

очищення відпрацьованого повітря для повної стерилізації після абсорберу встановлюють камеру УФ-опромінювання[100].

Після 2-ступеневої обробки відпрацьоване повітря можна надалі використовувати у біотехнологічних цілях або випускати у навколишнє середовище. Узагальнений процес очищення газоповітряних відходів наведено на рис. 2.3.

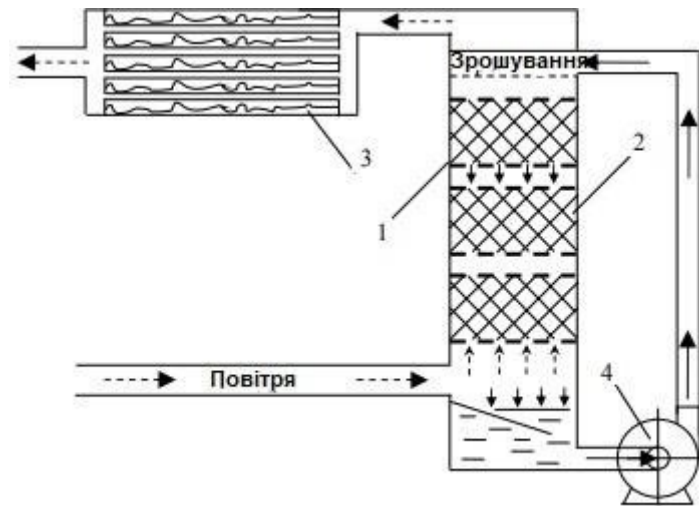


Рис. 10.2. Схема очищення відпрацьованого повітря
1 – абсорбер, 2 – насадкові секції, 3 – камера УФ-опромінювання,
4 – циркуляційний насос

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kalinichenko S.V., Babych E.M., Ryzhkova T.A., Maslii I.G., The modern state of development and application of probiotics, prebiotics and synbiotics. *Annals of Mechnikov Institute*. 2013, 3: 5-12.
2. Пробиотики: актуальность и механизмы [Электронный ресурс] Режим доступа: https://sdexpert.ru/news/project/probiotiki-aktualnost-i-mekhanizmy_1/
3. Патент України на винахід №1723117. Біопрепарат «Ендоспорин» для лікування і профілактики ендометритів тварин / Смирнов В.В., Кудрявцев В. О., Осадча А.І., Калиновський Г.М., Сафронова Л. А., Резник С. Р. Опубл. 11.10.1999, Бюл. № 6.
4. Скрыпник И.Н., Маслова А.С. Современные спорообразующие пробиотики в клинической практике. *Современная гастроэнтерология*. 2009, 3(47): 81-90
5. Сафронова Л.А., Подгорский В.С. Биологическая активность пробиотических штаммов бацилл — основы препарата эндоспорина: допов. НАН України, 2015, №6, С. 138-146.
6. Перелік імунобіологічних препаратів, що зареєстровані в Україні [Електронний ресурс]. – 10.04.2019 – Режим доступу до ресурсу: <http://consumer.gov.ua/ContentPages/Reestri/38/>
7. Мікробні препарати для тваринництва Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [Електронний ресурс] Режим доступу до ресурсу: <http://www.imv.kiev.ua/index.php/uk/products/agrarian/agrariananimal>
8. Дроздова Е.А., Берестова А.В. Микробная биотехнология производства антибиотических и пробиотических препаратов. Материалы Всероссийской научно-методической конференции. (Оренбург, ОГУ, 03-05 февраля 2016г.) С. 1106-1110
9. Оразова Н.Ш., Маметова А.З. Изучение состава питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* для получения кормовой пробиотической добавки. Материалы VIII Международной студенческой научной

- конференции «Студенческий научный форум 2016» (Шымкент, ЮКГУ им. М. Ауезова, 15 лютого–31 березня 2016 р.) С. 23–27.
10. Царенко И.Ю., Рой А.О., Курдиш И.К. Оптимізація живильного середовища для культивування *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. *Мікробіологічний журнал*. 2011, 73(2), С. 13-19
 11. Сираева З.Ю., Захарова Н. Г., Ильинская О. Н. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида бацизулин. *Естественные науки*. 2010, 152(4): 169-178.
 12. Пивная дробина состав [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://veles.agrobiz.net/goods/pivnaya-drobina-sostav-166054>
 13. Егоров Н.С. Промышленная микробиология. – Москва: Высшая школа, 1989. – 677с.
 14. Глубинное культивирование [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://studizba.com/lectures/2-biologicheskie-discipliny/137-osnovy-tehnologii-processy-i-apparaty-biotehnologicheskikh-proizvodstv/1890-6-glubinnoe-kultivirovanie.html>
 15. Основные типы механических перемешивающих устройств. Конструкция мешалок. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://talnah.su/osnovnye_tipy_meshalok
 16. Свистунов А. И. Классификация способов ферментации и ферментеров. Россия: НГИЭИ, 2013, с. 109-114
 17. Оборудование. BIORUS® - Все для масштабируемой биотехнологии. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://biorus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus®/promyishlennyye-fermenteryi.html>

18. Промышленные ферментеры. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyye-fermenteryi.html>
19. Перемешивание в ферментерах. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://chem21.info/info/1030833/>
20. Differences in Cold Adaptation of *Bacillus subtilis* under Anaerobic and Aerobic Conditions [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://jb.asm.org/content/192/16/4164>
21. К.А. Калунянц, Л.И. Голгер, В.Е. Балашов Оборудование микробиологических производств.- Москва, Агропромиздат, 1987. ст. 106-131
22. Pat. 2246536 RU. Enzymatically hydrolyzed wheat bran with glucoamylase, proteolytic and xylanase activity and method for their preparing by solid-phase fermentation of wheat bran using *Aspergillus niger* / Labej P. Z., Bare Zhan-Ljuk A. G., Djoshiron F.L. Publ. 20.02.2005, bull.5
23. Г.Г. Гончаренко, А.В. Крук, Е.М. Степанова_ Основы биотехнологии. Гомель, 2008
24. Тарельчатые и карусельные вакуум-фильтры [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.chem21.info/info/1859633/>
25. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.belstu.by/Portals/0/userfiles/72/LK/LK-1-13-2.pdf>
26. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://macp.web.tstu.ru/03/03_012_06.html
27. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://oil-filters.ru/dish_filters/
28. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://medic.studio/biotehnologii/filtratsiya-70591.html>

29. Методы разделения гетерогенных систем. Центрифугирование [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://proiz-teh.ru/centrifugirovanie.html>
30. Отделение биомассы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://studopedia.su/5_25_otdelenie-biomassi.html
31. Кухарева Н.А., Заболотец А. А. Материалы 75-ой студенческой научно-технической конференции «Центрифугирование как технологический процесс». (Минск, БНТУ) 22-28 мая 2019 г. С. 137-138
32. Голованчиков А. Б., Новиков А. Е., Филимонов М. И., Доан М. К. Физическое и математическое моделирование процессов центрифугирования: монография.- Волгоград: ГТУ, 2018. – 156 с.
33. Коростелева Н.И., Громова Т.В., Жукова И.Г. Биотехнология: учебное пособие. – Барнаул: АГАУ, 2006. – 127 с.
34. Тимонин А.С. Основы конструирования и расчета химико-технологического и природоохранного оборудования: Справочник. Т2. – Калуга: Издательство Н. Бочкаревой, 2002. – 1028 с.
35. Принцип работы сепаратора – электронный ресурс. – режим доступа: <https://www.flottweg.com/ru/wiki/separation-technology/separator-functional-principle/>
36. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/separatoryi-\(alfa-laval\)/pilotnaya-ustanovka-alfa-laval-btax-205.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/separatoryi-(alfa-laval)/pilotnaya-ustanovka-alfa-laval-btax-205.html)
37. Коростелева Н.И. Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова Биотехнология: учебное пособие. - Барнаул: Изд-во АГАУ, 2006. - 127 с
38. Конвективный метод высушивания биопрепаратов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://scienceforum.ru/2018/article/2018005459>

39. Миронов М. А., Токарева М. И. Методы расчета оборудования биотехнологических производств: учеб.-метод. пособие. – Екатеринбург: УФУ, 2017. – 47 с.
40. Кондуктивная (Контактная) сушка [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://mppnik.ru/publ/672-konduktivnaya-kontaktная-sushka.html>
41. Характеристика способов сушки и типы сушильных установок [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.activestudy.info/xarakteristika-sposobov-sushki-ovoshhej-kartofelya-i-fruktoy-i-tipy-sushilnyx-ustanovok/>
42. Особенности кондуктивной сушки [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.prosushka.ru/66-osobennosti-konduktivnoj-sushki.html>
43. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://mida.ru/articles/articles_06.php
44. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://elemash-m.ru/news/metod-raspylitelnoy-sushki>
45. Метод распылительной сушки [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.prosushka.ru/35-metod-raspylitelnoj-sushki.html>
46. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://surl.li/mtbc>
47. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://amp.ru.what-this.com/344280/1/liofilizatsiya.html>
48. Лиофильная вакуумная сушильная установка [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://jak.koshachek.com/articles/liofilna-vakuumna-sushilna-ustanovka.html>
49. Лиофилизация препаратов РВserum, как основной инструмент эффективности. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://artanica.com.ua/g23529822-kosmetika-serum>

50. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://holodko.ru/drying.htm>
51. Основы сублимационной сушки фармацевтических препаратов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.gea.com/ru/customer-cases/freeze-drying-fundamentals.jsp>
52. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.mibio.ru/contents.php?id=2483>
53. Классификация дробилок и машин для измельчения материалов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://forpsk.ru/index.php/studentu-psk/3-j-kurs/34-mekhanicheskoe-oborudovanie-predpriyatij-strojindustrii/139-klassifikatsiya-drobilok-i-mashin-dlya-izmelcheniya-materialov>
54. Семененко Д. В. Оборудование и основы проектирования предприятий вяжущих веществ и строительных материалов на их основе: конспект лекций для студентов специальности 1–48 01 01 «Химическая технология неорганических веществ, материалов и изделий», специализаций 1-48 01 01 07 «Технология строительных материалов на основе вяжущих веществ», 1-48 01 01 14 «Химическая технология вяжущих материалов» [Электронный ресурс] / Д. В. Семененко. – Минск : БГТУ, 2003. – 160 с. – Режим доступа: <https://core.ac.uk/download/pdf/144001359.pdf>
55. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.netzsch-grinding.com/ru/produkty-i-reshenija/sukhoe-izmelchenie/struinaja-melnica-cgs/>
56. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://epicentrk.ua/shop/nasos-vikhrevoy-leo-0-75kvt-hmax-75-m-qmax-50-l-min-775134.html>
57. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://drobilka.ru/promyshlennye-melnicy/struynye-melnicy/gmsm30>
58. Мікробні препарати для тваринництва Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.imv.kiev.ua/index.php/uk/products/agrarian/agrariananimal>

59. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://master-pack.com.ua/product/upakovka-dlya-gruntov-i-udobreniya/>
60. Хамагаева И.С., Качанина Л.М., Тумурова С.М. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 172 с. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://propionix.ru/f/biotehnologiya-zakvasok-propionovokislyh-bakteriy.pdf>
61. Кузьмина О.М. Исследование влияния состава защитной среды на эффективность процесса криоаморазивания микроорганизмов. 2010. Москва. /Диссертация/
62. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://biohimik.ru/produktsiya/mannit>
63. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://bio-j.ru/archive/5/124>
64. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ventfilter.kiev.ua/p/252584136-filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelnyy/>
65. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://teslaweld.com/kompressor-tesla-weld-air-500>
66. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://shop.systemair.com/ru-UA/pgk--100--50--3--20--duct--cooler/p115383>
67. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://letiss.com.ua/aircast-remeza-resiveri/vozdushniy-vertikalniy-resiver-rv-5001500>
68. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://shop.systemair.com/ru-UA/vbr--80--50--3--water--heating--batt/p94059>
69. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.envirco.com.ua/panel.html>
70. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.sartogsm.ru/biostat_c_plus.html
71. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://profpak.com/publ/upakovochnoe/dozatory_fasovochnye/dozator_cjs_25ih/65-1-0-606
72. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.kft2.com.ua/reaktor25.html>

- 73.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://promnasos.com/catalog/peristaltic_pumps/ragazzini/10079/
- 74.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://biorus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/pilotnyie-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus/pilotnyie-fermenteryi.html>
- 75.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/>
- 76.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://kiev.flagma.ua/uk/peristalticheskij-nasos-253d-zl-6-l-min-o11084457.html>
- 77.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://xn--80ac2aleg3a.xn--p1ai/catalog/fermentery-bioreaktory-promyshlennye/bioflo-pro/>
- 78.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://prom.ua/p634768378-nasos-tsentrobezhyj-samovsasyvayuschij.html>
- 79.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://krapt.com.ua/emkosti-iz-nerzhaveyushchej-stali>
- 80.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://epicentrk.ua/shop/nasos-vikhrevoy-leo-0-75kvt-hmax-75-m-qmax-50-l-min-775134.html>
- 81.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://profpak.com/publ/upakovochnoe/dozatory_fasovochnye/dozator_cjs_25ih/65-1-0-606
- 82.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/vakuumnyj-himicheskij-reaktor-75l>
83. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://drobilka.ru/promyshlennye-melnicy/struunye-melnicy/gmsm30>
- 84.[Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://krapt.com.ua/emkosti-iz-nerzhaveyushchej-stali>

85. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://service-pack.kiev.ua/fasovochnyj-avtomat-v-paket-tipa-stabilo/>
86. Яка техніка фарбування мікроорганізмів за методом Грама [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5280072/>
87. Трегуб Н.С., Капрельянц Л.В. Кінетичні параметри накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* на середовищах із селеном. *Наукові праці ОНАХТ*. 2014, 46(2): с. 112-115.
88. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
89. Чашечный метод Коха [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://scicenter.online/ekologicheskij-monitoring-scicenter/chashechniy-metod-koxa-165481.html>
90. Акопян В.Б., Ершов Ю.А., Щукин С.И. Ультразвук в медицине, ветеринарии и биологии. Под ред. Щукина С.И. Москва, 2020, 224с.
91. Методы анализа [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://studfile.net/preview/6405392/page:18/>
92. Перманганатные методы определения сахаров [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.spec-kniga.ru/tehnohimicheskij-kontrol/tekhnohimicheskij-kontrol-ovoshchesushilnogo-i-pishchekoncentratnogo-proizvodstva/himicheskie-metody-analiza-permanganatnye-metody-opredeleniya-saharov.html>
- 93.37 А.Г. Шлейкин, Н.Н. Скворцова, А.Н. Бландов Биохимия лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины., Учеб. пособие. – СПб.: ИТМО, 2015. 106с.
94. ГОСТ Р 14870-77. Продукты химические. Методы определения воды. – Введ. 01.01.78.
95. Фармакопейна стаття на Біоспорин сухий №42-3476-90. Утверждена 26.01.1998 р [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://cutt.ly/5vnI4J1>

- 96.ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0009-15-opredelenie-spetsificheskoy-aktivnosti-probiotikov/>
- 97.Окраска кислотоустойчивых микроорганизмов. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://studfile.net/preview/1152683/page:5/>
- 98.ОФС.1.2.4.0002.15 Микробиологическая чистота [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0002-15-mikrobiologicheskaya-chistota/>
- 99.Баландина А. Г., Хангильдин Р. И., Мартяшева В. А. Каталитические процессы очистки трудноокисляемых сточных вод и их аппаратурное оформление // Баш. хим. ж. 2015. №3.
100. Перушкина Е.В., Хабибуллина А.Р., Александровский С.А. Выбор способа очистки отработанного воздуха при культивировании спорообразующих бактерий // Вестник Казанского технологического университета. 2014. №19.

УДК 579.852.11.24

И.Ю. Царенко, А.А. Рой, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина**ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *BACILLUS SUBTILIS* ИМВ В-7023**

С помощью метода ортогональных латинских прямоугольников оптимизирована питательная среда для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Определены оптимальные концентрации в среде источника углерода (15,0 г/л мелассы), азота (2,0 г/л кукурузного экстракта) и фосфорсодержащих неорганических солей (0,4 г/л). При выращивании данного штамма в периодических условиях при $t^* = 28^\circ \text{C}$, значении массопереноса кислорода 0,4 – 0,6 г O_2 /л·ч и исходном содержании $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл за 24 ч культивирования количество жизнеспособных клеток бактерий достигало $1,3 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Оптимизированную среду можно рекомендовать для культивирования *B. subtilis* ИМВ В-7023 в производственных условиях.

Ключевые слова: оптимизация, культивирование, *Bacillus subtilis*, среда для культивирования.

Перспективным направлением экологизации сельского хозяйства является внедрение в практику растениеводства биопрепаратов на основе различных видов микроорганизмов [3, 4, 6, 11, 13]. Одними из наиболее перспективных являются препараты на основе высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis*, которые не только защищают растения от фитопатогенных микроорганизмов, но и улучшают фосфорное питание растений, синтезируют ростостимулирующие вещества [7,10,14]. В отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях Института микробиологии и вирусологии НАН Украины на основе штаммов азотфиксирующих *Azotobacter vinelandii* и фосфатмобилизирующих бактерий *B. subtilis* создан препарат комплексного действия для растений – Комплегран. Бактерии, включенные в состав препарата, улучшают азотное и фосфорное питание растений, синтезируют биологически активные соединения, которые положительно влияют на прорастание и всхожесть семян, развитие проростков, защищают от фитопатогенов [8].

Важнейшей стадией в производстве бактериальных препаратов является получение максимума биомассы их компонентов за минимальное время культивирования с достижением максимального экономического эффекта. Таким образом, вопрос оптимизации условий культивирования бактерий является актуальным.

Целью исследований была разработка оптимального состава жидкой питательной среды для культивирования в лабораторных условиях *B. subtilis* ИМВ В-7023 – компонента бактериальных препаратов для растениеводства.

Материалы и методы. Объектом исследований был высокоактивный штамм фосфатмобилизирующих бактерий *B. subtilis* ИМВ В-7023, выделенный в отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях и хранящийся в Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины [14]. На первом этапе исследований для культивирования бактерий использовали четыре варианта среды. Исходной была синтетическая жидкая среда, содержащая (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,3; KCl – 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; CaCO_3 – 5,0; глюкозу – 10,0; глицерофосфат кальция – 2,0; дистиллированную воду – 1л; pH – 7,1. Наряду с этой средой использовали общепринятые питательные среды – мясоептонный бульон (МПБ), пептонную среду, а также среду с мелассой. Пептонная среда включала (г/л): пептон – 10,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 3,0; глюкоза – 5,0; дистиллированная вода – 1л; pH 7,2–7,4. Среда с мелассой содержала (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; NaCl – 0,3; CaCO_3 – 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KH_2PO_4 – 0,5; меласса – 20,0; кукурузный экстракт – 1,0; pH 6,8–7,2. Среду, в состав которой входила меласса, готовили на стерильной водопроводной воде.

Культивирование бактерий проводили во флаконах объемом 500 мл на круговых качалках с частотой оборотов 240 об/мин при температуре 30°C . Рабочий объем питательной среды составлял 50 мл, что позволяло обеспечить массоперенос кислорода на уровне 0,4 – 0,6 г O_2 /л·ч. Посевной материал вносили из расчета создания начальной численности бактерий в среде

© И.Ю. Царенко, А.А. Рой, И.К. Курдиш, 2011

**ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
BACILLUS SUBTILIS ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОРМОВОЙ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ
ДОБАВКИ**

Оразова Н.Ш., Маметова А.З.

**Южно – Казахстанский Государственный университет имени М.Ауэзова г. Шымкент,
Казахстан**

***STUDY OF NUTRITIONAL MEDIA COMPOSITION FOR CULTIVATION OF BACILLUS
SUBTILIS TO OBTAIN PROBIOTIC FODDER ADDITIVE***

N.S. Orazova, A.Z. Mametova

M. Auezov South-Kazakhstan State university, Shymkent, Kazakhstan

Аннотация: В статье приведены результаты по изучению состава питательной среды для культивирования бактерий рода *Bacillus subtilis* для получения пробиотика направленного на лечение дисбактериоза сельскохозяйственных животных. Предложена питательная среда с использованием нетрадиционных источников сырья (пивной дробины) как основного компонента.

Перспективным направлением экологизации сельского хозяйства является внедрение в практику животноводства биопрепаратов на основе различных видов микроорганизмов [1]. Одними из наиболее перспективных являются препараты на основе высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis*, которые не только защищают животных от патогенных микроорганизмов [2].

Разработка и внедрение в практику ветеринарии новых высокоэффективных препаратов для лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней животных представляет собой актуальную задачу. Это объясняется ростом заболеваемости животных, несвоевременной диагностикой болезней в условиях ухудшающейся эпизоотической и экологической обстановки, а также недостаточной эффективностью существующих лечебно-профилактических средств [1, 2].

В настоящее время ведется поиск дополнительных источников белка в виде новых кормовых продуктов, применение которых бы позволило повысить биологическую ценность и продуктивность действия комбикормов, а также эффективность их использования животными и птицей. Следует отметить, что отечественная наука и промышленность решают проблемы расширения ассортимента кормовых добавок с использованием нетрадиционных источников сырья [3].

Отходы пивоваренной промышленности, например пивная дробина, большая часть которых представляет собой водянистые, скоропортящиеся продукты, используются нерационально. Сырая пивная дробина в сыром виде использовалась животноводами для скармливания домашним животным как молокогонный высокобелковый корм. Как правило, пивную дробину используют как корм для жвачных животных, однако ее можно скармливать и другим животным, применяя специальные методы обработки дробины [4].

Среди таких кормовых добавок разработана комплексная добавка «Пробиоцел». Пивную дробину смешивают с отрубями и сбраживают специально выделенными микроорганизмами (*Bacillus subtilis*). Бактерии частично перерабатывают клетчатку в легко усваиваемые сахара. В смесь добавляют микроэлемент селен. После ферментации полученную массу высушивают, в таком виде она может храниться не меньше года. Если телята едят пищу с новой добавкой, то болеют гораздо реже животных из контрольной группы, а вес набирают быстрее (в среднем на 16%) [5].

В настоящее время для повышения биологической активности микроорганизмов все чаще используют дешевые питательные среды, на основе которых разрабатывают более

УДК 579.24.852.11+632.937

**ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ
ПРИ ХРАНЕНИИ ЖИДКОЙ ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЫ
БИОФУНГИЦИДА БАЦИЗУЛИН**

З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, О.Н. Ильинская

Аннотация

Показано, что глубинное культивирование *Bacillus* sp. 3 на пшенично-кукурузной среде обеспечивает наибольший выход биомассы культуры и повышенное содержание спор при сохранении высокого уровня антагонистической активности и ростостимулирующего эффекта. Разработана препаративная форма биофунгицида бацизулин на основе штамма *Bacillus* sp. 3, в которую в качестве стабилизатора бактериальной биомассы, пленкообразователя, прилипателя и красителя введены гуминовые соединения, обеспечивающие стабильность свойств препарата в процессе хранения.

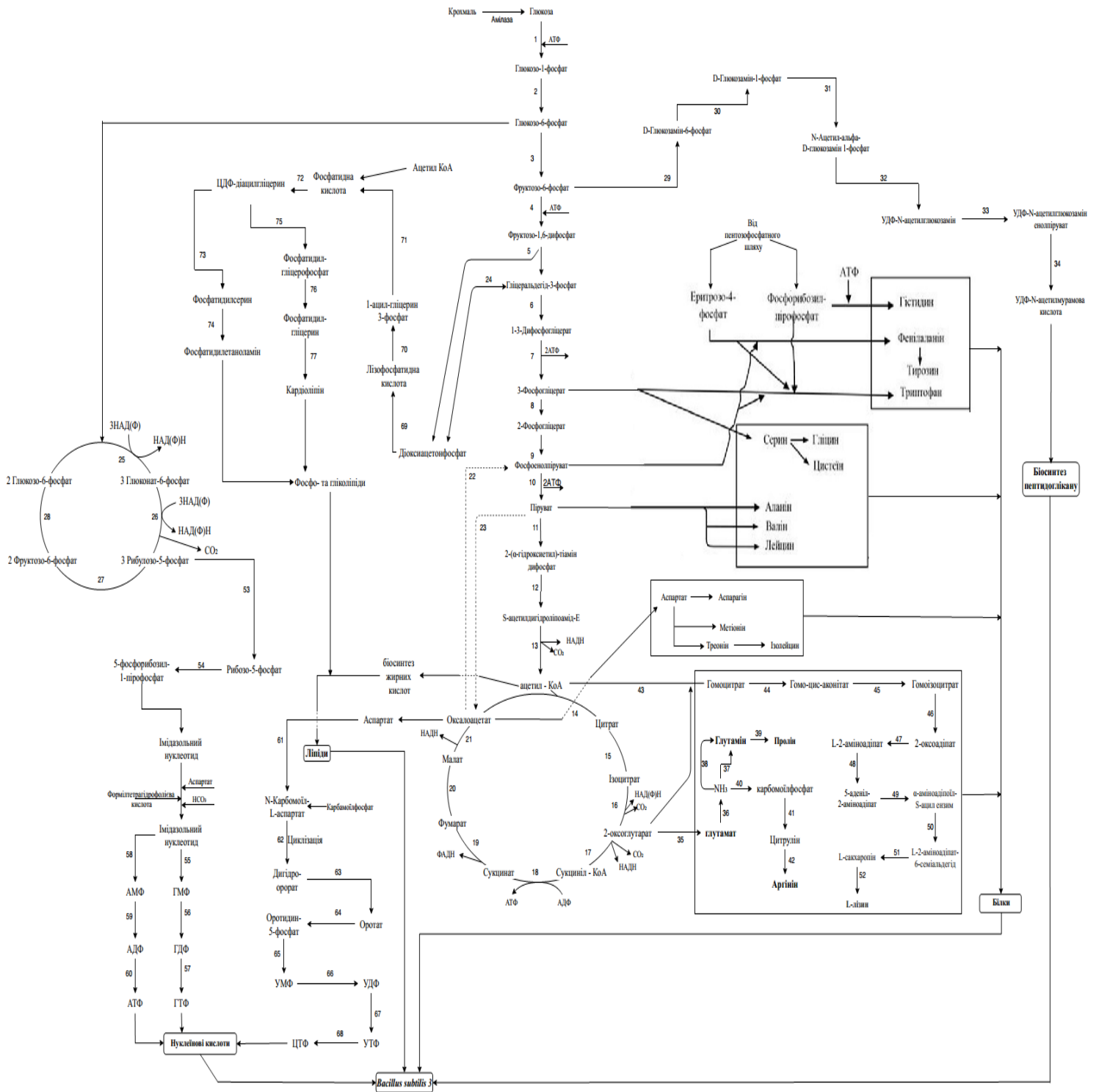
Ключевые слова: антагонистическая активность, препаративная форма, биофунгицид бацизулин, фитотоксичность, соли гуминовых кислот.

Введение

В настоящее время наметилась тенденция замены биофунгицидов, используемых для протравливания семян в виде смачивающихся порошков, на препараты в жидкой форме. Последние лишены целого ряда эксплуатационных недостатков [1] и содержат дополнительные специальные компоненты (прилипатели, пленкообразователи и т. д.) в растворенном виде. Для успешного производства таких биопрепаратов важна отработанная технология получения, включающая оптимизацию состава питательной среды, температуры культивирования, интенсивность аэрации и т. д.

Существенным недостатком большинства жидких биопрепаратов является ограниченный срок хранения [2]. В связи с этим при разработке препаративной формы, содержащей живую культуру бактерий, крайне важно учитывать возможность длительного хранения препарата при сохранении биологической активности штамма-продуцента.

В Казанском университете выделен штамм *Bacillus* sp. 3, обладающий высокими фунгицидной и ростостимулирующей активностями [3], способностью осуществлять микробиологическую трансформацию органических и неорганических соединений фосфора в доступную для растений форму [4], положительно воздействующий на биологическую активность и плодородие почвы [5]. Эти ценные качества сочетаются с отсутствием токсического действия на теплокровные объекты [6]. В связи с целесообразностью внедрения биофунгицида бацизулин в широкомасштабное сельскохозяйственное производство в качестве протравителя семян [7, 8], целью работы служила оптимизация условий культивирования



Ферменти, які позначені на схемі:

1. глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.199)
2. фософглюкомутаза (КФ 5.4.2.2)
3. глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
4. 6-фосфоглюкокіназа 1 (КФ 2.7.1.11)
5. Фруктозо-бисфосфат альдолаза, клас II (КФ 4.1.2.13)
6. Гліцеральдегід 3-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.2.1.12)
7. Фосфогліцерат кіназа (КФ 2.7.2.3)
8. 2,3-бисфосфогліцерат-незалежна фосфогліцерат мутаза(КФ 5.4.2.12)
9. Енолаза (КФ 4.2.1.11)
10. Піруват кіназа (КФ 2.7.1.40)
11. Бета-субодиниця піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1.)
12. Бета-субодиниця піруватдегідрогенази E1 (КФ 1.2.4.1)
13. Компонент піруватдегідрогенази E2 (КФ 2.3.1.12)
14. Цитрат синтаза (КФ 2.3.3.1)
- 15.Аконітат гідратаза (КФ 4.2.1.3)
- 16.Ізоцитрат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.42)
17. Дигідроліпоамідсукцинілтрансфераза (КФ 2.3.1.61)
- 18.Сукциніл-КоА синтетаза бета субуніт (КФ 6.2.1.5)
- 19.Сукцинат дегідрогеназа / фумарат редуктаза (КФ 1.3.5.1 /1.3.5.4)
- 20.Фумарат гідратаза (КФ 4.2.1.2)
- 21.Малат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.37)
- 22.Фосфоенолпіруват карбоксикіназа (КФ 4.1.1.49)
23. Піруваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1)
- 24.Тріосефосфат ізомераза (ТІМ) (КФ 5.3.1.1)
- 25.6-фосфоглюконолактоназа(КФ 3.1.1.31)
- 26.6-фосфоглюконат дегідрогеназа (КФ 1.1.1.44 1.1.1.343)
27. Транскетолаза (КФ 2.2.1.1)
28. Глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9)
- 29.Ізомерізін (КФ 2.6.1.16)

- 30.Фосфоглюкозамін мутаза (КФ 5.4.2.10)
31. Глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.157)
32. УДФ-N-ацетилглюкозамін пірофосфорилаза (КФ 2.7.7.23)
- 33.УДФ-N-ацетилглюкозамін 1-карбоксивінілтрансфераза (КФ 2.5.1.7)
- 34.УДФ-N-ацетилмурамат дегідрогеназа (КФ 1.3.1.98)
- 35.Аспартат амінотрансфераза (КФ 2.6.1.1)
- 36.Глутамат дегідрогеназа (КФ 1.4.1.2)
- 37.Глутаміназа (КФ 3.5.1.2)
- 38.Глутамін синтетаза (КФ 6.3.1.2)
- 39.Піролін-5-карбоксилат редуктаза (КФ 1.5.1.2)
40. КФ 6.3.4.16
- 41.Орнітін карбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.3)
- 42.Нітрооксисентаза оксигеназа (КФ 1.14.14.47)
43. КФ 2.3.3.14
44. КФ 4.2.1
45. КФ 4.2.1.36
46. КФ 1.1.1.286
47. КФ 2.6.1.39
48. КФ 1.2.1.95
49. КФ 1.2.1.95
50. КФ 1.2.1.95
51. КФ 1.5.1.10
52. КФ 1.5.1.7
- 53.Рибозо-5-фосфат ізомераза В (КФ 5.3.1.6)
- 54.Рибозо-фосфат пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1)
- 55.ГМФ синтаза (КФ 6.3.5.2)
- 56.Гуанілат кіназа (КФ 2.7.4.8)
- 57.Нуклеозид-дифосфат кіназа (КФ 2.7.4.6)
- 58.Аденілосукцинат ліаза (КФ 4.3.2.2)
- 59.Аденілат кіназа (КФ 2.7.4.3)

60. Нуклеозид-дифосфат кіназа (КФ 2.7.4.6)
61. Аспартат карбамоїл трансфераза (КФ 2.1.3.2)
62. Дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3)
63. Дигідрооротат дегідрогеназа В (КФ 1.3.1.14)
64. Оротат фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10)
65. Оротидин-5-фосфат-дикарбоксилаза (КФ 4.1.1.23)
66. Уриділат кіназа (КФ 2.7.4.22)
67. Нуклеозид – дифосфат кіназа (КФ 2.7.4.6)
68. ЦТФ синтаза (КФ 6.3.4.2)
69. НАД (Р) Н-залежна гліцерин-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.94), гліцерол-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.3)
70. Гліцерол-3-фосфатна ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.275)
71. Фосфоліпід / гліцерин ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.51)
72. Фосфатидат цитидилілтрансферази (КФ 2.7.7.41)
73. Фосфатидилсеринсинтаза (КФ 2.7.8.8)
74. Фосфатидилсерин декарбоксилаза (КФ 4.1.1.65)
75. ЦДФ-Спиртова фосфатидилтрансфераза (КФ 2.7.8.5)
76. Фосфатидилгліцерофосфатаза А (КФ 3.1.3.27)
77. Кардіоліпін-синтаза (КФ 2.7.8.41)