

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)

« ___ » _____ 2020 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

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

« ___ » _____ 2020 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 megaterium* var. *phosphaticum* для одержання Фосфобактерину

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

_____ Бабченко Владислав Сергійович _____
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник _____ Воронцов Олександр Олександрович _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____ Решетняк Л.Р. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Напрямок підготовки _____

(шифр і назва)

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

Бабченку Владиславу Сергійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bacillus megaterium var. phosphaticum* для одержання Фосфобактерину

керівник роботи Воронцов О.О., к.т.н.

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

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-к

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи _____ біологічний агент: *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д цільовий продукт: фосфобактерин

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 виробництва. РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс, розрахунок обладнання. РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)

Технологічна схема виробництва фосфобактерину – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема виробництва фосфобактерину – 1 аркуш формату А1.

Апаратурна схема автоматизації виробництва – 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
5	Клименко Олег Миколайович, доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	24.04.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної роботи	Строк виконання етапів проекту (роботи)	Примітка
1	Характеристика цільового продукту.	20.03.2020-30.03.2020	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.	01.04.2020-11.04.2020	
3	Техніко-економічне обґрунтування.	12.04.2020-21.04.2020	
4	Біосинтез цільового продукту.	22.04.2020-01.05.2020	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва.	02.05.2020-12.05.2020	
6	Матеріальний баланс, розрахунок обладнання.	02.05.2020-12.05.2020	
7	Специфікація обладнання.	02.05.2020-12.05.2020	
8	Опис технологічної схеми.	02.05.2020-12.05.2020	
9	Контроль виробництва.	02.05.2020-12.05.2020	
10	Автоматизація ділянки виробництва.	14.05.2020-17.05.2020	
11	Оформлення пояснювальної записки	18.05.2020-24.05.2020	
12	Виконання графічної частини проекту	25.05.2020-31.05.2020	

Здобувач

_____ (підпис)

Бабченко В.С.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Воронцов О.О.

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробленню біотехнології виробництва *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д для одержання Фосфобактерину – високоефективного бактеріального препарату на основі фосфатмобілізуєчих ґрунтових бактерій для підвищення продуктивності злакових, технічних та овочевих культур.

У даному дипломному проекті складено огляд літератури, щодо застосування фосфобактерину в сільськогосподарській галузі та враховуючи техніко-економічне обґрунтування, встановлено річну потребу для забезпечення сільськогосподарських угідь Київської області даним препаратом. Розрахована потужність виробництва фосфобактерину становить 9855 л препарату в рік.

Технологічна схема біосинтезу фосфобактерину включає допоміжні роботи (підготовку персоналу, приміщень, обладнання, повітря, підготовку поживного середовища, зберігання культуральної рідини) та основні процеси: підготовка посівного матеріалу та біосинтез фосфобактерину у ферментері об'ємом 400 л, відділення біомаси сепаруванням, приготування гелю та фасування. В графічній частині наведені апаратурна та технологічна схеми.

Дипломний проект виробництва фосфобактерину складається з вступу, десяти розділів, графічних матеріалів та списку використаної літератури з 80 найменувань. Загальний обсяг роботи – 98 сторінок, 24 рисунка, 29 таблиць, 2 креслення формату А1 та 1 креслення формату А3.

Ключові слова: біопрепарат, біодобрива, біосинтез, фосфатмобілізуєчі бактерії.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	4
ЗМІСТ	5
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2 Розрахунок складу поживного середовища.....	14
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	16
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО–ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	21
3.1. Потреба у цільовому продукті	21
3.2.Розрахунок потужності виробництва.....	22
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера.....	23
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	24
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	25
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента ...	25
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	27
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	32
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.	32
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	32
5.1.2. Обґрунтування стадії підготовки повітря	35
5.1.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору миючих та /або дезінфікуючих засобів.....	37
5.1.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища	42
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	44

5.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання.....	44
5.2.2 Обґрунтування способу приготування напівпродукту.....	48
5.2.3. Обґрунтування стадії пакування готового продукту.....	49
РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ...	50
РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	60
РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	64
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	74
9.1. Карта постадійного контролю	74
9.2. Методики визначення.....	77
9.2.1. Визначення концентрації біомаси.....	77
9.2.2. Визначення концентрації нітратного азоту.....	78
9.2.3. Мікробіологічний контроль.....	80
РОЗДІЛ 10. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ФОСФОБАКТЕРИНУ.....	82
10.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням завдання на розробку системи автоматизації.....	82
10.2. Опис схеми автоматизації зі специфікацією засобів автоматизації.....	84
ДОДАТОК 1.....	85
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	90

ВСТУП

В умовах високої спеціалізації і концентрації сільськогосподарського виробництва проведення захисних заходів - невід'ємний фактор отримання високих і гарантованих врожаїв сільськогосподарських культур, збереження їх якості [1].

Зараз в сільськогосподарському виробництві біопрепарати, на жаль, не знаходять такого широкого застосування, як і пару десятиліть назад. Одна з причин цього - недооцінка їх позитивних якостей та захоплення фахівців високої стартовою ефективністю хімічних пестицидів. Бажання якнайшвидшого досягнення максимального ефекту досі є пріоритетним у виборі засобів захисту.

Однак такий підхід супроводжувався негативним впливом цих хімічних речовин і продуктів їх розкладу на якість рослинної продукції, стан природних екосистем і здоров'я людей. Тому в останні десятиріччя значна увага приділяється обмеженню використання в землеробстві мінеральних добрив та пестицидів і біологізації рослинництва.

Одним з найважливіших факторів, що обумовлює родючість ґрунту є функціонування його мікрофлори. Тому в останні десятиріччя для корекції мікробних процесів у ризосфері рослин широко застосовують мікробні препарати.

У теперішній час основними критеріями землекористування залишаються економічна ефективність та екологічна безпека. Виробництво високоякісних сортів вимагає високих дозвільних мінеральних зручностей та пестицидів, які привозять виснаження ґрунтів і знижують якість сільськогосподарських виробництв.

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О.					7	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Використовуючи живі мікроорганізми, можна скоротити геологічний круговорот для виявлення їх можливостей, переводячи метаболічно неактивні, пов'язані хімічні елементи в доступних для рослин форм.

Багаторічними дослідженнями доведено, що обробка насіння овочевих, злакових та інших видів рослин біопрепаратами значно покращує його схожість і формування проростків. Внесення таких препаратів в кореневу зону помідорів, огірків, картоплі, кукурудзи на силос, цукрових буряків та інших культур підвищує їх врожайність на 18-37%. Біопрепарати на основі фосфатмобілізувальних ґрунтових бактерій значно покращують ріст і розвиток газонної трави, багатьох видів квіткових і декоративних рослин.

Відомо застосування біопрепаратів на основі фосфатмобілізувальних ґрунтових бактерій для підвищення продуктивності вирощування троянд та інших рослин, використання таких препаратів підвищувало кількість квітконосних пагонів на рослині на 25-46%. Помітний позитивний вплив біопрепаратів на основі фосфатмобілізувальних ґрунтових бактерій спричиняє на ріст, розвиток сіянців і саджанців сосни, ялини та інших рослин.

Актуальність

Підвищення ефективності рослинництва - найважливіше завдання сільськогосподарського виробництва на сьогодні в Україні і в світі в цілому. Дана проблема може бути вирішена за рахунок раціонального поєднання техногенних і природних ресурсів, постійного пошуку альтернативних способів, що поліпшують процеси росту, розвитку та формування продуктивності, одним із них є застосування мікробіологічних препаратів для підвищення ефективності рослинництва.

Новизна: Новизною дипломного проекту є використання штаму *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д, який має високий титр препарату ($1,8 \cdot 10^9$ спор/мл) в порівнянні з іншими продуцентами та синтезує високу концентрацію біомаси на поживному середовищі низької вартості, що є вирішальним для даного препарату а також володіє більшою стабільністю в процесі зберігання [7].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Фосфобактерин – високоефективний препарат на основі ріст стимулюючих фосфат мобілізуючих ґрунтових бактерій *Bacillus megaterium* для збільшення продуктивності злакових, технічних і овочевих культур.

Ефективність препарату визначається здатністю бактерій, на основі яких він виготовлений, мінералізувати органічні фосфотримаючі речовини, покращувати мінеральне живлення рослин, стимулювати їх ріст і розвиток за рахунок забезпечення біологічно активними речовинами (вітамінами, фітогормонами, амінокислотами та ін.), збільшувати стійкість рослин до фітопатогенів і стресів, підвищувати врожай і його якість (Рис .1.1) [4-6].



Рис 1.1 Фосфобактерин у рідкій формі.

Випускають Фосфобактерин в рідкій і гельній формі, розфасованим в пляшки і пакети. Термін зберігання - 1-2 місяці при температурі 5-15 °С.

Препарат відповідає санітарно-гігієнічним нормам, не шкідливий для людини і тварин, не викликає забруднення навколишнього середовища. При дотриманні правил застосування Фосфобактерину і технології вирощування культур препарат сприяє збільшенню врожаю і поліпшення його якості [6-7].

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Характеристика цільового продукту	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О.					8	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Дія препарату

Після обробки насіння бактерії адгезуються на поверхні насіння, і після посадки активуються і починають активно накопичувати фосфати у доступній формі і рослина починає їх споживати, відповідно швидше починає рости і набирати масу, по мірі росту рослини починають рости і колонізуватися бактерії, продовжують виконувати свою роль накопичення фосфору, до того ж мають певну антагоністичну активність до шкідників рослин і приглушають їх розвиток, що сприяє кращому здоров'ю рослин і збільшенню сумарної врожайності [7].

Передпосівний обробіток насіння Фосфобактерином виробляють за день або в день посіву. Насіння обробляють, перемішуючи (вручну або в машинах для протруювання, очищених від ядохімікатів), і злегка підсушують на повітрі, уникаючи прямої дії сонячних променів.

Гектарна порція препарату становить 50-100 мл. Концентрація клітин має становити в середньому $1-1,5 \cdot 10^8$ КУО/мл. Для обробки відповідної партії насіння зазначену дозу препарату розводять водою кімнатної температури до необхідного обсягу.

Препарат Фосфобактерин сприяє отриманню продукції, яка відповідає вимогам екологічної безпеки, зі зменшеною собівартістю і може бути одним з елементів органічного землеробства [6 - 8].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

В даний час досить перспективним є впровадження в практику розвитку агровиробництва біологічного землеробства - використання екологічно чистих методів підгодівлі і живлення рослин на наших полях. Застосування бактеріальних добрив, з одного боку, дає нові підходи до вирішення біологічних проблем, з іншого боку, приносить відчутний економічний ефект.

Відомі біопрепарати на основі фосфатмобілізувальних ґрунтових бактерій, отримують шляхом культивування бактерій *Bacillus megaterium*.

Для вибору штаму для культивування біопрепарату необхідно порівняти відомі штами для отримання біологічних препаратів, нижче наведена порівняльна таблиця [].

Таблиця 2.1

Технологічна характеристика біопрепарату на основі фосфатмобілізувальних ґрунтових бактерій

Штам	Склад поживного середовища г/л	Особливості культивування	Титр препарату	Тр-сть процесу	Використана література
<i>Bacillus megaterium</i> V3,	Триптон – 10; Дріжджовий екстракт – 5; Mg ₂ SO ₄ - 2,5;	Культивування здійснюють протягом 20 год при 32 ° С при насиченні середовища повітрям 60-70% рН=7,2	1×10 ⁷	20 год	Патент: RU 2649359: Штамм бактерій <i>Bacillus megaterium</i> v3 в качестве средства для ускорения роста и увеличения продуктивности винограда, зерновых, овощных и древесных культур- 2012-2018//Щербакова Е. Н. Роц П. Ю., Щербаков А.В.,Мулина С. А.,Чеботарь В. К.,Заплаткин А .Н.- 23.04.2018.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О.					10	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

<i>Bacillus megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i> ВКМ В-2357 Д	NH ₄ Cl - 2 ; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,1 ; NaCl -0,2 ; MnSO ₄ - сліди; FeSO ₄ ·7H ₂ O - сліди; Глюкоза - 20 ; рН - 7,0;	Засівають штамом і культивують глибинним способом, при 31°C, швидкість перемішування 120 об/хв, рН – 7.	1,8×10 ⁹	48 годин	Патент: RU 2327737. Штамм бактерій <i>Bacillus megaterium</i> , мобілізуючий фосфор і кремний из объектов литосферы и устойчивый к полигексаметиленгуанидину//Вайшла Ольга Борисовна Ведерникова Анна Алексеевна – 24.06.2016.
<i>Bacillus megaterium</i> 501 GR	Дріжджовий автолізат свіжий - 20 Кукурудзяне борошно 10 (NH ₄)NO ₃ 0,2 K ₂ HPO ₄ 0,8 KH ₂ PO ₄ 0,2 MgSO ₄ 0,1 MnCl ₂ 0,2 мг CuSO ₄ 2,0 мг	Культивування здійснюють протягом 48 год при 37 ° С або до максимального спорутворення.	0,5×10 ⁹	48 годин	Патент. RU2558291C2. Полифункциональное средство для растениеводства// Ю. В Круглов, Т. О Лисина 27.02 2015.

З таблиці видно, що продуценти біопрепаратів, які наведені у таблиці мають різний титр готового біопрепарату. *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д найбільший титр готового продукту 1,8*10⁹ спор/мл при культивуванні 48 год (див. табл. 2.1). Два інших продуценти з яких отримують біопрепарати, мають з найнижчий титр 1×10⁷ та 0,5*10⁹ спор/мл [11-14].

Для остаточного вибору біологічного агента потрібно детально проаналізувати дані щодо технологій отримання кінцевого продукту шляхом культивування різних штамів бактерій.

Культивування *Bacillus megaterium* V3, проводиться на нескладному поживному середовищі невизначеного складу яке містить деякі дорого вартісні компоненти наприклад триптон та дріжджовий екстракт, час культивування на даному середовищі є досить невеликим – всього 20 годин, у порівнянні з іншими штамми - це на 4 -6 годин менше за інших, тож це

може зменшити затрату енергоресурсів на культивування. Проте концентрація біомаси у КУО цього штаму відносно вкрай невисока- всього 10^7 КУО на літр. Інші параметри культивування майже однакові з другим штамом [6].

Штам *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д володіє максимальною концентрацією біомаси у $1,8 \cdot 10^9$ КУО/мл є вищою ніж у штама-конкурента, хоча час культивування у цього штаму більший на 4 години ніж у першого (*B. megaterium* V3) і становить 24 години, цей недолік компенсується дешевим у порівнянні середовищем культивування з основним субстратом – глюкозою і набором солей Параметри культивування : рН-7 і температура 31°C не сильно відрізняються по затратам енергоресурсів для їх підтримання ві попереднього штаму[7].

Продуцент біомаси *Bacillus megaterium* 501 GR є досить ефективним для виробництва препарату на основі біомаси, його продуктивність по біомасі є не найвищою, проте досить суттєвою $0,5 \cdot 10^9$ КУО/мл, час культивування може тривати 36 – 48 годин, температура культивування становить 34°C , що трохи вище від температури культивування інших продуцентів. рН становить 6,8-7 , що не сильно відрізняється від інших. Найбільший недолік даного штаму є досить складне поживне середовище, з двома джерелами вуглецю і азоту: кукурудзяне борошно та дріжджова маса. До того ж перед приготуванням середовища дріжджову масу доведеться руйнувати або механічним шляхом , або хімічним (лізоцимом). Що понесе додаткові витрати енергоресурсів та реагентів, що сумарно збільшить вартість культивування [8].

Для точного порівняння собівартості середовищ культивування штамів для виробництва біопрепаратів потрібно порівняти вартості компонентів середовища в розрахунку на 1 літр рідкого середовища (Табл. 2.2.).

Порівняння вартості середовищ для культивування продуцентів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3, 4)*
<i>Bacillus megaterium</i> V3	Триптон – 10	1120,00	11,2	1
	Дріжджовий екстракт – 5	70,00	0,35	1
	MgSO ₄ - 2,5	22,00	0,05	2
	Вартість 1 л середовища - 11,6 грн			
<i>Bacillus megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i> ВКМ В-2357 Д	Глюкоза - 20	18,00	0,36	1
	NH ₄ Cl - 2	14,00	0,0028	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,1	22,00	0,00022	2
	NaCl -0,2	14,00	0,00028	1
	MnSO ₄ - 0,001;	25,00	0,0000025	3
	FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,001;	8,00	0,0000008	1
Вартість 1 л середовища – 0,364 грн				
<i>Bacillus megaterium</i> 501 GR	Дріжджовий автолізат свіжий - 20	70,00	1,4	1
	Кукурудзяне борошно - 10	40,00	0,4	1
	(NH ₄)NO ₃ – 0,2	25,00	0,05	1
	K ₂ HPO ₄ -0,8	101	0,08	2
	KH ₂ PO ₄ – 0,2	110,00	0,02	1
	MgSO ₄ – 0,1	22,00	0,002	4
	MnCl ₂ – 0,0002 г	125,00	0,00002	4
	CuSO ₄ – 0,002 г	14,00	0,00002	1
Вартість 1 л середовища – 1,952 грн				

Примітка. * - ціни наведено на березень 2020 р.– 1. www.nevareaktiv.ru,
2. <http://202971.ua.all.biz>, 3. <http://systopt.ub.ua>, 4. <http://agroterem.com.ua>

Дані, наведено у табл. 5.2, засвідчують що середовище для культивування *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д є дешевшим ніж середовище для культивування *Bacillus megaterium* V3 і *Bacillus megaterium* 501 GR [44]. Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, необхідно розрахувати умовну вартість одиниці цільового продукту (див. табл. 5.3).

Умовна вартість одного титру біопрепарату при культивуванні запропонованих продуцентів

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Титр, спор/мл	Умовна вартість 1 титру, грн	Тривалість культивування, год	Титр утвореного за годину, од/год
<i>Bacillus megaterium</i> V3	11,6	$0,01 \cdot 10^9$	1175	20	$0,0005 \cdot 10^9$
<i>Bacillus megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i> ВКМ В-2357 Д	0,36	$1,8 \cdot 10^9$	0,2	48	$0,0375 \cdot 10^9$
<i>Bacillus megaterium</i> 501 GR	1,952	$0,5 \cdot 10^9$	3,904	48	$0,0104 \cdot 10^9$

На основі порівняльної характеристики штамів- продуцентів для виробництва препарату Фосфобактерин, було обрано штам *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д, з таких причин: найбільша економічна доцільність, низька вартість поживного середовища, висока концентрацію біомаси, що є вирішальним для даного препарату, оскільки у ньому головне максимально можлива концентрація біомаси при мінімальних затратах на поживне середовище. За аналізом представлених параметрів культивування та продуктивності по концентрації біомаси з 3 представлених штамів для отримання фосфобактерину слід обрати саме *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д.

2.2 Розрахунок складу поживного середовища

Концентрація біомаси розрахована виходячи зі складу поживного середовища даного у джерелі надто мала, для збільшення виходу реальної і розрахункової концентрації біомаси необхідно збільшити концентрацію джерел С або N. Склад поживного середовища наступний (г/л):

Глюкоза – 20; NH_4Cl - 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; NaCl - 0,2; MnSO_4 - 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.001

Розрахунок по джерелу вуглецю:

На пряму на вихід біомаси впливає концентрація глюкози та NH_4Cl .

Основним субстратом і джерелом карбону у обраному середовищі є глюкоза.

Хімічна формула глюкози - $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, тож відштовхуємося від неї. Відсоток вуглецю у глюкозі (6 атомів молекулярною масою 12 кожний) становить :

$$w_1 = (100 \times 72) / 180 = 40 \%$$

Розраховуємо масу вуглецю у 20 г/л глюкози :

$$G = (40 \times 20) / 100 = 8 \text{ г/л}$$

Розрахована маса вуглецю, потребує поправку на холосте окиснення у 50 % оскільки половина вуглецю витрачається на холосте окиснення при рості продуцента. При поправці на холосте окиснення маса вуглецю становить 4 г/л.

Максимально можлива кількість біомаси за глюкозою

Вміст вуглецю у біомасі клітин становить 50% відносно сухої біомаси, тож з 4 г/л зможе утворитися відповідна кількість біомаси:

$$G_m = 0,5 / 4 = 8 \text{ г/л}$$

Вихідна концентрація глюкози дає нормальний вихід біомаси отже проблема у концентрації NH_4Cl .

Розрахунок по джерелу азоту

Джерелом азоту є компонент середовища: амоній хлорид.

Вміст азоту у амоній хлориді становить (NH_4Cl).

$$(14 \times 100) / 53 = 26,4 \%$$

Знаходимо масу азоту у 1 літрі середовища:

$$G_1 = (26,4 \times 0,2) / 100 = 0,052 \text{ г/л}$$

Максимально можлива концентрація біомаси за азотом (NH_4Cl .)

Вміст азоту у біомасі становить 10 %. Відповідно 0,052 г/л вистачить на :

$G_{m1} = 0,052 \times 10 = 0,52 \text{ г/л}$ біомаси. Приймаємо теоретичний вихід біомаси у 5 г/л. Для накопичення такої кількості біомаси концентрацію NH_4Cl необхідно збільшити.

0,2 – 0,52 г/л

5,0 – X

$$X = (5 * 0,52) / 0,2 = 13 \text{ г/л}$$

Склад середовища на 5 г/л біомаси становить(г/л):

Глюкоза – 20; NH₄Cl – 13; MgSO₄·7H₂O – 0,1; NaCl – 0,2; MnSO₄ – 0,001;
FeSO₄·7H₂O – 0.001.

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

Клітини штаму *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д - прямі палички з закругленими кінцями. Розташовуються поодинокі або в парах, іноді утворюють ланцюжки. Розмір клітин: 0,5-1,5 мкм. При фарбуванні за Грамом (кристалічним фіолетовим та подальшою обробкою розчином Люголя, спиртом і фуксином) отримана позитивна реакція, тобто грампозитивні, утворюють сферичні ендоспори. Розмножуються простим поділом.

Клітини рухливі, на (МПА) клітини штаму утворюють колонії брудно-білого кольору. Не виділяють пігменти в поживне середовище. На МПА (31 ° С, 48 год) утворюють різко облямовані колонії брудно-білого кольору. Старі колонії жовтіють [7,18]. На *рис 2.1*. показано мікроскопіювання бактерій за грамом. На *рис 2.2* наведено зображення *Bacillus megaterium* на агаризованому середовищі.



Рисунок 2.1 *Bacillus megaterium* при мікроскопіюванні за грамом[18].



Рисунок 2.3.1.2 *Bacillus megaterium* на агаризованому середовищі[19].

Дані бактерії за типом живлення є хемоорганогетеротрофи, тобто використовують як донор електронів, джерело вуглецю – органічні речовини, а джерело енергії – хімічні реакції. По відношенню до осмотичного тиску є осмоотолерантним. *B. megaterium* росте при температурі від 3 °С до 45 °С, при оптимальній температурі близько 30 °С.

Може рости в межах рН від 6,9 до 7,3, оптимальне значення рН 7 [7,17].

По відношенню до кисню аероби тобто потребує кисню для окиснювальних процесів дихання в звичайних умовах, Можуть асимілювати і споживати різні моно і дисахариди такі як глюкоза маноза, галактоза, сахароза мальтоза, інші, деякі полісахариди ,може споживати пептон, і інші продукти білкової природи [17]. Утворює кислоту з глюкози, каталазопозитивний, мобілізує фосфор з оротофосфату кальцію. Підвищена здатність до утворення індолу та гіберилінів [9, 7, 17].

2.4.Таксономічний статус біологічного агента.

Бактерії класифікують за способами їх за морфолого-культуральними (форма клітини, наявність джгутиків, рухливість утворення спор) та фізіолого-біохімічними ознаками (синтез певних ферментів споживання певних субстратів, джерел біогенних елементів) а також за генетичними ознаками найменш змінених генів.

Класифікація бактерій є більш консервативною ніж у грибів, оскільки мало разів змінювалася Єдина класифікація бактерій наведена у «Визначнику

Бергі», більш пізні видання – основана на морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознаках, більш пізні видання на цих та на філогенетичних ознаках (підходах).

Перша комплексна класифікація базувалися лише на морфолого-фізіологічних бактерій і була викладена у першому виданні Визначника бактерій Бергі у 1923р , наступні видання враховували й належність видів до певних місць існування та їх адаптацію до цих умов заносили стосовно нових відкритих мікроорганізмів за вищезазначеним підходом до 1986 р до 9 видання визначника Бергі [9].

З 10 видання Визначника Бергі у ньому наведено філогенетичну класифікацію бактерій основану на дослідження генів, що кодують рибосомальні білки. Після цього видання більшість доменів бактерій у систематиці змінили свої місця докорінно і перейшли на нові. У 1980 -1990 рр. було розроблену першу класифікацію дріжджів, яка базувалася на морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних ознаках, а саме у 1984 р.

Тож нові видання після опублікування філогенетичної класифікації спираються тепер не тільки на фізіологічні та культуральні а й на генетичні ознаки бактерій, що дає більш точну класифікацію [9].

Розглянемо таксономічний статус *B. megaterium* згідно з ІХ виданням Керівництва Бергі (фенотипова класифікація) та порівняємо його з Х виданням Керівництва Бергі (філогенетична класифікація) [17-19].

Таксономічне положення бактерії згідно з ІХ виданням

Керівництва Бергі з систематики бактерій

Таксон	Латинська назва
Царство	<i>Procaryotae</i>
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Firmibacteria</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>megaterium</i>

Таксономічне положення бактерії згідно з X виданням

Керівництва Бергі з систематики бактерій

Таксон	Латинська назва
Домен	<i>Bacteria</i>
Відділ	<i>Firmicutes</i>
Клас	<i>Bacili</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>
Вид	<i>megaterium</i>

Розглянувши дані таблиці, можна сказати, що особливого розмежування згідно з IX виданням Керівництва Бергі та X виданням Керівництва Бергі не виявлено.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільового продукті

Біодобрива представляють собою в своїй більшості біомасовий концентрат бактерій, що акумулюють фосфор, азотфіксуючих та нітрифікуючих бактрій або інших мікроорганізмів здатних до покращенні врожайності культур або для захисту від шкідників. Механізми дії біодобрив у більшості однакові - це переведення азоту або фосфору із недоступної для рослин форми у доступну [20, 21].

Дозування препарату становить до 50-100 мл на гектар посівної площі для овочевих, злакових та технічних культур. Для розрахунку потреби візьмемо злакові культури: кукурудзу, пшеницю, гречку. Об'єм виробництва буде орієнтовано 1 області та 3 культури які будуть оброблятися Київська область, культури: Кукурудза, Пшениця, Ячмінь. Знаючи площі посівів у Київській області у 2019 р можна розрахувати потребу. Наводимо наступну таблицю. Враховуючи, що дозування сухого препарату для обробки насіння на оброблювальну площу становить в середньому 50 мл на гектар, точне дозування підбирається емпіричним шляхом, тож приймаємо для кожної культури окремо своє дозування. Кукурудза - 100 мл, пшениця – 90 мл, ячмінь- 80 мл.

Таблиця 3.1

Площі посівів харчових злакових культур у Київській області [23,24].

Культура	Площі посівів за 2019 р, тис. га	Кількість зборів врожаю, тис тон	Дозування препарату. (мл препарату на 1 га)
Кукурудза	257,8	1019,35	100 мл
Пшениця	191,2	2183,17	80 мл
Ячмінь	80,3	385.02	70 мл

					НУХТ БТЕК 04.01.06 ДП ПЗ			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата	Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Бабченко В.С					21	4
Перевір.		Воронцов О. О.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						Кафедра БТМ

Оскільки статистика площ посівів рахується на тисячі гектарів потреба буде досить велика, однак враховуючи, що готовий препарат, це культуральна рідина, яка не обробляється і не виділяється то на виході одержують препарат майже без втрат і без стадій виділення і очищення готового продукту.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

На ринку України існує цілий рід подібних по зовнішній формі та відсотку застосування як фосфобактерин, до них входять як відомі препарати («Азотобактерин», «Ризобін», «Азорін», «Єскофосфорин» та маловідомі: «Єкориз», «Єковітал»[8]. На ринку дані препарати будуть спричинювати досить високий рівень конкуренції. Також слід врахувати що не всі фермерські господарства використовують біологічні засоби для підвищення врожайності зернових культур. Тож це необхідно врахувати, тому приймаємо, що лише при засіві 20 % сільськогосподарських угідь Київської області зернові культури будуть оброблятися фосфобактерином.

Для узагальнення потреби рік наводимо таблицю 3.2 з сумарним значенням потреби у продукті.

Таблиця 3.2

Узагальнена річна потреба у фосфобактерині [5,4].

Культура	Площі посівів за 2019 р, тис. га	Площі посівів на яких буде використовуватись фосфобактерин, тис. га	Дозування препарату. (мл препарату на 1 га)	Загальна кількість препарату, л
Кукурудза	257,8	51,56	100 мл	5156,0
Пшениця	191,2	38,24	80 мл	3059,2
Ячмінь	80,3	16,06	70 мл	1124,2
Усього	-	-	-	9339,4

*Примітка У розрахунку потреби враховується одна обробка зерна перед посадкою чи одноразова обробка уже посаджених площ на рік.

Загальна потреба у біомасі (враховуючи втрати 10%) для 3 культур по Київській області буде становити:

$$G_{\text{потреба}} = (51560 * 100 + 38240 * 80 + 16060 * 70) / 1000 * 1,1 = 9855 \text{ л на рік}$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера

Зважаючи на термін придатності фофобактерину (12 міс), потрібно проводити виробництво даного біопрепарату перед сезонним попитом на нього, тобто за 3-5 місяців до старту продажу фофобактерину, тому кількість робочих днів в рік на виробництво фосфобактерину становитиме – 100.

$$\text{Ефективний фонд робочого часу } N_{\text{еф.}} = 100 \times 24 = 2400 \text{ год.}$$

2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 48 + 14 = 62 \text{ (год), де}$$

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

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

3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = \frac{N_{\text{еф}}}{T_{\text{цф}}} = \frac{2400}{62} = 38 \text{ циклів}$$

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

$$V_{\text{кр}}^{\text{н}} = V_{\text{кр}}^{\text{річ}} / n_{\text{ц}} = 9855 / 38 = 259 \text{ л}$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера при вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,7$ складе $V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / K_{\text{зап}} = 259 / 0,7 = 370 \text{ л}$

У додатку 4 вибираємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{гф}} = 400 \text{ л.}$

Уточнимо коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = V_{\text{кр}} / V_{\text{гф}} = 259 / 400 = 0,65$. Це менше, ніж вибране, тому залишаємо його для подальших розрахунків.

3.4. розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

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

$V_{пс1} = V_{роб.1}/(1+Xф) = 259 / (1+0,1) = 235$ л, де $Xф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм1} (V_{роб.2}) = V_{роб.1} - V_{пс1} = 259 - 235 = 24 \text{ л.}$$

Для одержання інокуляту обираємо ферментер-інокулятор на 40 л компанії «Біотехно»[7]. Коефіцієнт заповнення буде становити 0,6

Для отримання 24 л культуральної рідини потрібно:

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

$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+Xф) = 24 / (1+0,1) = 21,8$ л, де $Xф = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 24 - 21,8 = 2,18 \text{ л.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у колбах на качалці (10 колб об'ємом 750 мл по 218 мл посівного матеріалу). Для даного культивування поживне середовище стерилізуватимемо в автоклаві.

Процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу біопрепарату у ферментері об'ємом 400 л з коефіцієнтом заповнення 0,65 буде проходити у три етапи:

- 1) Одержання 2,18 л посівного матеріалу у колбах (10 колб по 218 мл посівного матеріалу);
- 2) Одержання 24 л посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 40 л;
- 3) Біосинтез біопрепарату 259 л у ферментері об'ємом 400 л;

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 є глюкоза. У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes присутня вся інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *B. megaterium var. phosphaticum*, в даному випадку шлях метаболізму (гліколіз) згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (рис 4.1).

Глюкоза за участю глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.69) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (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 тріозофосфатізомераз (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат. 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) [9].

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О. О.					25	6
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

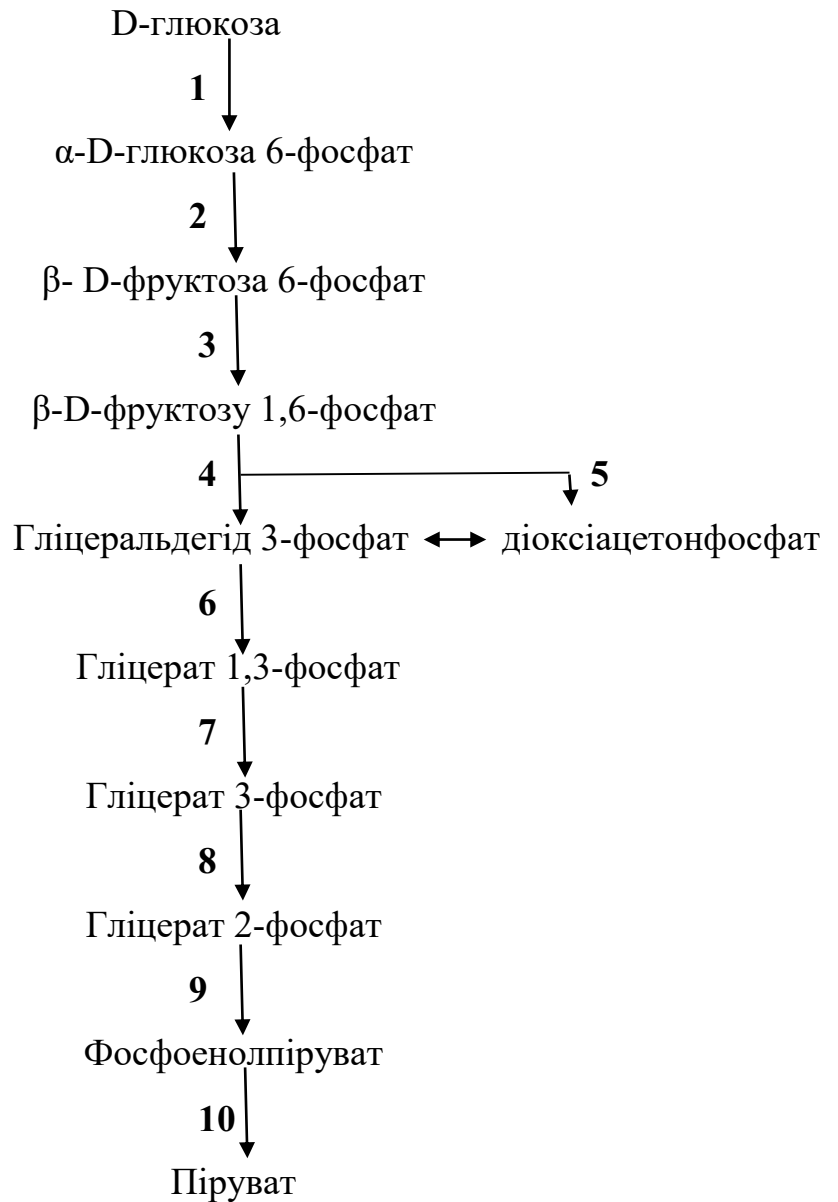


Рис 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса

Ферменти:

1 – глюкозоспецифічний фермент (КФ 2.7.1.69); **2** – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); **3** – фосфоглюкокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11); **4** – фруктозо-1,6-дифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); **5** – тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1); **6** – гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); **7** – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); **8** – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); **9** – енолаза (КФ 4.2.1.11); **10** – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

4.2. Біотрансформація ростового субстрату цільовий продукту.

Препарат фосфобактерин є продуктом на основі біомаси, тому для цього потрібен синтез всіх необхідних компонентів клітин: нуклеїнові кислоти, вуглеводи, білки та ліпіди.

Для препарату також потрібно насинтезувати всі необхідні амінокислоти. Попередниками амінокислот є: 2-оксоглутарат, оксалоацетат, 3-фосфогліцерат та пентозофосфатний цикл [7].

У пентозофосфатному циклі синтезуються такі амінокислоти: Гістидин, триптофан, фенілаланін та тирозин. Фенілаланін утворюється з феніл ацетату за допомогою префенатдегідратаза [КФ: 4.2.1.51] і в ході послідовних реакцій утворюється кінцевий продукт. З 2-оксалоацетату утворюється глутамат, глютамін, пролін та аргінін. З оксалоацетату утворюється аспартат, аспарагін, метіонін, лізин; 3-фосфогліцератат-серин, гліцин, цистеїн, валін, лейцин. Ключовими ферментами для синтезу триптофану є: 3-дезоксид-7-фосфогептулатсинтаза [КФ: 2.5.1.54], даний фермент перетворює хоризмат в антранілат, далі індол-3-гліцеролфосфатсинтаза [КФ: 4.1.3.27 4.1.1.48] каталізує перетворення антрамілат, у індол і кінцевою стадією є утворення триптофану. Потім 4-гідроксифенілацетил-КоА за допомогою 2-аміноадипат трансамінази [КФ: 2.6.1.57, 2.6.1.39, 2.6.1.27, 2.6.1.5] перетворюється у 4-гідроксифенілацетат, а він в свою чергу за допомогою префенатдегідрогенази (НАДФ +) [КФ: 1.3.1.13] в ході послідовних реакцій перетворюється у тирозин. Гістидин утворюється таким чином: фосфорибозилпірофосфат каталізується у фосфорибозил-АТФ, а він у свою чергу за допомогою у імідазолгліцерол. Гліцерат за допомогою гліцерат-2-хінази [КФ: 2.7.1.165] перетворюється в 3Р-Д-гліцерат, а він у свою чергу за допомогою фосфогліцератдегідрогенази [КФ: 1.1.1.95 1.1.1.399] перетворюється у 3Р-гідроксипіруват. Даний продукт каталізується і перетворюється у фосфосерин. Кінцева стадія - це утворення серину. Гліцин утворюється за такими етапами: бетаїнадегід за допомогою аспартат-альдегідегідрогенази

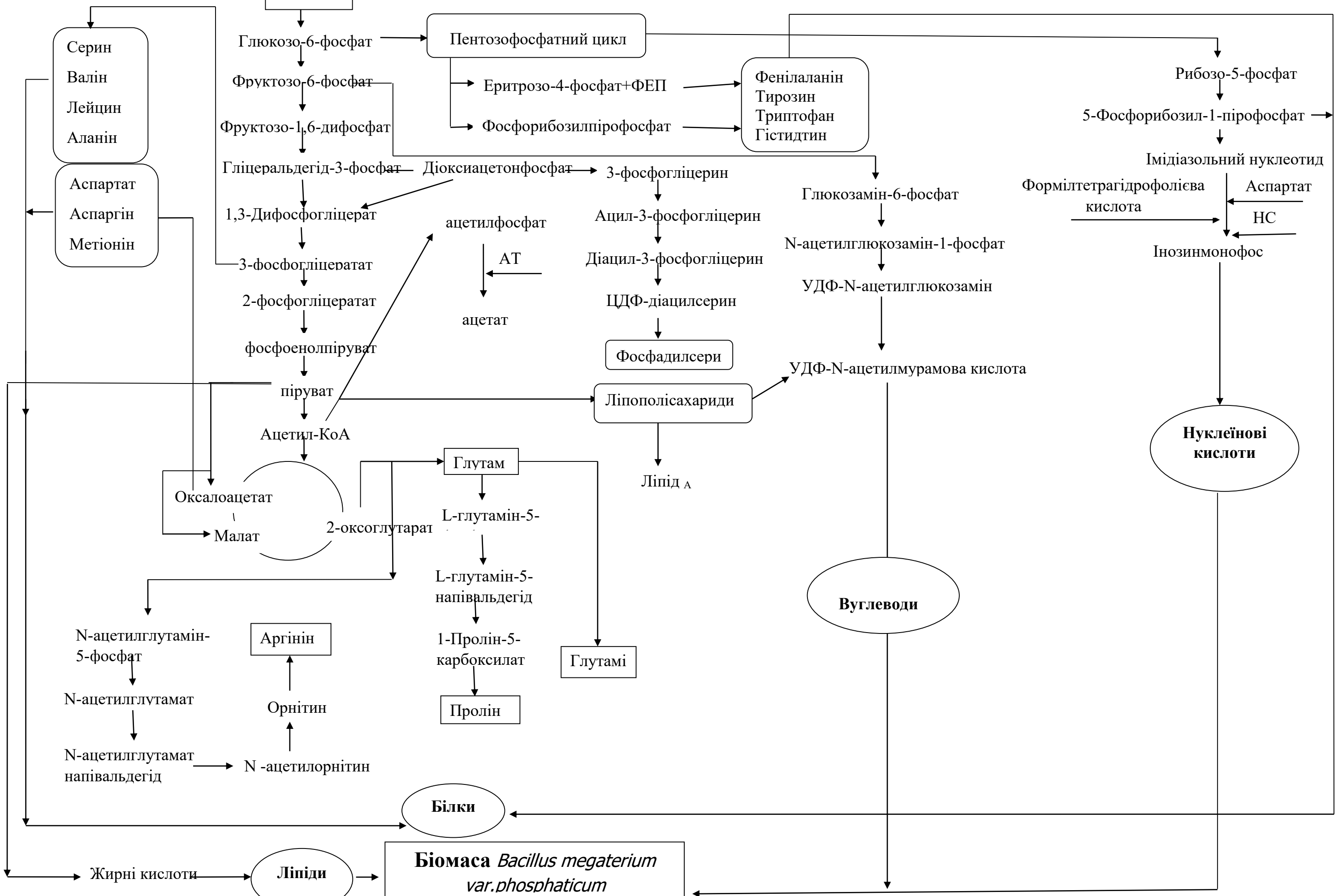
[КФ: 1.2.1.11] перетворюється у бетаїн, а він у свою чергу переходить у диметилгліцин, далі у саркозин, а останній в ході послідовних реакцій за допомогою треонинсинтази [КФ: 4.2.3.1] перетворюється у гліцин. L-аспартат перетворюється у L-4-аспартил-фосфат, каталізується у гомосерин, а він у треонін. Синтез жирних кислот проходить у такі етапи: з ацетил-КоА за допомогою АТФ утворюється малоніл-КоА, далі до ацетил-КоА приєднується ацильний білок і утворюється ацетилацильний протеїн. Після цього йде конденсація ацетил-КоА та малоніл-КоА. В ході реакцій утворюється ацетоацетил.

До складу фосфобактерину також входить фосфат. Його процес біосинтезу проходить у такі етапи: з ацетил-КоА за допомогою ортофосфату утворюється ацетил фосфат, а він в ході реакцій за допомогою АТФ утворюється ацетат. Тобто, всі ці складові дають наш продукт – фосфобактерин. Біомасу відділяють від культуральної рідини, руйнують клітини центрифугуванням та очищають кінцевий продукт.

Інформація щодо ключових ферментів та процесу біосинтезу наведена у додатку 1.

Наводимо схему біосинтезу біомаси

Схема трансформації препарату фосфобактерину на основі біомаси *Bacillus megaterium var. phosphaticum*



Ключові ферменти:

1. 2,3-бісфосфогліцерат-мутаза [КФ:5.4.2.11]
2. Гліцерат-2-хіназа [КФ: 2.7.1.165]
3. 2,3-бісфосфогліцерат-независимая фосфогліцерат мутаза [ЕС:5.4.2.12]
4. D-3-фосфогліцератдегідрогеназа [КФ: 1.1.1.95 1.1.1.399]
5. фосфосеринамінотрансфераза [КФ: 2.6.1.52]
6. L-сериндегідратаза [КФ: 4.3.1.17]
7. треоніндегідратаза [КФ: 4.3.1.19]
8. D-сериндегідратаза [Кф: 4.3.1.18]
9. бетаінальдегіддегідрогеназа [КФ: 1.2.1.8]
- 10.саркозооксидаза [КФ: 1.5.3.1]
- 11.гліцин-С-ацетилтрансфераза [КФ: 2.3.1.29]
- 12.аминометилтрансфераза [КФ: 2.1.2.10]
- 13.дигидролипоамиддегідрогеназа [КФ: 1.8.1.4]
- 14.гомосеринкіназа [КФ: 2.7.1.39]
- 15.L-2,4-діамінобутират декарбоксилаза [КФ: 4.1.1.86]
- 16.аспартат-альдегідегідрогеназа [КФ: 1.2.1.11]
- 17.треоніндегідратаза [КФ: 4.3.1.19]
- 18.треонинсинтаза [КФ: 4.2.3.1]
- 19.Ацетил-КоА карбоксилаза [КФ:6.4.1.2 6.3.4.142.1.3.15]
- 20.Карбоксилтрансфераза [КФ:6.4.1.22.1.3.15]
- 21.Карбоксилпротеїн [КФ:6.4.1.2 6.4.1.3 6.3.4.14]
- 22.S-малонілтрансфераза[КФ:2.3.1.39]
- 23.фосфатацетилтрансфераза [КФ:2.3.1.8]
- 24.ацтат-кіназа [КФ:2.7.2.1]
- 25.КФ 2.1.1.14-Метіонін синтаза
- 26.КФ 4.3.3.74-гідрокси-тетрагідродипіколінат
- 27.КФ 1.17.1.84-гідрокси-тетрагідродипіколінат редуктаза
- 28.КФ 2.3.1.89-Тетрагідродипіколінат N-ацетилтрансфераза
- 29.КФ 2.6.1.-Амінотрасфераза

- 30.КФ 3.5.1.47-N-ацетилдіамінопімелат деацетилаза
- 31.КФ 5.1.1.7-Діамінопімелат епімераза
- 32.КФ 4.1.1.20-Діамінопімелат декарбоксилаза
- 33.КФ 1.4.1.1-Аланін дегідрогеназа
- 34.КФ 2.2.1.6-Ацетолактат синтаза
- 35.КФ 1.1.1.86-Редуктоізомераза
- 36.КФ 1.1.1.86-Редуктоізомераза
- 37.КФ 4.2.1.9-Дигідроксидегідратаза
- 38.КФ 2.6.1.42-Амінотрансфераза
- 39.КФ 2.3.3.13-2-ізопропілмалат синтаза
- 40.КФ 2.7.1.71-ШикіMAT кiназа
- 41.КФ 2.5.1.19-3-фосфошикіMAT-1-карбоксивінілтрансфераза
- 42.КФ 4.2.3.5-ХоризMAT синтаза
- 43.КФ 5.4.99.5-ХоризMAT мутаза
- 44.КФ 4.2.1.51- дегідратаза

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1 Обґрунтування доферметаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Оптимальною температурою для культивування *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д є 31°C, оптимальне значення рН = 7,0±0,5, отже можливий ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому обов'язковою умовою є забезпечення асептичних умов культивування, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища та аераційного повітря. Для запобігання утворення контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск [7].

Згідно з викладеною інформацією, культивування *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д для одержання біопрепарату здійснюють при періодичному культивуванні глибинним методом. Незважаючи на суттєві переваги безперервного культивування перед періодичним, біосинтез продукту здійснюється у періодичному процесі через невеликі об'єми виробництва [12].

Тому при виборі безпосередньо ферментера необхідно враховувати ефективно перемішування і забезпечення гомогенізації середовища, тому потрібно використовувати мішалку з можливістю вибору швидкості обертання, також для уникнення застійних зон у ферментері необхідно в апараті встановити відбійники.

Оскільки, що оптимальна температура культивування дорівнює 31 °С, тому необхідно, щоб ферментер був оснащений нагрівальним елементом. Це може бути апарат обладнаний сорочкою [12, 13].

Існує багато типів ферментерів, як стандартних так і такі які робляться під замовлення, проте вони класифікуються згідно одних правил:

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Обґрунтування вибору технологічної схеми	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О.					32	17
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

1) За типом процесу: ферментери бувають без барботера (для анаеробів) та з барботером- для аеробних, зазвичай більшість стандартних ферментерів обладнуються барботером з системою включення і відключення подачі повітря, для більшої універсальності обладнання.

2) За типом введення енергії в ферментер: Барботажні (без мішалки лише барботажні) Лише з мішалкою (для анаеробних процесів), комбіновані (обладнані і мішалкою і барботером, Ерліфтні (з особливою конструкцією перемішувального пристрою), Роллерні (представляють собою пляшкоподібні ємності великою довжини, які обертаються між двома рухливими елементами-роликами), вони не знайшли широкого застосування оскільки придатні лише для культивування вірусів та клітин рослин та тварин та Трубочаті ферментери які представляють собою трубку з великим відношенням висота до діаметру, обладнанні специфічними перемішувальними пристроями. Такі ферментери використовують лише для культивування в'язких поживних середовищ.

Найбільш розповсюджені і універсальні - Барботажні, Ерліфтні та Комбіновані ферментери. Оскільки продуцент бактерія-аероб – лише барботажного ферментеру буде замало для гарної гомогенізації середовища киснем та іншими компонентами, що важливо для швидкого набору біомаси. Найбільш ефективними будуть Комбіновані та Ерліфтні, а оскільки Ерліфтні через складності виконання і специфічності конструкції перемішувального пристрою будуть на порядок дорожчі і складніші в обслуговуванні.

До того ж комбіновані ферментери є оптимальні для бактерій оскільки вони не примхливі до типу мішалок через високу стійкість до кутового зрізу. Тип мішалки буде обраний так аби забезпечити максимальну гомогенізацію середовища і швидкість перемішування.

Комбіновані апарати обов'язково мають барботер для подачі повітря, що вкрай важливо для культивування продуцента аероба. Тому потрібно обрати комбінований ферментер-біореактор з барботером і мішалкою.

Для вибору ферментера потрібно проаналізувати ринок ферментаційного обладнання, зважаючи на об'єм апарата дорівнює 400 л, оберемо ферментер

фірми ЮВС, з можливістю використання лінійки обладнання для масштабування процесу біосинтезу (рис. 5.1) [13]:



Рис.5.1. Ферментатор фірми ЮВС

Опис обладнання: сорочка з ізоляцією для термостатування і подачі пари; частини ферментера контактують з продуктом виготовлені з нержавіючої сталі 304; частини ферментера що не контактують з продуктом виготовлені з нержавіючої сталі 304; Система перемішування ферментера: вал з мішалкою, подвійне механічне ущільнення з паровим затвором, 4 відбійника, система контролю технологічних параметрів [13].

Запропонований апарат має високі технологічні характеристики, можна легко варіювати режими перемішування та масообміну, забезпечується рівномірний розподіл мікроорганізмів та компонентів поживного середовища.

Також він має барботер для подачі стерильного стисненого повітря та систему індивідувальних фільтрів, оскільки *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д є аеробом, даний ферментер оснащений точним контролем концентрації кисню за допомогою сучасного електронного обладнання – контролерів і датчиків [25, 26].

Конструкція повністю герметична та потрапляння атмосферного повітря в апарат не можлива, що є дуже важливим для забезпечення асептичних умов культивування [12, 13].

5.1.2 Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Обраний продуцент є аеробом і потребує постійного надходження кисню при культивуванні, що змушує реалізувати стадію підготовки аераційного повітря [23].

Для аерації у процесі культивування, повітря, яке використовується має бути обов'язково стерильним та мати можливість вибору температури культивування [24].

Одним з найпростіших способів стерилізації повітря є фізичне видалення мікроорганізмів шляхом фільтрації через волокнисті або мембранні фільтри. Даний процес підготовки очищеного аераційного повітря включає декілька стадій:

- забір повітря з атмосфери;
- попереднє очищення;
- стиснення повітря;
- стабілізацію термодинамічних показників;
- очищення на головних та індивідуальних фільтрах.

Саме за такого способу очищення вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999%. У результаті попереднього очищення аераційного повітря, яке відбувається на фільтрах грубого очищення, вдається отримати повітря зі ступенем чистоти 80%. Проте очищення на головних фільтрах дає змогу отримати повітря з 95-99% ступенем чистоти, а на індивідуальних – 99,9999% [23].

Для фільтрів грубої очистки повітря матеріалом може служити базальтове грубе волокно, поліпропілен, скловата, полівінілхлорид, лавсан, та ін. Крім цього використовують металокерамічні фільтри з нержавіючої сталі та титану, які є найбільш ефективними (90–95 %), оскільки мають здатність витримувати температуру до 700 °С, зі швидкістю фільтрування 0,1 м/с.

У даному проекті нами запропоновано використовувати фільтри грубого очищення типу ФЯП [23].

ФЯП представляють собою коміркові повітряні фільтри, що призначені для очищення повітря від пилу в різних технологічних системах, ступінь очищення повітря якими становить близько 80 %.

Запропоновані фільтри складаються з металевого каркасу, в який вставляють касети з скловолокна. При цьому продуктивність кожного фільтру не більше 1530 м³/год. З метою збільшення продуктивності фільтрів до необхідної величини, каркаси фільтрів скручують між собою і встановлюють в загальну панель.

Для індивідуального очищення повітря використовується індивідульний мембранний фільтр Microfluor II [23, 24], який виготовляється у вигляді фільтропатронів і капсул та дає можливість застосовувати різні технологічні рішення.

Даний фільтр забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм, тому його встановлюють перед кожним інокулятором та виробничим ферментером. В результаті отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99,9999 %.

Специфічною вимогою, що пред'являються до фільтруючих матеріалів, що застосовуються на даній стадії очистки, є необхідність їх періодичної стерилізації гострою парою температури 145 °С разом з усім обладнанням технологічної лінії при [24].

Стерилізація повітря, що виходить з ферментера - це одна з основних стадій технологічного процесу біосинтезу, тому що повітря, що видаляється з ферментера, містить велику кількість мікроорганізмів та високу вологість. Для відділення вологи використовують жалюзійні конструкції, що відрізняються низьким гідравлічним опором. Досить ефективні при цьому тканинні сітки з нержавіючого матеріалу або термостійкого пластику. В результаті чого на них сепарується близько 99% вологи.

Отже, характеристика та будова фторопластових фільтрів повністю задовольняє дане біотехнологічне виробництво та забезпечує стерильність аераційного повітря [19-24].

5.1.3 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору миючих та /або дезінфікуючих засобів

Виробництво препарату фосфобактерин *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* ВКМ В-2357 Д здійснюється упродовж 100 днів.

Для того, щоб обрати миючий та/або дезінфікувальний засіб, необхідно знати загальну площу миття, концентрацію робочого засобу та його витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Окрім цього слід звернути увагу і на саму вартість цих засобів [63].

Наступним етапом необхідно розрахувати витрати мийних та/або дезінфікуючих засобів. Приблизно на 1 м² витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502). Прийmemo, що обладнання та комунікації потрібно мити перед кожним виробничим циклом, тобто 38 разів (див. вище); підлога миється кожного робочого дня, тобто 100 разів (див. вище); а стіни, вікна та двері – раз на місяць (3 раз). Загальна площа оброблюваних об'єктів за весь період виробництва вказана у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва фосфобактерину

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)
Обладнання, інвентар, комунікації*	900	38	34200
Підлога**	120	100	12000
Стіни, двері, вікна**	70	3	210

Примітка: * – загальний об'єм обирається як сума всіх об'ємів ємнісного обладнання; ** – розрахунок загальної площі миття проведений на основі даних, наведених у табл. 5.1.

Рекомендується чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1–3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів.

Миючі та дезінфікуючі засоби слід контролювати на мікробіологічну чистоту. Їх розчини потрібно зберігати у попередньо очищеній тарі та суворо дотримуватись строків зберігання. Дезінфікуючі засоби мають відповідати таким вимогам: володіти бактерицидною дією, бути хімічно стійкими та не ушкоджувати поверхні обладнання. До мийних засобів висуваються інші вимоги, а саме: повинні виявляти високу мийну здатність, забезпечувати повне змочування поверхонь із різних конструкційних матеріалів, пом'якшення жорсткої води, забезпечувати повне видалення механічного, білкового та жирового забруднень шляхом їх диспергування та емульгування, забезпечувати нейтралізувати кислі забруднення та омилення жирів (для лужних мийних засобів) та виявляти низьку агресивність щодо конструкційних матеріалів, які використовують для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю [66].

Миття ємнісного обладнання проводиться методами циркуляції робочого розчину в системі (CIP – мийка), заповнення резервуара (біореактора) робочим розчином засобу складатиме близько половини кожного з відповідним об'ємом обладнання [67].

Дезінфекцію зовнішніх поверхонь проводять шляхом нанесенням або розпилення робочого розчину дезінфікуючого засобу на поверхню обладнання. Тривалість контакту дезінфікуючого засобу з поверхнею повинна складати не менше 20 хв. Після закінчення обробки залишки засобу змивають і промивають устаткування водою.

Як мийні засоби використовують лужні (кальцинована сода, каустична сода) та кислотні (азотна, фосфорна, соляна, оцтова, сульфамінова кислоти) мийні засоби, а також мийні засоби на основі синтетичних поверхнево–активних речовин (синтетичні порошки типу А, Б, В) і мийні засоби з протеолітичними ферментами («Біомой») [66].

Проаналізувавши вітчизняний ринок миючих та дезінфікуючих засобів слід звернути на ефективні, порівняно дешеві та найбільш вживані, серед таких

засобів слід виділити каустичну і кальциновану соду, «Біомой», «Гембар», «Хлорантоїн» та «Дезактін» .

«Біомой» – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом (ТУ У 22902465.005–96). Рекомендований Міністерством здоров'я України.

Препарат являє собою порошок, світлих тонів (допускається присутність забарвлених включень ензимів). Добре розчиняється у воді (розчинність не менше 30 г/дм³); робочі розчини Біомою безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково–жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Не сумісний з катіонами поверхнево–активних речовин.

Для приготування робочого розчину Біомою використовується концентрація 0,15–0,5%. Робочий розчин Біомою готують у тарі будь–якого матеріалу шляхом розчинення у питній [68].

Для проведення дезінфекційних заходів використовують дезінфекційні засоби, що містять в якості активно діючої речовини (АДР) окислювачі (перекис водню), глутаровий альдегід (корзолін іД), глутаровий альдегід у суміші з четвертинними амонійними сполуками (деконекс 50 ФФ), похідні гуанідину (гембар), та мийно–дезінфекційні засоби, які містять в якості АДР хлорпохідні гідантоїну (дезактін, хлорантоїн) [60].

Гембар – дезінфекційний засіб виробництва фірми НВЦ "Біоцид" (Україна). В якості АДР містить полігексаметиленгуанідин фосфат. Являє собою безбарвну або жовтувату прозору рідину. Не має запаху. Добре розчиняється у воді. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, полімерних матеріалів та гуми. Після висихання розчину на оброблених поверхнях утворюється плівка.

Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007), не подразнює шкіру, не виявляє шкіряно-резорбтивних, сенсibiliзуючих, кумулятивних, мутагенних та канцерогенних властивостей. Подразнює слизову оболонку очей [68].

«Дезактін» – дезінфекційний засіб, що використовується для очищення і дезінфекції та одночасного миття твердих поверхонь приміщень, предметів та обладнання і комунікацій.

«Дезактін» являє собою порошок від білого до жовтуватого кольору з помірним запахом хлору. Розчинність у воді становить не менше 20 мг/дм³. Водні розчини прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Робочі розчини засобу не пошкоджують об'єкти, які виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни і устаткування з лакофарбовим, гальванічним та полімерним покриттям, не фіксують білкові забруднення на поверхні обладнання, добре змиваються, не залишають нальоту [66].

«Хлорантоін» – хлорактивний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом стабільний при зберіганні протягом 3-х років (ТУ У 22902465.004-95). Препарат являє собою: сипучий порошок, світлих тонів зі слабким запахом хлору. Розчинність у воді - не менше 20 г/дм³. Водні розчини Хлорантоїну прозорі, безбарвні, мають слабкий запах хлору. Допускається помірна опалесценція водних розчинів Хлорантоїну.

Спектр антимікробної дії: Хлорантоін має бактерицидні, туберкульозні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної респіраторно-синцитіальних, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні та фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) властивості.

За дезінфікуючою активністю Хлорантоін перевищує в 5-10 разів звичайні дезінфікуючі засоби та виключає застосування лужних миючих засобів. Використання Хлорантоїну дозволяє поєднати в одній операції стадії миття, дезінфекції та предстерилізації, скоротити тривалість санітарної обробки [68].

Таблиця 5.2

Узагальнена характеристика витрат мийних та/або дезінфікуючих засобів для виробництва фосфобактерину

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л (кг) мийного або дезінфікуючого засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн	Джерело (1, 2, 3,4,5)*
Біомой	Обладнання, інвентар, комунікації	0,3	34200	102,6	34	3488,8	1
«Гембар»		0,5	34200	171	25	4257,0	2
Каустична сода		2,0	34200	17100	11	188100	3
«Дезактін»	Стіни, вікна, двері, підлога, тара, інвентар,	0,2	12210	24,42	135	3296,7	1
«Гембар»		1,0	12210	122,12	25	3053	4
Хлорантоїн		0,2	12210	24,42	70	1704,9	5

Примітка: * – ціни наведено станом на січень 2020

Варто відмітити, що усім засобам притаманні як високі миючі, так і дезінфікуючі властивості. Також слід зазначити, що Хлорантоїн та Біомой належать до 4 класу небезпеки, а це дозволяє їх використовувати у присутності персоналу, який не причетний до прибирання. А от каустична сода належить до речовин 2 класу небезпеки.

Перевагами усіх вище зазначених дезінфікуючих засобів є стабільність при зберіганні, зручне приготування робочих розчинів, повний спектр знезаражуючої дії, екологічна безпека та легкість змивання з поверхонь. Але при виборі дезінфікувальних засобів увагу слід звертати також і на їх вартість.

Отже, проаналізувавши вище згадані дані, наведені у табл. 5.2, можна зробити такі висновки:

- задля забезпечення відповідної чистоти повітря обираємо періодичність ввімкнення бактерицидних ламп: 1 год після кожного генерального прибирання, та 35 хв після кожного робочого дня[28].

- для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей – «Хлорантоїн», оскільки він є мийно-дезінфікувальним засобом, що дає змогу заощадити кошти, але слід змінювати засоби раз на 3 місяці на Біомой і Дезактін, щоб запобігти виникнення резистентності мікроорганізмів.

- миття ферментерів та реакторів буде проводитися з використанням СІР-системи, оскільки вона дає перевагу перед ручною мийкою у використанні меншої кількості робочого розчину і якості мийки.

5.1.4 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальна концентрація біомаси при культивуванні *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д досягається за умов росту на середовищі наступного складу (г/л): Глюкоза – 20; NH₄Cl – 13; MgSO₄·7H₂O – 0,1; NaCl – 0,2; MnSO₄ – 0,001; FeSO₄*7H₂O – 0,001.

Враховуючи різні режими та умови стерилізації компонентів поживного середовища, будемо готувати та змішувати речовини для вирощування інокуляту в колбах на качалках умовно розділивши їх на такі композиції:

Композиція А: глюкоза, даний компонент будемо готувати окремо, оскільки глюкоза є термолабільним компонентом (режим стерилізації: 112 °С, тиск – 0,05 МПа упродовж 30 хв)

Композиція В: NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , MnSO_4 та $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ будемо стерилізувати разом, оскільки вони не взаємодіють між собою та мають однаковий режим стерилізації (131 °С, тиск – 0,15 МПа упродовж 40 хв);

Всі композиції стерилізують в автоклаві в окремих колбах, тому для стерилізації компонентів обираємо автоклав з вертикальним завантаженням, об'ємом 10 л. куди завантажуються по черзі колби з композиціями. Після закінчення процесу стерилізації всі компоненти поживного середовища охолоджують і зливають в стерильних умовах (в боксі) в одну колбу (V колби = 3 л).

При підготовці та стерилізації поживного середовища для культивування інокуляторі та ферментері, необхідно здійснювати приготування поживних середовищ у спеціальних реакторах (збірниках), обладнаних мішалками, при цьому стерилізацію проводять у збірниках та в підготовленому простерилізованому ферментері.

Для виробничого культивування *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д використовують середовище такого складу що й середовище в колбах, а саме, (г/л): Глюкоза – 20; NH_4Cl – 13; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaCl – 0,2; MnSO_4 – 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001. [48].

Основну частину поживного середовища (**композиція А**) потрібно готувати у збірнику, а стерилізувати у ферментері. Спочатку глюкозу розчиняють у питній воді в збірнику ретельно перемішують та перекачують за допомогою насосу у стерильний ферментер і проводять стерилізацію. Спочатку обов'язково подають глуху пару в сорочку, щоб прогріти конструкцію ферментера, а потім подають гостру пару в середину ферментера і стерилізують при температурі 112 °С (0,05 МПа) упродовж 30 хв [62];

Композицію В готують і стерилізують у збірнику при постійному перемішування, для цього на електронних вагах по черзі зважують

компоненти композиції. Наважки переносять у збірник та додають питної води, ретельно перемішують мішалкою. Стерилізують композицію В з помірним перемішуванням, подаванням глухої пари у сорочку. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С при тискові 0,15 МПа упродовж 40 хв. Композицію охолоджують та подають у асептичних умовах безпосередньо у ферментер через гребінку, де знаходиться простерилізована композиція А [48].

5.2 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

5.2.1 Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Для відділення супернатанту від біомаси яка необхідна при подальших процесах одержання препарату, існує багато способів і апаратів. Одними з найбільш розповсюджених способів є сепарація, центрифугування, ультрафільтрація[26].

Центрифугування. Даний спосіб дуже ефективний для відділення біомаси клітин бактерій та дріжджів, або інших одноклітинних організмів, оскільки для реалізації цього способу суспензійна культура піддається великому навантаженню відцентрової сили, при якому відділяються тверді часточки від рідини. В залежності від процесу центрифуги поділяються на проточні, фільтраційні та декантантні [28].

Фільтраційні центрифуги призначені для відділення твердих часточок та розділення таким чином суспензій на водну фазу та концентрований твердий фугат (рис 5.3)

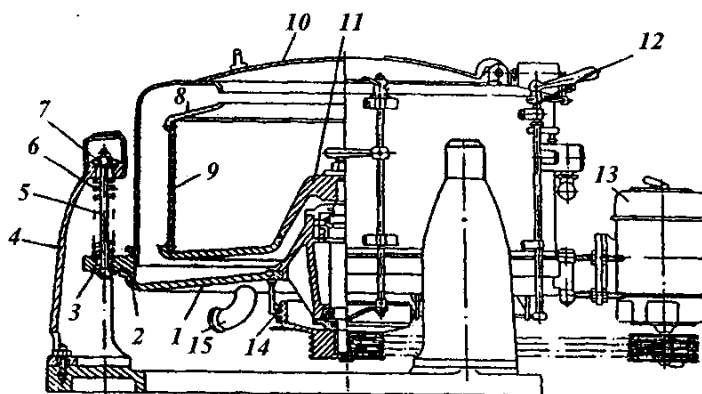


Рис. 5.3. Фільтраційна центрифуга.

1 - корпус; 2 - приливи; 3,7 - сферичні головки; 4 - колона;
 5 - підвіс; 6 - пружина; 8 - барабан; 9 - фільтрувальна поверхня; 10 - кришка; 11 - ступиця барабана; 12 - рукоятка механізму гальмування; 13 - електродвигун; 14 - гальмо; 15 - патрубок.

Основна перевага такої конструкції центрифуги це високий фактор розділення та маленькі втрати твердої фази при розділенні. Недолік, як і усіх центрифуг вертикальної будови є низька продуктивність процесу [3].

Проточна центрифуга на відміну від фільтраційної володіє найменшими габаритам та найвищою продуктивністю (рис 1.2), яка забезпечується принципом дії, коли рідина-суспензія розділяється в протоці по ходу руху рідини через неї, однак даний тип центрифуг володіє дещо меншим фактором розділення і до того ж має найбільш високу вартість у порівнянні з попередньою. Оскільки вона є ефективною для великотоннажних об'ємів продукту, її використання для невеликих кількостей, наприклад для відділення біомаси пробіотичних штамів у кількості до 100 л культуральної рідини за цикл не є рентабельним [36].

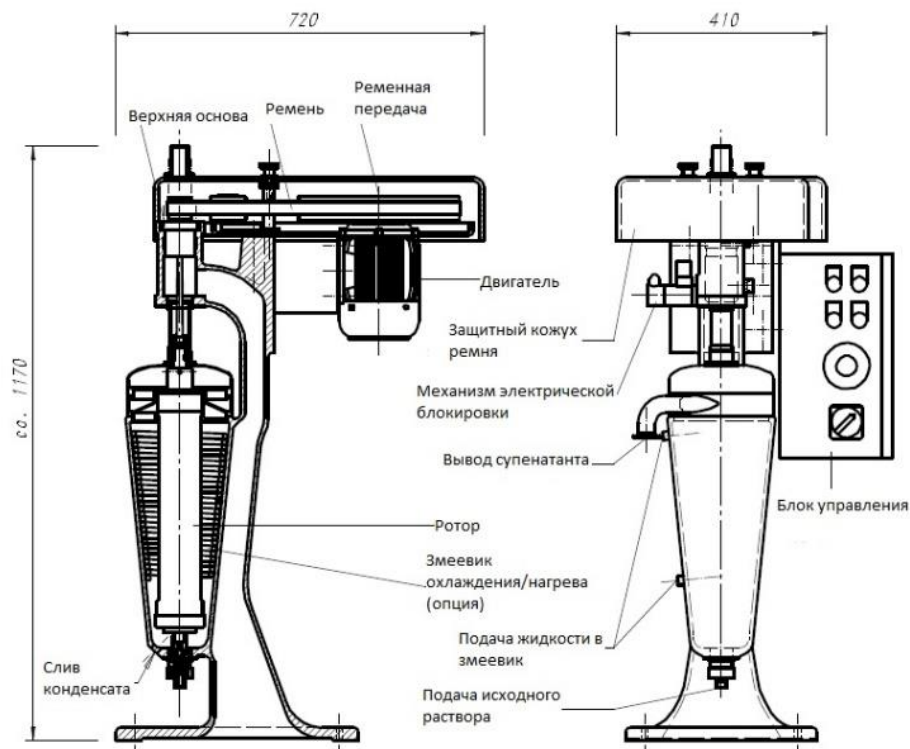


Рис 5.4. Проточна центрифуга [36].

Горизонтальна (декантантна) центрифуга (рис 5.5) характеризується великими габаритами та високою продуктивністю, однак має вкрай низький фактор розділення і застосовується для розділення суспензій з часточками не менше 10-20 мкм, а оскільки клітини бактерій у десятки разів менші застосування такої центрифуги є не вигідним через високу собівартість і великі втрати біомаси під час розділення спричинені низьким фактором розділення.

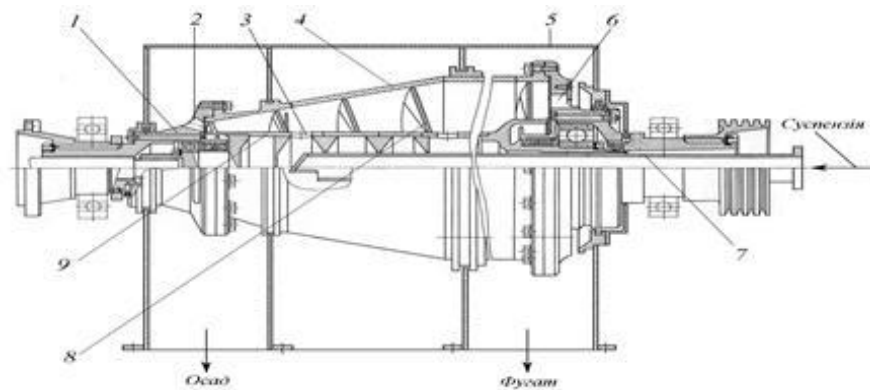


Рис 5.5. Декантантна центрифуга

Центрифуга неперервної дії зі шнековим вивантаженням осаду: 1-цапфа; 2, 3, 6 - отвори; 4- ротор; 5- кожух; 7- труба для подачі суспензії; 8- шнек; 9- циліндрична основа шнека

Метод розділення під назвою сепарація виконується на відповідних установках- сепараторах , апарати схожі за будовою на центрифуги однак з додатковими конструктивними деталями – тарілками, які збільшують фактор розділення і підвищують продуктивність процесу [37].

Сепаратори (рис 5.6.) зазвичай містять 20-50 тарілок, що дозволяє розділити суспензії з розміром часточок до 3-5 мкм. Однак сепаратори володіють однією особливістю, яка призводить до великих втрат біомаси мікроорганізмів при її відділення або часточок суспензії, якщо вони менше 3-5 мкм оскільки фактор розділення сепаратора недостатній для ефективного відділення таких часточок, що збільшує кількість води (дисперсійного середовища) у твердій (важкій фазі) відділеній сепаратором, до того ж

сепаратор має дуже високу продуктивність, що непотрібно при малотоннажних виробництвах, як у нашому випадку[38].

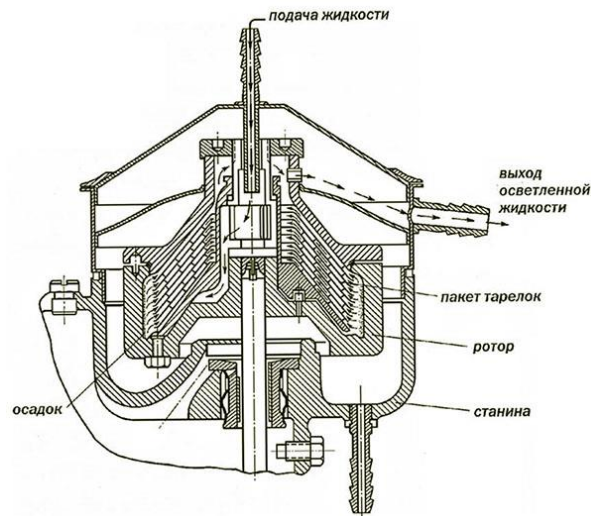
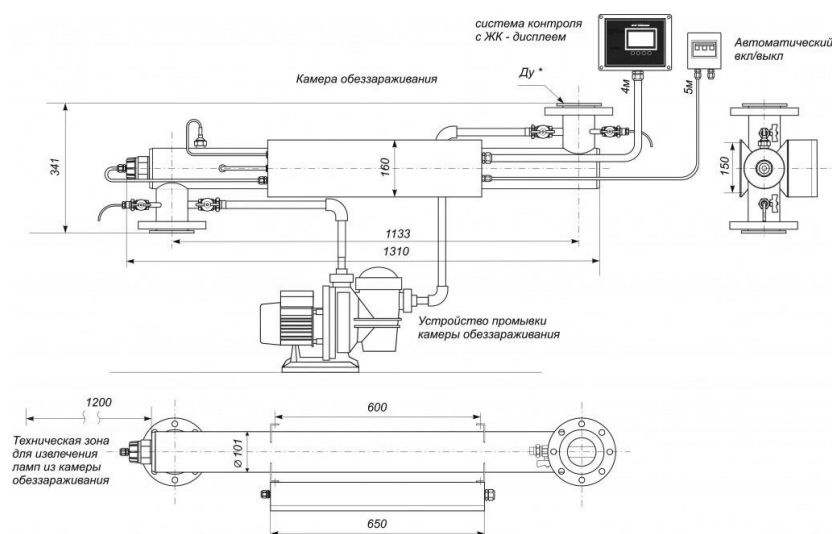


Рис.5.6. Будова сепаратора [38].

Ультра-фільтраційна установка (рис 5.7) представляє собою комплексну установку, в яку входять насоси та фільтри з певним діаметром пор. Діаметр пор можна підібрати таким чином, щоб розділення біомаси і рідини становила до 95 -99 % , що зменшить втрати до мінімуму, однак при використанні ультрафільтраційної установки при відділенні біомаси необхідно буде постійно міняти фільтр-картриджи та обслуговувати насоси, оскільки швидкість фільтрування буде вкрай низька і насоси потребуватимуть періодичної чистки. Тому даний тип відділення біомаси не підходить[39].



* Ду присоединения выполняется на основании технического задания заказчика. Базовое значение - Ду 80

Конструкция оборудования постоянно модернизируется, возможны изменения без ухудшения качественных показателей.

Рис.5.7. Ультрафільтраційна установка [39].

Обираємо для відділення біомаси *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д на проточній центрифугі, за оскільки даний тип установки володіє наступними перевагами:

-Високий фактор розділення

-Низькі втрати біомаси

Центрифуга найбільший фактор розділення що досить необхідно для відділення біомаси бактерій, що характеризує високу ефективність розділення біомаси, особливо це важливо для клітин які мають розміри 0,5-0,1 мкм мкм у конкретному випадку бактеріальні клітини мають розмір 0,1-0,2 мкм отож фільтрувальна центрифуга буде ефективною. Однак при досить великих кількостях біомаси процес суттєво зменшить швидкість розділення, однак це буде компенсуватися низькими втратами біомаси при виділенні.

5.2.2 Обґрунтування способу приготування напівпродукту

Відомо що, фосфобактерин може застосовуватись у двох формах: розфасована в поліетиленові пляшки культуральна рідина *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д та гелеподібна маса бактерій *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д розфасована в каністри.

Перший спосіб приготування нерозфасованого продукту є досить простим та дешевим в плані економічної доцільності, але має суттєвий недолік – невеликий термін придатності 6 міс при температурі не вище 15 °С.

Нерозфасований продукт у вигляді гелю має складніший процес отримання напівпродукту, але готовий продукт має збільшений термін зберігання (12 міс) та не потребує особливий умов зберігання (не вище 30 °С), тому слід звернути увагу на отримання Фосфобактерину у вигляді гелю, оскільки це збереже якість продукту при можливих проблемах з дистрибуцією даного продукту.

Отримання Фософобатерину у вигляді гелю відбувається за наступною технологією: відділену біомасу переносять у реактор в додають воду очищену в кількості вказаний в технологічному регламенті та ретельно перемішують за допомогою перемішуючого пристрою. Далі до реактора порційно додають

гелеутворювач – Na – Карбоксиметилцелюлозу з розрахунку вказаному у регламенті та перемішують до отримання однорідного гелю.

5.2.3. Обґрунтування стадії пакування готового продукту

Оскільки даний продукт пропонується для обробки сільськогосподарських угідь, тому при фасуванні слід врахувати вид і об'єм первинної тари. серед проаналізованих пакувальних матеріалів слід звернути увагу на фасування у поліетиленові каністри (рис.5.8.).



Рис.5.8. Фасування готового продукту .

Поліетиленові каністри – це найбільш дешевий пакувальний матеріал та в основному використовується рідких матеріалів. перевагою такого типу первинної упаковки є довготривале зберігання продукту після відкриття та повторне використання тари.

Коробки досить зручний тип первинної упаковки однак він найбільш нестійкий до пошкоджень, та використовується здебільшого або для маленьких порцій продукту, або для дуже великих

Картонні круглі короба- найбільш зносостійкий вид упаковки однак він придатний тільки для великих фасовок продукту.

Обираємо ПЕТ-мішки як тип первинної упаковки, оскільки він є найбільш недорогим, зносостійким та може бути адаптований під будь який тип фасовок незалежно від розміру і типу продукту у вигляді гранул або порошку[28].

РОЗДІЛ 6. МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС І РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ

Продуктовий розрахунок включає в себе розрахунок кількості компонентів поживного середовища та води для їх розчинення у відповідності із вибраним складом поживного середовища.

Початкові дані для розрахунку наведені нижче:

Gпр - потужність виробництва в тонах на рік. т/рік;	9855
Трд - кількість робочих днів у рік;	100
Тст - стандартний титр клітин у продукті, кл/мл	$2,0 \cdot 10^{10}$
Ткр - титр клітин у культуральній рідині кл.'мл	$1,8 \cdot 10^9$
Рзк - густина біомаси, кг/м ³	990
Тцф - час циклу роботи ферментера, год	48
Есв - сумарні втрати активності при виділенні готового продукту, частка (ОД - 0.45)	0,1

1. Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів)

1.1. Кількість продукту на добу, кг /добу

$$G_d = G_{пр} / T_{рд} \quad G_d = 9,855$$

1.2. Кількість продукту на добу у врахуванням втрат за виробничий цикл (Есв). кг

$$G_{пд} = G_d / (1 - E_{св}) \quad G_{пд} = 10,95$$

1.3. Кількість продукту за цикл ферментації кг/цикл

$$G_{цк} = G_{пд} \cdot T_{цф} / 24 \quad G_{цк} = 21,9$$

1.4. Кількість ферментації (циклів) на рік

$$N_{цк} = G_{пр} / G_{цк} \quad N_{цк} = 450$$

1.5. Об'єм КР. що зливається за одну ферментацію (цикл), м³

$$V_{кр} = G_{цк} \cdot T_{ст} / (P_{зк} \cdot T_{кр}) \quad V_{кр} = 0,245$$

1.6. Вихід продукту у кг з 1 м³ культуральної рідини. кг/м³

$$q_{ват} = G_{цк} / V_{кр} \quad q_{ват} = 89,4$$

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Матеріальний баланс і розрахунок обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О					50	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

2. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу.

2.1. Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у виробничому ферментері з врахуванням втрат при біосинтезі, частка, $E_f = 0,1$ складе

$$V_f = V_{кр} / (1 - E_f) = 245 / (1 - 0,1) = 272 \text{ л.}$$

2.2. Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера, л

$$V_{псф} = V_f / (1 + X_f) = 272 \text{ л} / (1 + 0,1) = 247,3 \text{ л}$$

2.3. Витрати посівного матеріалу на засів виробничого ферментера

$$V_{пмф} = V_f - V_{псф} = 272 \text{ л} - 247,3 \text{ л} = 24,7 \text{ л}$$

2.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера

2.4.1. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{псф}$ складуть,:

$$G_f = V_{псф} \times C_{\Sigma ф} = 247,3 \times 33,3 / 1000 = 8,23 \text{ кг, в тому числі:}$$

- 1) Глюкоза – $C_1 = 20$; $G_1 = G_f \times C_1 / C_{\Sigma ф} = 8,23 \times 20 / 33,3 = 4,94 \text{ кг.};$
- 2) NH_4Cl – $C_2 = 13$; $G_2 = G_f \times C_2 / C_{\Sigma ф} = 8,23 \times 13 / 33,3 = 3,24 \text{ кг.};$
- 3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $C_3 = 0,1$; $G_3 = G_f \times C_3 / C_{\Sigma ф} = 8,23 \times 0,1 / 33,3 = 0,02 \text{ кг.};$
- 4) NaCl – $C_4 = 0,2$; $G_4 = G_f \times C_4 / C_{\Sigma ф} = 8,23 \times 0,2 / 33,3 = 0,04 \text{ кг.};$
- 5) MnSO_4 – $C_5 = 0,001$; $G_5 = G_f \times C_5 / C_{\Sigma ф} = 8,23 \times 0,001 / 33,3 = 0,0002 \text{ кг.}$
- 6) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $C_6 = 0,001$; $G_6 = G_f \times C_6 / C_{\Sigma ф} = 8,23 \times 0,001 / 33,3 = 0,0002 \text{ кг.}$

2.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{вф} = V_{псф} - G_f - V_{фк}$, де $V_{фк} = V_{псф} \times K_{кон}$ – розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{кон}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища. В залежності

від способу та обладнання, яке використовують для стерилізації компонентів поживного середовища, величина $K_{\text{кон}}$ може складати:

– при стерилізації компонентів у колбах в автоклаві $K_{\text{кон}} = 0$

– при стерилізації компонентів безпосередньо у реакторі – змішувачі або безпосередньо у ферментері $K_{\text{кон}} = 0,1-0,15$

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{\text{псф}}=247,3$ л;

Тоді кількість конденсату становитиме $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \times K_{\text{кон}} = 247,3 \times 0,1 = 24,73$ л ; Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 247,3 - 8,23 - 24,73 = 214,34$ л

Наступним етапом необхідно розрахувати кількість води для приготування та стерилізації кожної композиції:

Композиція А (глюкоза) у реакторі-змішувачі з урахуванням утворення конденсату.

Розрахуємо об'єм композиції А:

$$V_{\text{кА}} = V_{\text{псф}} \times (C_1 / C_{\Sigma\text{ф}}) = 247,3 \times (20/33,3) = 148,5 \text{ л}$$

Розрахуємо необхідний об'єм композиції А з врахуванням утворення конденсату при стерилізації (10%):

$$V_{\text{кон}} = 148,5 \times 0,1 = 14,85 \text{ л}$$

Необхідна кількість води для приготування композиції А становить:

$$V_{\text{вкА}} = V_{\text{кА}} - G_1 - V_{\text{кон}} = 148,5 - 4,94 - 14,85 = 128,71 \text{ л.}$$

Композиція В у реакторі-змішувачі з урахуванням утворення конденсату.

Розрахуємо об'єм композиції В:

$$V_{\text{кС}} = V_{\text{псф}} \times (C_2 + C_3 + C_4 + C_5 + C_6 / C_{\Sigma\text{ф}}) = 247,3 \times (13,3/33,3) = 98,7 \text{ л}$$

Розрахуємо необхідний об'єм композиції В з врахуванням утворення конденсату при стерилізації (10%):

$$V_{\text{кон}} = 98,7 \text{ л} \times 0,1 = 9,87 \text{ л}$$

Необхідна кількість води для приготування композиції В становить:

$$V_{\text{вкС}} = V_{\text{кС}} - (G_2 + G_3 + G_4 + G_5 + G_6) - V_{\text{кон}} = 98,7 \text{ л} - 3,29 - 9,87 = 85,54 \text{ л.}$$

Формування композицій А, В (табл.6.1.):

Таблиця 6.1

Склад поживного середовища для основної ферментації (400л)

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 247,3 л середовища, кг (л)	Композиція	Кількість конденсату	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	4,94	А	14,85	148,5
Вода		128,71			
NH ₄ Cl	13	3,24	В	9,87	98,7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,02			
NaCl	0,2	0,04			
MnSO ₄	0,001	0,0002			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	0,0002			
Вода		85,54			

3. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для інокулятора.

3.1. Об'єм готового поживного середовища та посівного матеріалу у інокуляторі з врахуванням втрат при біосинтезі, частка, Eф = 0,1 складе

$$V_{ін} = V_{пмф} / (1 - Eф) = 24,7 / (1 - 0,1) = 27,4 \text{ л.}$$

3.2. Об'єм готового поживного середовища для інокулятора, л

$$V_{псін} = V_{ін} / (1 + Xф) = 27,4 \text{ л} / (1 + 0,1) = 24,9 \text{ л}$$

3.3. Витрати посівного матеріалу на засів інокулятора, л

$$V_{пмін} = V_{ін} - V_{псін} = 27,4 \text{ л} - 24,9 \text{ л} = 2,5 \text{ л}$$

3.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища інокулятора

3.4.1. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для інокулятора загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища Vпсін складуть,:

$$G_{ін} = V_{псін} \times C_{\Sigma ін} = 24,9 \times 33,3 / 1000 = 0,82 \text{ кг, в тому числі:}$$

- 1) Глюкоза – C1=20; G1 = G_{ін} × C1 / C_{Σ ін} = 0,82 × 20 / 33,3 = 0,49 кг.;
- 2) NH₄Cl – C2 =13; G2 = G_{ін} × C2 / C_{Σ ін}, = 0,82 × 13 / 33,3 = 0,32 кг.;
- 3) MgSO₄·7H₂O – C3 =0,1; G3 = G_{ін} × C3 / C_{Σ ін} = 0,82 × 0,1 / 33,3 = 0,002 кг.;

- 4) $\text{NaCl} - C_4 = 0,2$; $G_4 = G_{\text{ін}} \times C_4 / C_{\Sigma\text{ін}} = 0,82 \times 0,2 / 33,3 = 0,004$ кг.;
- 5) $\text{MnSO}_4 - C_6 = 0,001$; $G_{\text{ін}} = G_{\text{ф}} \times C_6 / C_{\Sigma\text{ін}} = 0,82 \times 0,001 / 33,3 = 0,00002$ кг.
- 6) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - C_7 = 0,001$, $G_7 = G_{\text{ін}} \times C_7 / C_{\Sigma\text{ін}} = 0,82 \times 0,001 / 33,3 = 0,00002$ кг.

3.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для інокулятора

Кількість води визначають за наступною формулою $V_{\text{ін}} = V_{\text{псін}} - G_{\text{ін}} - V_{\text{інк}}$, де $V_{\text{інк}} = V_{\text{псін}} \times K_{\text{кон}}$ – розбавлення поживного середовища для вирощування інокуляту конденсатом пари при його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає $V_{\text{псін}} = 24,9$ л;

Тоді кількість конденсату становитиме $V_{\text{інк}} = V_{\text{псін}} \times K_{\text{кон}} = 24,9 \times 0,1 = 2,49$ л ; Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде $V_{\text{ін}} = V_{\text{псін}} - G_{\text{ін}} - V_{\text{інк}} = 24,9 - 0,82 - 2,49 = 21,6$ л

Наступним етапом необхідно розрахувати кількість води для приготування та стерилізації кожної композиції:

Композиція А (глюкоза) у реакторі-змішувачі з урахуванням утворення конденсату.

Розрахуємо об'єм композиції А:

$$V_{\text{кА}} = V_{\text{псін}} \times (C_1 / C_{\Sigma\text{ін}}) = 24,9 \times (20 / 33,3) = 14,9 \text{ л}$$

Розрахуємо необхідний об'єм композиції А з врахуванням утворення конденсату при стерилізації (10%):

$$V_{\text{кон}} = 14,95 \times 0,1 = 1,49 \text{ л}$$

Необхідна кількість води для приготування композиції А становить:

$$V_{\text{вкА}} = V_{\text{кА}} - G_1 - V_{\text{кон}} = 14,9 - 0,49 - 1,49 = 12,92 \text{ л.}$$

Композиція В у реакторі-змішувачі з урахуванням утворення конденсату.

Розрахуємо об'єм композиції В:

$$V_{\text{кВ}} = V_{\text{псф}} \times (C_2 + C_3 + C_4 + C_5 + C_6 / C_{\Sigma\text{ф}}) = 24,9 \times (13,3 / 33,3) = 9,94 \text{ л}$$

Розрахуємо необхідний об'єм композиції В з врахуванням утворення конденсату при стерилізації (10%):

$$V_{\text{кон}} = 9,94\text{л} \times 0,1 = 0,99\text{ л}$$

Необхідна кількість води для приготування композиції В становить:

$$V_{\text{вкС}} = V_{\text{кС}} - (G_2 + G_3 + G_4 + G_5 + G_6) - V_{\text{кон}} = 9,94\text{л} - 0,33 - 0,99 = 8,6\text{ л.}$$

Формування композицій А, В (табл.6.2.):

Таблиця 6.2

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту (40л)

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 24,9 л середовища, кг (л)	Композиція	Кількість конденсату	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	0,494	А	1,49	14,9
Вода	12,92				
NH ₄ Cl	13	0,324	В	0,99	9,9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,002			
NaCl	0,2	0,004			
MnSO ₄	0,001	0,00002			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	0,00002			
Вода	8,6				

3.5. У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для культивування в колбах загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{пск}}$ складуть:

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{пск}} \times C_{\Sigma \text{ін}} = 2,5 \times 33,3/1000 = 82\text{ г, в тому числі:}$$

- 1) Глюкоза – **C1=20**; $G_1 = G_{\text{ін}} \times C_1 / C_{\Sigma \text{ін}} = 82 \times 20/33,3 = 49\text{ г.};$
- 2) NH₄Cl – **C2=13**; $G_2 = G_{\text{ін}} \times C_2 / C_{\Sigma \text{ін}} = 82 \times 13/33,3 = 32\text{ г.};$
- 3) MgSO₄·7H₂O – **C3=0,1**; $G_3 = G_{\text{ін}} \times C_3 / C_{\Sigma \text{ін}} = 82 \times 0,1/33,3 = 0,2\text{ г.};$
- 4) NaCl – **C4=0,2**; $G_4 = G_{\text{ін}} \times C_4 / C_{\Sigma \text{ін}} = 82 \times 0,2/33,3 = 0,4\text{ г.};$
- 5) MnSO₄ – **C6=0,001**; $G_6 = G_{\text{ін}} \times C_6 / C_{\Sigma \text{ін}} = 82 \times 0,001/33,3 = 0,002\text{ г.}$
- 6) FeSO₄·7H₂O – **C7=0,001**, $G_7 = G_{\text{ін}} \times C_7 / C_{\Sigma \text{ін}} = 82 \times 0,001/33,3 = 0,002\text{ г.}$

Наступним етапом необхідно розрахувати кількість води для приготування та стерилізації кожної композиції:

Розрахуємо об'єм композиції А у колбі:

$$V_{KA} = V_{пск} \times (C_1 / C_{\Sigma IH}) = 2,5 \times (20/33,3) = 1,5 \text{ л}$$

Необхідна кількість води для приготування композиції А становить:

$$V_{вКА} = V_{KA} - G_1 = 1500 - 49 = 1,451 \text{ л.}$$

Розрахуємо об'єм композиції В у колбі::

$$V_{кC} = V_{псф} \times (C_2 + C_3 + C_4 + C_5 + C_6 / C_{\Sigma ф}) = 2,5 \times (13,3/33,3) = 0,99 \text{ л}$$

Необхідна кількість води для приготування композиції В становить:

$$V_{вкC} = V_{кC} - (G_2 + G_3 + G_4 + G_5 + G_6) = 990 - 0,33 = 0,98 \text{ л.}$$

Формування композицій А, В (табл.6.3.):

Таблиця 6.3

Склад поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,5 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	49	А	1,5
Вода	1,451			
NH ₄ Cl	13	32	В	0,99
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,2		
NaCl	0,2	0,4		
MnSO ₄	0,001	0,002		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	0,002		
Вода	0,98			

Матеріальний баланс на один цикл виробництва

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг (л), л	Назва продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (г, л)			
1.1.	Глюкоза	49	Нестерильне ПС	2,49
1.2.	NH ₄ CL	32		
1.3.	MgSO ₄	0,2		
1.4.	NaCL	0,4		
1.5.	MnSO ₄	0,002		
1.6.	FeSO ₄	0,002		
1.7.	Вода	2,43		
1.7.	Всього:	2,49	Всього:	2,49
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			
2.1.	Нестерильне ПС	2,49	Стерильне ПС	2,49
2.2.	Всього:	2,49	Всього:	2,49
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (л)			
3.1.	Стерильне ПС	2,49	Посівний матеріал	2,5
3.2.	Посівний матеріал	0,01		
3.3.	Всього:	2,5	Всього:	2,5
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 40 л (кг, л)			
4.1.	Глюкоза	0,494	Нестерильне ПС	22,31
4.2.	NH ₄ CL	0,324		
4.3.	MgSO ₄	0,002		
4.4.	NaCL	0,004		
4.5.	MnSO ₄	0,00002		
4.6.	FeSO ₄	0,00002		
4.7.	Вода	21,52		
4.8.	Всього:	22,31	Всього:	22,31
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА 40 л (л)			
5.1.	Нестерильне ПС	22,31	Стерильне ПС	24,9
5.2.	Конденсат	2,49		
5.3.	Всього:	24,9	Всього:	24,9
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ 40 л (л)			
6.1.	Стерильне ПС	24,8	Посівний матеріал	24,7
6.3.	Посівний матеріал з колб на качалках	2,5		
6.4.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	2,7
6.5.	Всього:	27,4	Всього:	27,4

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг (л), л	Назва продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО БІОСИНТЕЗУ (кг, л)		СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО	
7.1.	Глюкоза	4,94	Нестерильне ПС	222,48
7.2.	NH ₄ CL	3,24		
7.3.	MgSO ₄	0,02		
7.4.	NaCL	0,04		
7.5.	MnSO ₄	0,0002		
7.6.	FeSO ₄	0,0002		
7.7.	Вода	214,25		
7.8.	Всього:	222,48	Всього:	222,48
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ БІОСИНТЕЗУ (л)			
8.1.	Нестерильне ПС	222,48	Стерильне ПС	247,2
8.2.	Конденсат	24,72		
8.3.	Всього:	247,2	Всього:	247,2
9.	БІОСИНТЕЗ У ВИРОБНИЧОМУ ФЕРМЕНТЕРІ (л)			
9.1.	Стерильне ПС	247,2	Культуральна рідина	244,8
9.3.	Посівний матеріал з посівного апарата	24,7		
9.4.	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	27,2
9.5.	Всього:	272	Всього:	272

Кількість культуральної рідини з урахуванням втрат згідно матеріального балансу 245 л не перевищує 7% похибку із кількістю культуральної рідини, розрахованою відповідно розрахунку партій продукту (259 л).

Розрахунок технологічного обладнання

Уточнюючий розрахунок кількості, ємності та геометричних об'ємів. Оскільки при визначенні стадій вирощування посівного матеріалу береться приблизний геометричний об'єм ферментаційної апаратури при заданому коефіцієнті заповнення, необхідно провести уточнення останнього. Розрахунок апаратів проводиться на підставі даних, отриманих з продуктового розрахунку та матеріального балансу. При цьому визначається тип обладнання (збірники, реактори - змішувачі, ферментаційне обладнання), геометричні характеристики з таблиці (додаток 4).

Розрахунок кількості виробничих ферментерів

Приблизний геометричний об'єм ферментера при заданому коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ складе:

$$V_{фт} = V_{ф} / K_{зап} = 272 / 0,6 = 453 \text{ л}$$

З додатку обираємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{фт} = 400$ л або $0,4$ м³.

$$N_{фт} = V_{фт} / V_{фт} = 453 / 400 = 1,1$$

Приймаємо за 1.

Уточнимо коефіцієнт заповнення $K_{зап} = V_{кр} / V_{гф} = 272 / 400 = 0,68$.
Оскільки отримане значення коефіцієнта заповнення не перевищує допустимі межі (0,5 – 0,69), приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фт} + 1$ запасний.

РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання наведеного на технологічній схемі розписана у таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник обладнаний металевою сіткою для видалення великих частинок[28]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр повітряний ВЕНТС ФБК 100 з полімерних волокон фірми «VENTBAZAR» E= 90 %[28]
К-3	Компресор	1	Компресор GX 7 фірми Atlas Copco, потужн 14 л/с, робоч тиск 1 МПа[28]
Т-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії AFR 11 «Уралкомпресормаш»[28]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер РВ 320/10 «Уралкомпресормаш» [28]
Т-6	Теплообмінник -нагрівач	1	Теплообмінник ВОП_ N Airone(Росія)[28]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр моделі WFIT 005 0310 PM, матеріал фторопласт , E=99,996, величина пор 0,1 мкм, робочий тиск 14 бар, 150 °С, продуктивність 3600 м ³ /год. [51].
Д-8 Д-10, Д-19 Д-22,	Дозатори об'ємно вагові	4	Дозатор об'ємно-ваговий ШД-8М5 [63].
36-9	Реактор для приготування Хлорантоїну	1	Реактор з нержавіючої сталі фірми «X-machine» моделі RSM-50 [55].
36-11	Реактор для приготування Біомою	1	Реактор з нержавіючої сталі фірми «X-machine» моделі RSM-50 [55].
36-12	Реактор для приготування титрувального агента (НСІ)	1	Реактор з емальований хімічний типу «СЕРН» [53].
36-13	Реактор для приготування титрувального агента (NaOH)	1	Реактор з емальований хімічний типу «СЕРН» [54].

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О					60	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Закінчення табл. 7.1.

36-14	Реактор для приготування композиції А	1	Реактор з нержавіючої сталі фірми «X-machine» місткістю 40 л моделі RSM-50 [55].
36-15	Реактор для приготування композиції В	1	Реактор з нержавіючої сталі фірми «X-machine» місткістю 20 л моделі RSM-50 [55].
Ін-16	Інокулятор	1	Ферментер на 40 л фірми «ЮВС» [61]
ЗП-17	Засівний бачок	1	
ФІ-18 ФІ-26	Фільтри індивідуальної очистки	2	Фільтри компанії «Tianjin KTMT Environment Tech Co., Ltd.» термостійкий, температура до 150 °С матеріал- поліпропілен. Пори 0,1 мкм. E=99,999[62]
36-20	Реактор для приготування композиції А	1	Реактор з нержавіючої сталі фірми «X-machine» місткістю 400 л моделі RSM-50 [55].
Н-21, Н-24, Н-27, Н-29	Насоси	4	Насос відцентровий JCP фірми ТОВ «Ватерпасс» потужністю від 1 до 100м ³ /год [67]
36-23	Реактор для приготування композиції В	1	Реактор з нержавіючої сталі фірми «X-machine» місткістю 200 л моделі RSM-50 [55].
ФР-14	Ферментер виробничий	1	Ферментер на 400 л фірми «ЮВС» [58]
36-28	Реактор-збірник культуральної рідини	1	Реактор емальований фірми ТОВ «АЗОВХІМСЕРВІС», обладнаний мішалкою якорного типу СЕРн з двигуном потужності 12 кВт. Місткість 630 л[68].
Ц-30	Центрифуга	1	Центрифуга проточна СЕРА TZ 5 з максимальною загрузкою 10 л. Максимальні оберти барабана: до 20000 об/хв Виробник : ООО «Біорусь», Росія [69].
36-31	Реактор для змішування компонентів	1	Реактор емальований фірми ТОВ «АЗОВХІМСЕРВІС», обладнаний мішалкою якорного типу СЕРн з двигуном потужності 3 кВт. Місткість 400 л[70].
ПМА-32	Автомат пакувальний	1	Автомат пакувальний для пакування у ПЕТ-пакети та коробки моделі FYL – 100, місткість 40 кг точність до 1%, продуктивність 30 шт/хв, мінімальне дозування = 100 г, тип дозування- поршневий, потужність 900 кВт[72].

РОЗДІЛ 8 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема одержання біомаси включає допоміжні роботи (скорочено «ДР», що включає підготовку і стерилізацію поживних середовищ, приготування допоміжних розчинів та приготування мийних розчинів) та технологічний процес (скорочення «ТП», що включає підготовку посівного матеріалу і біосинтез біомаси продуцента) А також технологічну та апаратурну схему одержання цільового продукту, що наведені в додатку.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

ДР 1.1. Підготовка персоналу.

При влаштуванні на роботу та щорічно персонал, який безпосередньо зайнятий у виробництві мікробіологічних препаратів, повинен пройти медичний огляд, пройти систематичне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог, а також дотримуватися правил особистої гігієни. Кожен працівник виробничого цеху повинен бути забезпечений комплектами санітарного одягу, заміна одягу проводиться щоденно, і у міру забруднення. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся під хустинку або ковпак, зняти з себе прикраси, змити лак з нігтів, ретельно вимити руки теплою водою з милом, і продезінфікувати їх. Кожен працівник на підприємстві несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, за стан робочого місця, за виконання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці.

ДР. 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР. 1.2.1. Приготування розчину Хлоратоїну

Для дезінфекції та миття поверхонь приміщення використовують 2 % розчин засобу Хлоратоїн, для щоденного прибирання необхідно 70 л для щоденного та 274 л для генерального прибирання (що включає підлогу стіни і інші поверхні окрім обладнання.

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О					62	10
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

У загальний допоміжний збірник-реактор об'ємом 100 л вносять відміряні на технічних вагах 1,4 кг концентрату Хлоратоїн і доливають 68,6 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій та одержують робочий розчин до застосування.

ДР 1.2.2. Приготування розчину Біомой.

Для миття обладнання необхідно приготувати таку кількість робочого розчину миючого засобу « Біомой» об'єм становить 9250 л 0,3% робочого розчину у реакторі мийки СІР -26. У реактор на 1000 л вносять 9222,3 л води питної. Та відважують 27,72 кг концентрату Біомою, вмикають мішалку і перемішують до повного рзчинення.

ДР 1.3 Підготовка приміщень.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання приміщень.

Здійснюється 1 раз на зміну, і включає в себе миття підлоги. Прибирання проводять у гумовому взутті, гумових рукавичках і фартуху.

При проведенні вологого прибирання приміщень використовують розчин Хлоратоїн 0,5 % (від ДР 1.2.1). Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання.

При генеральному прибиранні виробничого приміщення застосовується розчин Хлоратоїн. Прибирання здійснюється один раз на місяць. Розчином обробляють поверхні лабораторних приміщень: стіни, підлогу, стіни, вікна та двері. Стіни, двері і інші поверхні протирають паролоновою губкою, яка змочена дезінфікуючим розчином, потім цим же розчином миють підлогу.

Після закінчення прибирання необхідно провести мікробіологічний контроль.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій.

ДР 1.4.1. Миття.

Миття обладнання здійснюється водопровідною водою із застосуванням миючого засобу Біомой (від ДР 1.2.2). Миття відбувається при температурі 50-60 °С упродовж 20–30 хв. Відпрацьований розчин подається на знешкодження

відходів.

ДР 1.4.2. Дезінфекція та ополіскування.

Верхню зовнішню частину ферментаційного обладнання обробляють дезінфікуючим розчином Хлоратоїн (від ДР 1.2.1). Після миття ферментер ополіскують водопровідною водою при температурі 30-40 °С упродовж 10 хв. Відпрацьований розчин зливається і направляється на стадію знешкодження відходів.

ДР 1.4.3. Технічний огляд.

Проводять для виявлення нещільностей в комунікаціях та запірній арматурі на обладнання. У разі їх знаходження проводять підтягнення різьбових з'єднань.

ДР 1.4.4. Перевірка на герметичність.

Перевірка на герметичність ферментера проводиться за допомогою стисненого повітря (від ДР 2.7). При цьому всі з'єднання та клапани обладнання обробляють мильним розчином, подають повітря для створення надлишкового тиску (до 0,07 МПа) і спостерігають за стрілкою манометра. Якщо упродовж 5-10 хв стрілка манометра не змінюється, це означає, що ферментер є герметичним. В тому випадку коли є негерметичні з'єднання, будуть утворюватися мильні бульбашки. Особливу увагу при перевірці приділяють фланцевим з'єднанням та зварним швам.

ДР 1.4.5. Стерилізація.

Після перевірки обладнання та комунікацій на герметичність у ферментер подають гостру пару за температури 130–135 °С і стерилізують упродовж години.

По закінченні стерилізації зупиняють подачу гострої пари $P=0,28$ МПа, ставлять всі вузли під паровий захист та знижують тиск. При зниженні тиску проводять охолодження до температури 40°С.

ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря.

Повітря з атмосфери забирають через забірну шахту (ПЗ 1) висотою 30 м.

Повітрязабірник представляє собою металеву трубу діаметром 100-150 мм.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних домішок.

При проходженні повітря через фільтр грубого очищення (Ф 2), пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор (К 3). Ступінь очищення становить $E = 80 \%$.

ДР 2.3. Стиснення повітря.

При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується до 120 – 250 °С, тиск $P = 0,35-0,5$ МПа.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи.

У разі високого вмісту вологи у вихідному атмосферному повітрі під час його охолодження конденсується ще більше вологи. Щоб запобігти випаданню вологи в ресивері-вологовідділювачі (Р 5), повітря «переохолоджують» до температури 25–30 °С у теплообмінному апараті (Т 5). У ресивері-вологовідділювачі відбувається видалення вологи, яке становить 60-70 %.

ДР 2.5. Нагрівання повітря.

Для забезпечення надійної роботи фільтрів, повітря нагрівають до температури 50 °С. З цією метою повітря після ресивера (Р-5) підігрівають у теплообміннику (Т-6), при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора. Кількість підмішуваного гарячого повітря визначається умовами відносної вологості, яка не повинна перевищувати 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі.

Тонке очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється в головному фільтрі (Ф 7). Фільтруючим елементом виступають гофровані сталеві сітки.

Охоложене повітря, проходячи крізь фільтр, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить $E = 95\%$.

ДР 2.7. Очищене повітря в індивідуальному фільтрі.

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (Ф 10, 16, 25).

Як фільтруючий матеріал використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Ступінь очищення становить $E = 99,99 \%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 2,5 л поживного середовища (10 % від об'єму середовища). Вміст компонентів для приготування поживного середовища для вирощування посівного матеріалу наведено в табл. 8.1.

Таблиця 8.1

Склад поживного середовища для вирощування в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 2,5 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	49	А	1,5
Вода		1,451		
NH ₄ Cl	13	32	В	0,99
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,2		
NaCl	0,2	0,4		
MnSO ₄	0,001	0,002		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001	0,002		
Вода		0,98		

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А

На електронних вагах у відтарованому мірному стакані ($V=750$ мл) зважують 49 г глюкози та додають 451 мл води, перемішують та переносять у колбу об'ємом 3 л, потім додають 1000 мл питної води, перемішують, закривають колбу ватно-марлевою пробкою та передають на стерилізацію в автоклав. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С при тискові 0,05 МПа упродовж 30 хв. Проводять мікробіологічний контроль

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції В .

Для даної композиції необхідно приготувати 990 мл розчину, для цього на електронних вагах у відтарованому мірному стакані по черзі зважують 32 г NH₄Cl, 0,2 г MgSO₄·7H₂O та 0,4 г NaCl. Наважки переносять у колбу об'ємом

1500. Потім по черзі на аналітичних вагах зважують 0,002 г $MnSO_4$ та 0,002 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ і додають в колбу з розчином солей та ретельно перемішують. Закривають колбу ватно–марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв. По закінченню стерилізації проводять мікробіологічний контроль та стерильних умовах переносять в колбу де міститься простерилізована композиція А.

ДР 3.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу у інокуляторі об`ємом 40 л.

Необхідно приготувати 27,4 л посівного матеріалу в інокуляторі об`ємом 40 л, для цього потрібно приготувати 24,9 л поживного середовища, склад компонентів наведено у табл 8.2.

Таблиця 6.2

Склад поживного середовища для вирощування інокуляту (40л)

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 24,9 л середовища, кг (л)	Композиція	Кількість конденсату	Об`єм композиції, л
Глюкоза	20	0,494	А	1,49	14,9
Вода		12,92			
NH_4Cl	13	0,324	В	0,99	9,9
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	0,002			
NaCl	0,2	0,004			
$MnSO_4$	0,001	0,00002			
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001	0,00002			
Вода		8,6			

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А

На електронних вагах у відтарованому мірному стакані зважують 494 г глюкози та переносять у збірник об`ємом 20 л, потім додають 12,92 л питної води. Композицію перемішують за допомогою мішалки і передають за допомогою насоса у стерильний ферменер. Стерилізують композицію А з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у ферменер. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,15МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку ферменера при перемішуванні.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції В

На електронних вагах у відтарованому мірному стакані по черзі зважують 324 г NH_4Cl , 2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 4 г NaCl . Потім по черзі на аналітичних вагах зважують 0,02 г MnSO_4 та 0,02 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять у збірник об'ємом 20 л, потім додають 8,6 л холодної питної води та ретельно перемішують мішалкою. Стерилізують композицію В з помірним перемішуванням, подаванням глухої пари у сорочку. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С при тискові 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації охолоджують і подають у ферментер через гребінку де знаходиться простерилізована композиція А. Композиції перемішують між собою за допомогою мішалки.

ДР 3.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

При промисловому культивуванні поживне середовище ідентичне тому, що й для вирощування інокуляту. Робочий об'єм апарата становить 272 л разом с посівним матеріалом. Враховуючи, що посівного матеріалу в нас вноситься 10%, тому потрібно готувати 247,3 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 247,3 л середовища наведено в табл. 8.3.

Таблиця 8.3

Склад поживного середовища для основної ферментації (400л)

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 247,3 л середовища, кг (л)	Композиція	Кількість конденсату	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	4,94	А	14,85	148,5
Вода		128,71			
NH_4Cl	13	3,24	В	9,87	98,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,02			
NaCl	0,2	0,04			
MnSO_4	0,001	0,0002			
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,0002			
Вода		85,54			

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А

На електронних вагах у відтарованій ємності зважують 4,94 кг глюкози та переносять у збірник об'ємом 200 л, потім додають 128,7 л питної води. Композицію перемішують за допомогою мішалки і передають за допомогою насосу у стерильний ферментер. Стерилізують композицію А з помірним перемішуванням, подаванням спочатку глуху пару у сорочку, а потім гостру у ферментер. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С, тиску 0,15МПа упродовж 30 хв. Після стерилізації середовище охолоджують подачею холодної води у сорочку ферментера при перемішуванні.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції В

На електронних вагах у відтарованій ємності по черзі зважують 3,24 кг NH_4Cl , 20 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 40 г NaCl . Потім по черзі на аналітичних вагах зважують 0,2 г MnSO_4 та 0,2 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять у збірник об'ємом 200 л, потім додають 85,5 л холодної питної води та ретельно перемішують мішалкою. Стерилізують композицію В з помірним перемішуванням, подаванням глухої пари у сорочку. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С при тискові 0,15 МПа упродовж 40 хв. Після стерилізації охолоджують і подають у ферментер через гребінку де знаходиться простерилізована композиція А. Композиції перемішують між собою за допомогою мішалки.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1 Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д зберігають у вигляді замороженої культуральної рідини при температурі -70 °С, оскільки штам є природним ізолятом, і не має сильної властивості до реверсії ознак. До того ж цей спосіб є набагато дешевшим за ліофільне заморожування та зберігання у рідкому азоті.

ТП 4.2 Одержання робочої культури на агаризованих середовищах.

Колекційну культуру відновлюють, в пробірках з середовищем Гаузе-2, потім розсівають мікробіологічною голкою до ізолюваних колоній на чашки Петрі із Гаузе-2 і вирощують при температурі -31°C упродовж 48 годин.

ТП 4.3 Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізолювані колонії (від ТП 4.2) пересівають в пробірки зі скошеним агаризованим середовищем Гаузе-2 (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 48 год, температура 31°C

ТП 4.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу з засівної колби об'ємом 750 л додають в кожну з 3 качалочних колб по 250 мл поживного середовища.

Туди вносять посівний матеріал з пробірок з 5 мл фізрозчину, засіяних продуцентом раніше посівний матеріал. Параметри культивування : температура 31°C , тривалість 48 годин.

ТП 4.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 40 л

У інокулятор, об'ємом 40 л додають стерильні композиції в асептичних умовах, через гребінку: композиція А (ДР 3.2.1), композиція Б (ДР 3.2.3). Потім додають культуральну рідину з колб, зі стадії вирощування на качалках (ТП 4.4) через засівну колбу в асептичних умовах і починають процес культивування.

Параметри культивування : рН-7.0 температура 31°C , тривалість 48 год, посилена аерація.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 272 л. У ферментер, стерилізований гострою парою подають стерильну композицію А стерилізують при попередньо згаданих параметрах, та додають композицію В. Додають посівний матеріал з стадії ТП 4.5.

Під час процесу культивування подають повітря через барботер для підтримання концентрації розчиненого кисню (pO_2) на рівні 50 % від насичення повітрям. Тривалість культивування становить 48 год. Вирощують культуру до початку стаціонарної фази росту. рН підтримується на рівні 7,0 температуру культивування відповідно 31 °С.

Кожні 5 годин відбирають проби для аналізу процесу ферментації - визначення концентрації біомаси, концентрації джерела вуглецю і азоту у культуральній рідині. Процес ферментації орієнтовно проводять до 48 години, остаточну зупинку процесу здійснюють при досягненні максимальної концентрації біомаси становитиме у сухому залишку 5 г/л.

ТП 6. Відділення біомаси

Від реактора з культуральної рідини на насосом подають культуральну рідину подають на проточну центрифугу зі швидкістю 10 л/хв. Швидкість обертів центрифуги виставляють на 12000 об/хв. Біомасу відділену збирають вручну та переносять у реактор. До якого заздалегідь набирають 250 л води.

ТП 7 Приготування гелю препарату

ТП 7.1 Приготування напівпродукту

До реактора який містить біомасу *Bacillus megaterium var. phosphaticum* ВКМ В-2357 Д та 250 л води порційно додають 30 кг гелеутворювача – На - Карбоксиметилцелюлози. Вмикають мішалку на режим 420 об/хв. Витримують при перемішуванні 25 хв. Після завершення гомогенізації перемішуючий пристрій вмикають і подають гель на фасування.

ПВМ 8. Фасування препарату

Фасування відбувається у каністри по 20 кг в кожна. Фасування здійснює фасовочно – упаковочний автомат з шнековим дозатором. Наповнення продукту в тару здійснюється за допомогою шнекового механізму. Дискретне обертання шнека з певною частотою, всередині бункера, забезпечує ущільнення та подачу необхідної дози продукту. Об'єм порції продукту залежить від кроку та частоти обертання шнека. Для підвищення точності дозування проводиться контрольне зважування: після автомата

встановлюється обладнання, яке зважує мішки з продуктом та відбраковує їх при відхиленні маси дози. При відхиленні в більшу або меншу сторону ваги трьох мішків підряд на дозатор подається сигнал на зміну кількості обертів шнека. Для автоматизації подачі продукту в бункер встановлений датчик рівня – оптимальна швидкість обертання шнека залежить від кількості продукту.

ЗВ 9. Знешкодження відходів

До стадії подаються речовини та матеріали наступного походження:

- складові миючих та дезінфікуючих розчинів, що застосовуються на стадії санітарної підготовки обладнання та приміщень;
- компонентами вихідної сировини та напівпродуктів, що переробляються на стадіях.

Апаратурне оформлення виробництва не забезпечує 100%-вого використання сировини, напівпродуктів, матеріалів. Наявні втрати їх обумовлюють утворення твердих та рідких промислових відходів.

ЗВ 9.1 Знешкодження рідких відходів

Виробничі стоки на ділянці виробництва готових лікарських препаратів утворюються на стадії санітарної підготовки та промивки обладнання та разом з загальнозаводськими стоками знешкоджують механічними, фізико-хімічними, біологічними, термічними методами. Після такої очистки води скидаються в міську каналізацію. Вміст специфічних речовин в стічних водах обумовлений регламентними втратами та не перевищує значення санітарно-гігієнічних нормативів.

ЗВ 9.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді некондиційні відходи виробництва збираються та направляються на полігон твердих побутових відходів, де піддаються різними способами термічної обробки: піроліз, переплав, випалювання та вогняне знешкодження (спалювання) тощо.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Карта постадійного контролю

Таблиця 9.1

Карта постадійного контролю виробництва біомаси

Bacillus megaterium var phosphaticum

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та 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 Приготування розчину Хлоратоїн	Концентрація розчину засобу Хлоратоїн	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=2%
Кх, 1.1.2 Приготування розчину засобу Біомой	Концентрація розчину засобу Біомой	Хімічний метод	Після приготування розчину	C=0,3%
Кт. Км 1.2.1, 1.2.2 Щоденне та генеральне прибирання	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.3.1 Миття розбірних частин обладнання	Розбірні частини обладнання, мийний розчин, його температура, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції	T =80 ⁰ C
Кт 1.3.2 Миття обладнання	Мийний розчин для обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	T =80 ⁰ C t- 1-2 год
Кт 1.3.3 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тис визначається безперервно під час виконання операції	t- 0,5 год P= 0.07МПа

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА				
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Бабченко В.С			
Перевір.	Воронцов О. О.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Пирог Т.П.			
Контроль виробництва				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			73	7
Кафедра БТМ				

1	2	3	4	5
Кт 1.4.2 Ополіскування обладнання та комунікацій	Ополіскування обладнання та комунікацій	Термометр технічний	Термометр технічний	$t = 20^{\circ}\text{C}$ $\tau = 10 \text{ хв}$
Кт 1.4.3 Перевірка на герметичність	Перевірка на герметичність	Годинник, манометр технічний	Тиск визначається безперервно під час процесу	$P_1 = 0,07$ МПа, $P_1 = 0,5 - 0,6$ МПа $\tau \geq 30 \text{ хв}$
Кт 1.4.4 Стерилізація обладнання	Стерильність обладнання	Годинник, манометр технічний, термометр технічний	Тиск і температура визначається безперервно під час процесу	$t = 122 - 130^{\circ}\text{C}$, $P = 0,15 - 0,18$ МПа $\tau = 40 \text{ хв}$
Кт 2.2 Грубе очищення повітря	Попереднє очищення повітря	Перевірка ступеня очищення	Під час очистки повітря в фільтрі грубої очистки	$E = 80 \%$
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря	Манометр технічний	Під час компресування повітря	$t = 200^{\circ}\text{C}$ $P = 0,35 - 0,5$ МПа
Кт 2.5 Охолодження повітря	Охоложене повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	$t = 25 - 40^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6 Підігрів повітря	Підігрів повітря	Термометр технічний	Під час проведення операції	$t = 60^{\circ}\text{C}$
Кт 2.7 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищення повітря в головному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	$E = 99,92 \%$
Кт 2.8 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Перевірка ступеня очищення	Під час проведення операції 1 раз на місяць	$E = 99,9999 \%$
Кт, Кх 3.1.1 Приготування і стерилізація розчину соляної кислоти	Концентрат соляної кислоти, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	$C = 6\%$ При $0,1$ мкм Відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт, Кх 3.1.2 Приготування і стерилізація розчину гідроксиду натрію	Сухий гідроксид натрію, температура, час, стерильність, концентрація	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	C= 6% T=131 ⁰ C t=40 хв відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=112 ⁰ C t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=135 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=112 ⁰ C t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=135 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=112 ⁰ C t=30 хв Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність.	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль- після	T=135 ⁰ C t=40 хв Відсутність мікробіоти

Закінчення табл. 9.1

1	2	3	4	5
Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	T=31°C t=48 год Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 40 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	pH=7 T=31°C t=48 год Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері	Культуральна рідина, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, чистота культури, концентрація біомаси виражена	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр мікробіологічний контроль, фотоколориметричний метод визначення концентрації біомаси.	Під час вирощування культури в ферментері, відбір проб: кожні 6-8 годин	pH=7 T=31°C t=24 год Відсутність сторонньої мікробіоти, Аерація 50% від насичення повітрям
Кт 7.1 Зберігання культуральної рідини	Температура	Термометр технічний	Під час процесу та перед початком	T = 10 °C
Кт 7.2 Відділення біомаси	Оберти центрифуги, швидкість подачі	Тахометр технічний витратомір	Під час процесу та перед початком	n = 12000 об/ хв v = 10 л/хв
Кт 8.1 Приготування Гелю	Оберти мішалки , час	Термометр технічний Тахометр технічний Годинник	Під час проведення технологічного процесу та перед початком	n = 220 об/ хв t =25 хв
Кт 10.1 Пакування у первинну тару	Розмір часточок,	Сито з розміром пор 3-6 мм	Під час проведення процесу	N = 3-6 мм

9.2 Мікробіологічний контроль.

Мікробіологічний контроль зводиться до мікроскопуванням за фарбування по Граму. 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, або з імерсійною системою на $\times 90$. При оцінці морфолого-культуральних ознак продуцента перш за все звертають увагу, на характерні особливості клітин.

При потребі перед мікроскопією звичайного препарату роблять препарат з фарбуванням За- Грамом. Для кращого підтвердження чистоти культури:

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

Мазок знебарвлюють 96% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 сек.. Мазок ретельно промивають водою. На 1-2хв наносять фуксин Пфейфера. Фарбу змивають, а препарат висушують, і мікроскопують. Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, і грамнегативні у червоний [76] (рис 9.1).

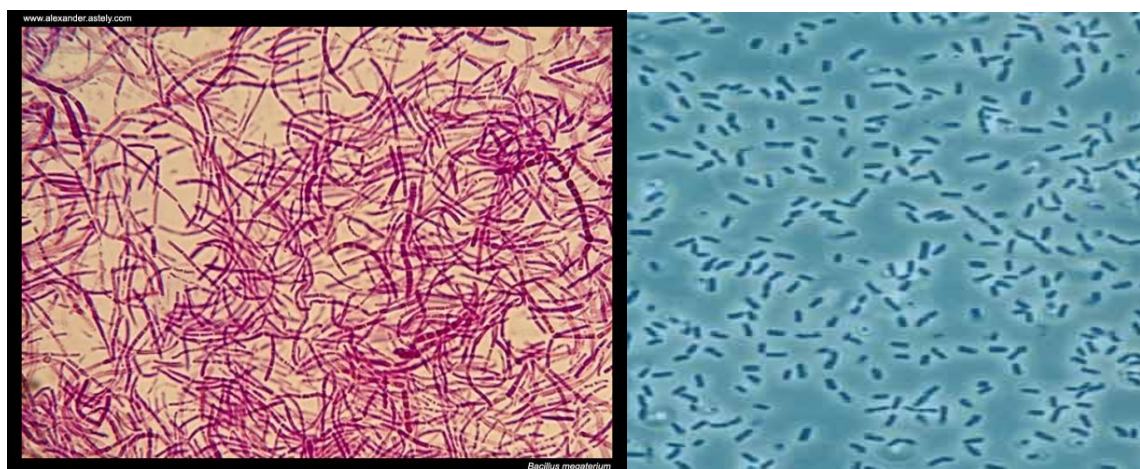


Рис 9.1. Мікроскопія бактерії *Bacillus megaterium var. phosphaticum* при фарбуванні за грамом та під звичайним мікроскопіюванням[77].

9.3 Показники росту та синтезу цільового продукту.

9.3.1 Концентрація біомаси.

Непрямий метод :

Концентрацію біомаси, а точніше концентрацію КУО в 1 мл культуральної рідини визначають за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК), а саме за різницею оптичної густини D клітинної суспензії та еталонного зразка і переводять відповідне значення оптичної густини за допомогою калібрувального графіка у КУО(концентрацію клітин утворюючих одиниць) виражену у КУО/мл.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на кількість КУО за допомогою калібрувального графіка відносно еталонного зразка.

Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1мл культуральної рідини. Суміш збовтуємо і вимірюємо оптичну густину на фотоелектроколориметрі (при довжині хвилі 540 нм)

Прямий метод:

10 мл проби культуральної рідини відбирають та переносять у центрифужні пробірки. Після цього центрифугують протягом 20 хв при 15000 обертів на хвилину. Після цього зливають надосадову рідину та відділяють біомасу. Біомасу висушують до постійної маси за допомогою апарата «Чижової». Потім роблять контрольне зважування і переводять у г в літрі(сухої біомаси). Максимально можлива розрахована концентрація біомаси 5 г/л[78, 79].

9.3.2 Концентрація джерела вуглецю та азоту.

Визначення концентрації азоту.

Метод Несслера базується на утворенні забарвленої важкорозчинної сполуки при взаємодії реактиву Несслера (K_2HgI_4) з аміаком в нейтральних або лужних розчинах: $2HgI_4 + NH_3 + OH = NH_2Hg_2I_3 + 5I_2 + H_2O$ [4]. Великого надлишку луку слід уникати, оскільки може відбутися розкладання $NH_2Hg_2I_3$

з утворенням оксиду ртуті. Забарвлена сполука $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$ схильна до утворення негативно заряджених колоїдних частинок. Для отримання рівномірної і стійкої суспензії в розчин вводять захисний колоїд – желатин, полівініловий спирт. При малих концентраціях аміаку колоїдні розчини мають жовте забарвлення, при збільшенні концентрації з'являється бурий відтінок. Отримання в ході аналізу колоїдних розчинів, здатних до коагуляції, знижує відтворюваність результатів аналізу, одержуваних методом Несслера. Для визначення аміаку до 1 мл супернатанту культуральної рідини додають 1 мл реактиву Несслера. Коефіцієнт екстинції вимірюють при довжині хвилі 400–425 нм. Концентрацію аміаку визначають за калібрувальним графіком. Фотометричному визначенню азоту методом Несслера заважають іони, що випадають в осад у лужному середовищі і утворюють нерозчинні сполуки з йодид - іонами та іонами ртуті (магній, марганець, залізо, титан, сульфід-іони та ін.)[27].

Визначення концентрації Глюкози(джерела вуглецю)

Основним джерелом вуглецю в середовищі виступає глюкоза, окрім пептону. Концентрація даного джерела вуглецю буде визначатися модифікованим глюкозооксидазним методом з використанням біосенсорів з іммобілізованою глюкозооксидазою та амперометричним датчиком.

Культуральну рідину у кількості 50 мл відбирають з ферментера, 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.

Відбирається певний об'єм проби, його розводять у 250-1000 разів, далі від розведеного розчину відбирають 5-10 мл і переносять у 20 мл 20 мМ буферного розчину системи: KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 з рН 7.2. До даної системи додають глюкозооксидазу іммобілізовану на полімері ЕДТ (20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10–2 М 3,4-етилендіокситіофену, 10–3 М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД) у вигляді суспензії.

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

Величина, що вимірюється- це сила струму, що визначається у нА. Концентрацію глюкози визначають за градуовальним графіком залежності сили струму (нА) і концентрації глюкози (мМ) [38]. Одержане значення концентрації спочатку перемножають на ступінь розведення а потім переводять концентрацію з мМ у г у певному об'ємі чи г/л Вміст карбону у глюкозі 40 %, тобто 1 г глюкози відповідає 0,4 г карбону [80]

РОЗДІЛ 10. Автоматизація виробництва

10.1. Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої дільниці

У наш час біотехнологія допомагає довкіллю, дозволяючи знизити ризик токсичного забруднення ґрунтів і ґрунтових вод, підвищити ефективність сільського господарства. У промисловості багато технологій замінюються біотехнологіями, що використовують ферменти і мікроорганізми, зокрема, у харчовій галузі, у сфері переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очищення і використання стічних вод, одержання біогазу і добрив.

В сучасні біотехнології одним з особливо актуальне питань є масове виробництво біодобрив на основі ґрунтових бактерій родів *Bacillus*, *Azotobacter*, *Rizobium* та ін. для широкого застосування, зокрема для сільськогосподарської промисловості різними продуцентами, вивчення фізико-хімічних властивостей, однакових кислот різних продуцентів.

Біодобрива представляють собою в більшості біомасовий концентрат бактерій, що акумулюють фосфор, азотфіксуючих, та нітрифікуючих бактерій або інших мікроорганізмів, здатних до покращення врожайності культур чи для захисту від шкідників.

Фосфобактерин – це високоефективний препарат на основі рістстимулюючих фосфатмобілізуючих ґрунтових бактерій *Bacillus megaterium* для збільшення продуктивності злакових, технічних і овочевих культур. Ефективність даного препарату визначається здатністю бактерій, на основі яких він виготовлений, мінералізувати органічні фосфорвмісні речовини, покращувати мінеральне живлення рослин, стимулювати їх ріст і розвиток за рахунок забезпечення біологічно активними речовинами (вітамінами, фітогормонами, амінокислотами та ін.), збільшувати стійкість рослин до фітопатогенів і стресів, підвищувати врожай і його якість.

					КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА			
Змін.	Лист.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бабченко В.С			Автоматизація виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О. О.					81	4
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.		Клименко О.М						
Затверд.		Пирог Т.П.						

Форма препарату як правило має вигляд сухого порошку, основа якого носій, що змішаний з біомасою та висушений до стану вологості не більше 20 %. Ступінь очищення препарату відповідно ГЗХ.

В цілому виробництво фосфобактерину схоже на виробництво азотобактерину та препаратів бульбочкових бактерій.

Склад поживного середовища (%): кукурудзяний екстракт – 1,8; меляса – 1,5; сульфат амонію – 0,1; крейда – 1; інше – вода. Процес культивування проводять глибинним методом у строго асептичних умовах при постійному перемішуванні та примусовій аерації до стадії утворення спор. Основні параметри проведення культивування: температура 28-30°C, рН 6,5-7,5; тривалість культивування 1,5-2 доби.

Фосфобактерин – це ідеальний препарат для удобрення чорноземних ґрунтів, адже у них достатньо органічних речовин, що мають у своєму складі фосфор. Відмічено значне підвищення врожайності (досягає 30%) у картоплі, різноманітних зернових культур та столового буряку при використанні даного препарату.

10.2 Технологічні вимоги до системи автоматизації

№ п/п	Місце відбору	Регульований параметр	Допустимі значення пар-ру	Вид автоматизації	Характер контролю чи керування	Додаткові вимоги
1	2	3	4	5	6	7
1	Реактор	Температура	15 °С	Контроль Регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на клапан подачі холодоагента
2		Кислотність	7 од. рН	Контроль	Покази, сигналізація	Світлова сигналізація
3	Фільтр	Тиск	-50 кПа	Контроль Регулювання	Покази, запис, сигналізація	Дія на двигун насоса

01.3. Обґрунтування та вибір системи засобів автоматизації

Виходячи з умов виробництва обираються новітні засоби автоматизації, що мають похибку не більше 1%, задовольняють потреби в надійності та

швидкодії. Для зручності підключення та економії на модулях контролера обираються датчики з уніфікованим вхідним сигналом 4-20 мА. Використовуються вихідні уніфіковані сигнали 0-10 В.

10.4. Опис схеми автоматизації об'єкта

На функціональній схемі автоматизації передбачено наступні контури.

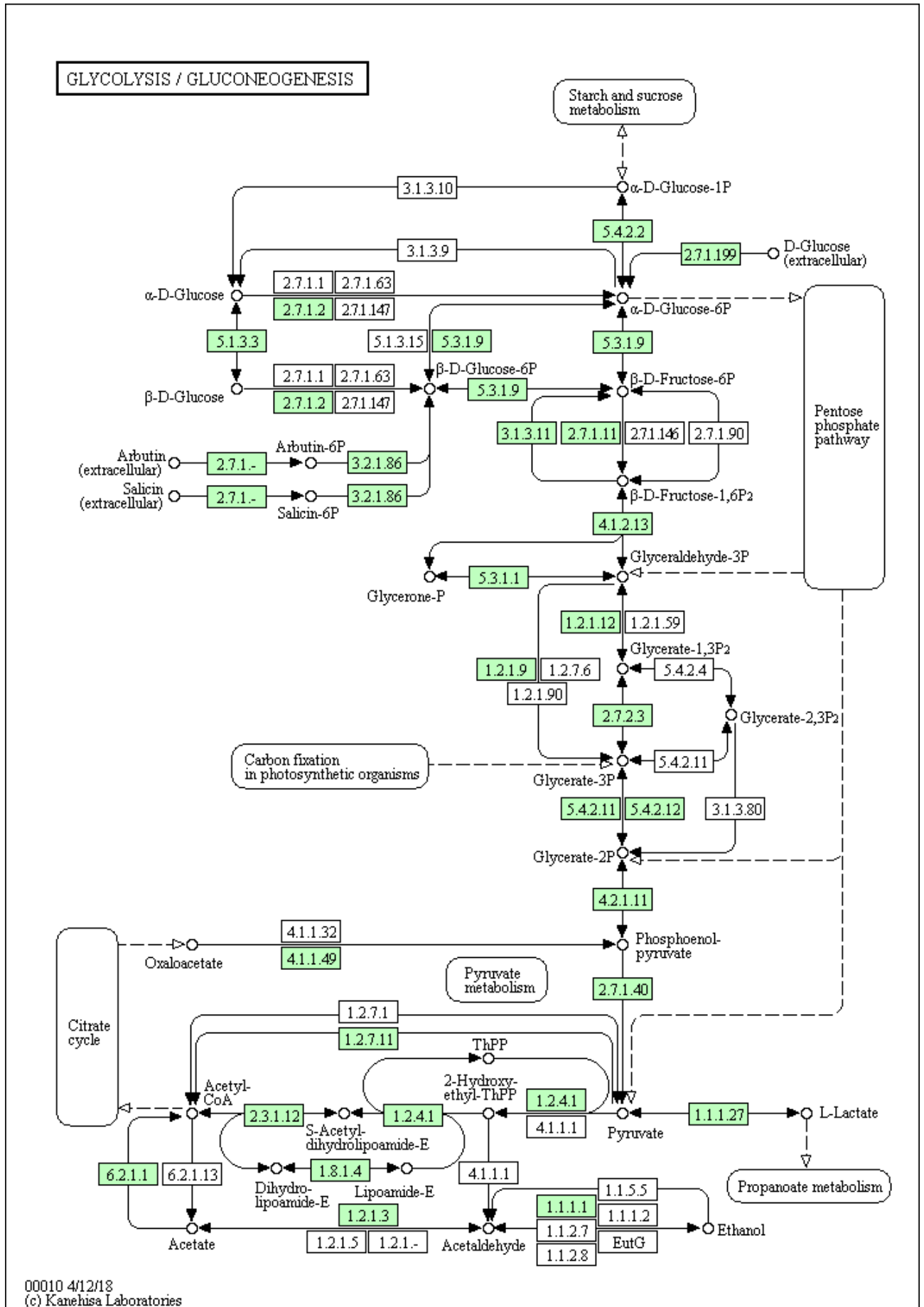
1. Регулювання температури в реакторі реалізовано за допомогою мікропроцесорного вимірювального перетворювача Sitrans TF2 фірми Siemens. Він містить вбудований чутливий елемент – платиновий термометр опору Pt 100 та вторинний показуючий, самозапам'ятовуючий пристрій з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА (позиція 1а). Далі сигнал надходить на ПЛК, де формується управляючий вихідний сигнал, який через електропневмо перетворювач ЕПП-3211 (позиція 1б) надходить на пневматичний виконавчий механізм МИМ-3077 (позиція 1в), який залежно від завдання відкриває чи закриває клапан подачі пари.
2. Регулювання тиску в ресивері, здійснюється за допомогою вакуумметра ДВ 05100 (позиція 2а) з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА. Далі сигнал надходить на ПЛК, де формується управляючий вихідний сигнал, який надходить на частотний перетворювач ATV-58HD64N4 (позиція 2б), який регулює частоту обертання насоса.
3. Контроль кислотності в реакторі здійснюється промисловим рН-метром рН-101П (позиція 3а) з уніфікованим вихідним сигналом 4-20 мА.

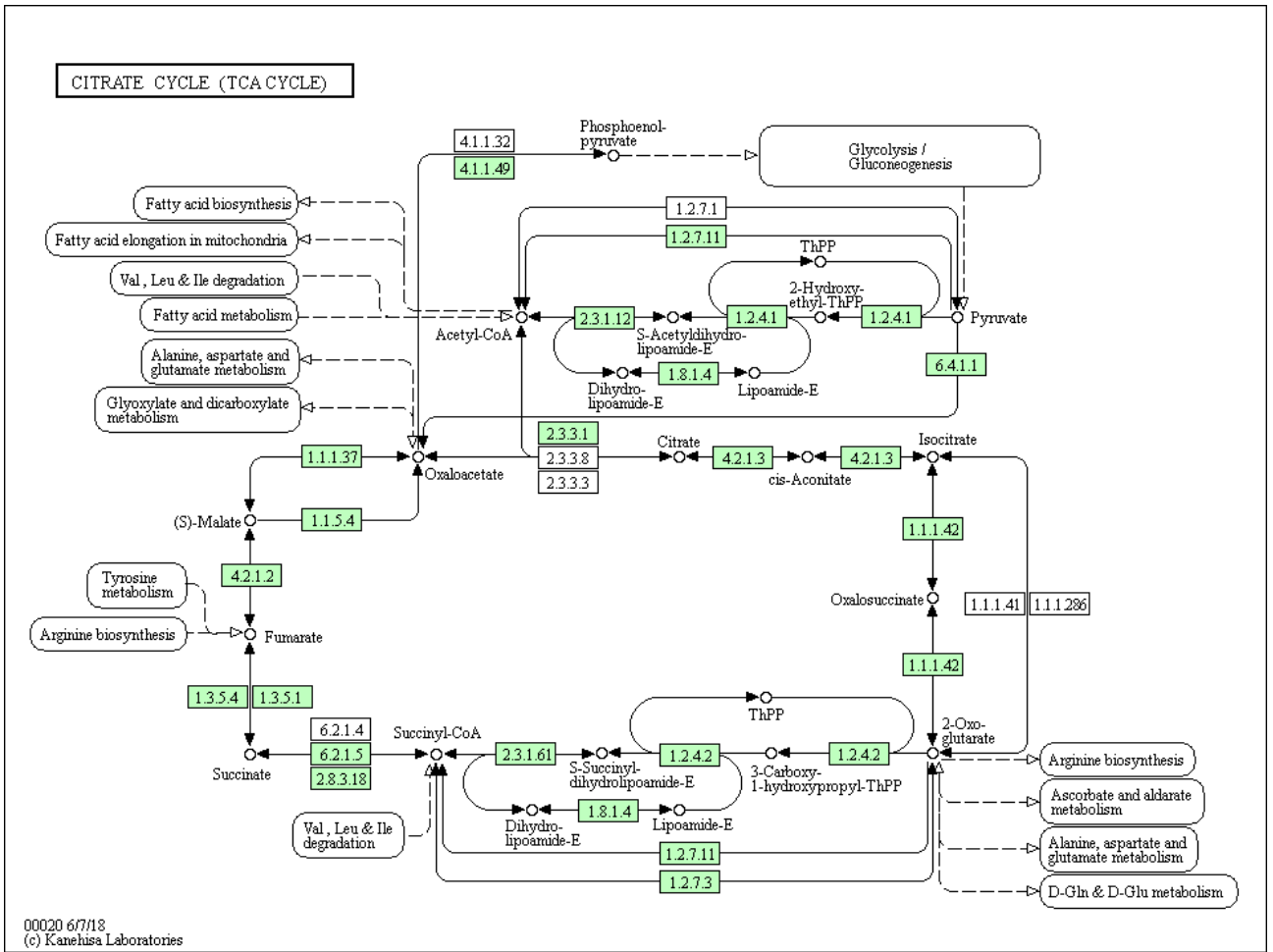
10.5. Специфікація на засоби автоматизації

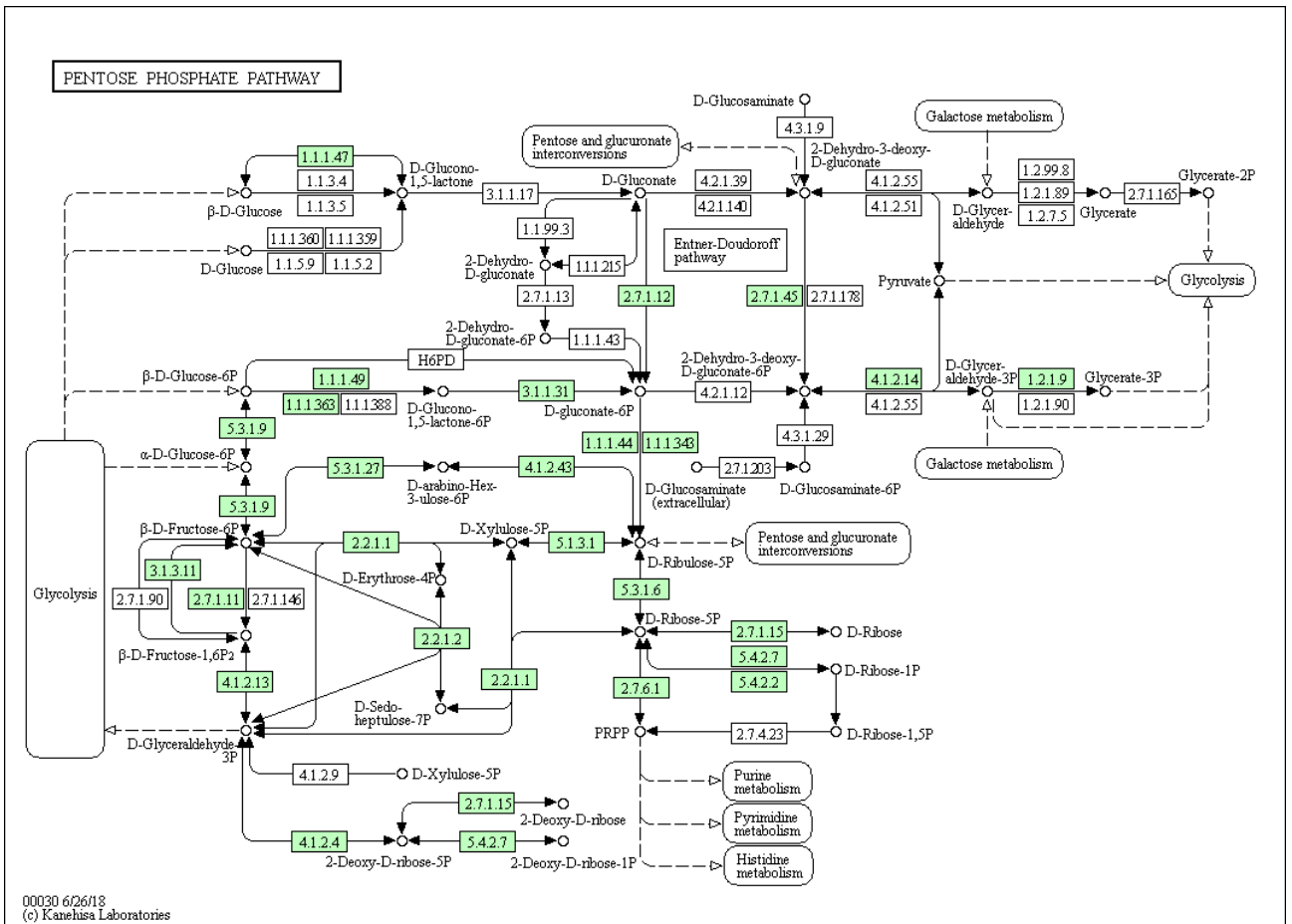
Таблиця 10.2

№ п/п	№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, марка	Одиниця вимірювання	К-ть	Примітка
1	2	3	4	5	6	7
1	1а	Вимірювальний мікропроцесорний перетворювач температури з вбудованим платиновим термометром опору Pt100 в захистній трубці із нержавіючої сталі, показуючий з світловою сигналізацією. Вихідний сигнал 4-20 мА Вимірювальний діапазон температур -50...+200°C.	Sitrans TF2	°C	1	Siemens
2	2а	Вакууметр, діапазон -100 – 0 кПа, температура вимірювального середовища (-40...70) °C. Вихідний сигнал 4-20 мА Вимірювальний діапазон температур -50...+200°C.	ДВ 05100	кПа	1	ООО "Нефтехимгруп"
3	3а	pH-метр промисловий, температура вимірювального середовища (0...120) °C. Вихідний сигнал 4-20 мА	pH-101П	од. pH	1	ВП Дилис
4	2б	Частотний перетворювач для асинхронних двигунів змінного струму потужністю 0,37-75 кВт, діапазон вих. част. 0,1..500Гц	ATV-58HD64N 4	об/с	1	Schneider Electric
5	1б, 4а, 5а	Електропневмо перетворювач перетворює сигнал з 4-20 мА в 0,2-1 кгс/см ² . Тиск живлення 1,4 кгс/см ² .	ЕПП-3211	-	3	ООО «Саранские приборы»
6	1в, 4б, 5б	Пневматичний виконавчий механізм 2-х позиційний для одноходових прохідних клапанів Ду – 50 мм. В комплект входить клапан 2х позиційний 3257.	МИМ-3077	-	3	„Делис” м. Харків
7	КМ1	Пускач магнітний. Робоча напруга 220 В.	ПМЕ 111	-	1	„Делис” м. Харків

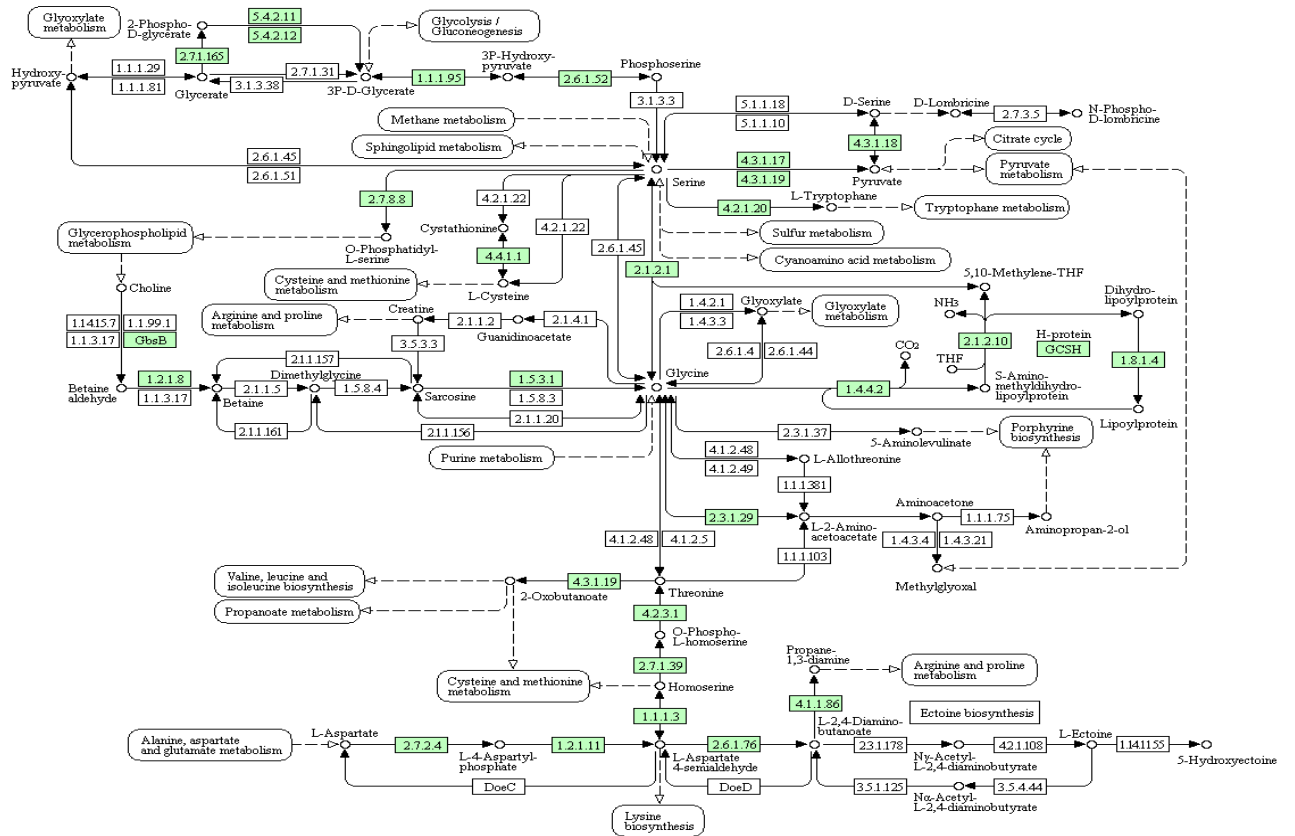
Додаток 1







GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM



00260 10/26/17
© Kanhaas Laboratories

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Швед О. В, О. Б. Миколів О. Б, В. О, Комаровська. В. О, Порохнявець, О. З, Новіков. В. П Екологічна біотехнологія //Навчальний посібник. –2-е вид. – Львів: Львівська політехніка –2010.–368 с.
- 2.Любова О.В., Пилипчук О.О.Конспект лекцій «Сільськогосподарська біотехнологія»– Київ, 2014. – 83 с
- 3.Біодобрива. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <http://biozavod.com/ua/korisna-informatsiya/blog-ogorodnika/171-sho-take-biodobrivai-biobakterii>
4. Коваленко О. А., Федорчук М. І., Корхова М. М., ВИКОРИСТАННЯ СИДЕРАТИВ, МІКРОДОБРИВ І БАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТИВ ЯК ЕЛЕМЕНТИВ БІОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОЩУВАННЯГОРОХУ.
5. Фосфобактерин. [Електронний ресурс].Режим доступу https://studopedia.su/3_29420_bakterialne-dobriwo-fosfobakterin.html
6. Патент: RU 2649359: Штамм бактерий *Bacillus megaterium* v3 в качестве средства для ускорения роста и увеличения продуктивности винограда, зерновых, овощных и древесных культур- 2012-2018//Щербакова Е. Н. Роц П. Ю., Щербаков А.В.,Мулина С. А.,Чеботарь В. К.,Заплаткин А.Н.- 23.04.2018.
7. Патент: RU 2327737. Штамм бактерий *Bacillus megaterium*, мобилизующий фосфор и кремний из объектов литосферы и устойчивый к полигексаметиленгуанидину//Вайшля Ольга Борисовна Ведерникова Анна Алексеевна – 24.06.2016.
8. Патент. RU2558291C2. Полифункциональное средство для растениеводства// Ю. В Круглов, Т. О Лисина.
9. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2004. – ст: 102-354
- 10.Соли [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://systopt.prom.ua/site_search?search_term=%D1%85%D0%BB%D0%BE%D1%80%D0%B8%D0%B4

11. Глюкоза [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://prom.ua/p12930165-glyukoza-pischevaya-dekstroza.html>
12. Натрия хлорид [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://prom.ua/p844077081-sol-pischevaya-ekstra.html>
13. Тритптон [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://russian.alibaba.com/product-detail/tryptone-60780837875.html?spm=a2700.8699010.29.31.67807187bGI8Pn>
14. Дрожжевой экстракт. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://russian.alibaba.com/product-detail/best-price-yeast-extract-60761737505.html?spm=a2700.8699010.normalList.19.5f9974bd3hklgi>
15. Дріжджі кормові [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://zoovetbaza.com.ua/p36400745-drizhdzhi-kormovi-kormovye.html>
16. Борошно кукурудзяне [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<http://august.in.ua/ru/ceny-na-zernovye-maslichnye>
17. De Vos, P. *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. *Springer* (2009)
18. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_megaterium
19. . [Електронний ресурс] – Режим доступу:
https://www.researchgate.net/figure/Bacillus-megaterium-colonies_fig6_6077428
20. Швед О. В, О. Б. Миколів О. Б, В. О, Комаровська. В. О, Порохнявець, О. З, Новіков. В. П Екологічна біотехнологія //Навчальний посібник. –2-е вид. –Львів: Львівська політехніка –2010.–368 с.
21. Любова О.В., Пилипчук О.О.Конспект лекцій «Сільськогосподарська біотехнологія»– Київ, 2014. – 83 с
- 22.Фосфобактерин. [Електронний ресурс].Режим доступу
https://studopedia.su/3_29420_bakterialne-dobravo-fosfobakterin.html
23. Застосування фосфобактерину [Електронний ресурс].Режим доступу
<https://bioinvest.com.ua/biopreparaty/mikrobnye-preparaty/203-fosfobakterin>

24. Площі посівів на 2019 р [Електронний ресурс].Режим доступу <http://www.ukrstat.gov.ua/>
25. Біореактор на 10000 л[Електронний ресурс] – Режим доступу: www.blbio.com/en/product.asp?id=88
26. *Пирог.Т.П, Ігнатова О.А* Загальна біотехнологія: - К : НУХТ, 2009 –
27. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: *Т. П. Пирог, Ю.М Пенчук.* – К.: НУХТ, 2011. – ст 17-19.
28. *Данилов.І.П, Самойленко С.І* Апарати мікробіологічної промисловості: - Харків : НТУ «ХП», 2008 – ст 21.
27. Піногасник [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/p892627353-penogasitel-spumol-30kg.html>
28. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: *Т. П. Пирог, Ю.В Карлаш, В.О Красінько .* – К.: НУХТ, 2015. – 10 – 19 с.
29. Хлоратоїн. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://prom.ua/p665834234-hlorantoin.html>
30. Хлорне вапно . Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://prom.ua/p19361024-izvest-hlornaya-hlorne.html>
31. Сода каустична, кальцинована. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://officem.com.ua/promishlennaya-himiya>
32. Лизовормин 3000. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://prom.ua/p538216466-lizoformin-3000-dezinfitsiruyuschie.html>
- 33.Бланідаз - Ц. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://blanidas.com.ua/blanidas-c-star-20l/>
- 34.Лів -Атив. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://officem.com.ua/uk/6567-sredstvo-moyuschee-liv-aktiv-114-schelochnoj-s-ponizh-penoobraz-antibak-efektom-5kg>

35. Kenolux F 200. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://officem.com.ua/uk/6567-sredstvo-moyuschee-liv-aktiv-114-schelochnoj-s-ponizh-penoobraz-antibak-efektom-5kg>
35. Центрифуга фільтрувальна. [Електронний ресурс] : режим доступу <https://studall.org/all-32438.html>
- 36.Центрифуга проточна. [Електронний ресурс] : режим доступу [https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/czentrifugi-germaniya-sera\)/pilotnaya-protchnaya-czentrifuga-sepa-z-41.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyie-czentrifugi/czentrifugi-germaniya-sera)/pilotnaya-protchnaya-czentrifuga-sepa-z-41.html)
- 37.Центрифуга декантантна. [Електронний ресурс] : режим доступу https://studopedia.com.ua/1_51106_budova-tsentrifug.html
- 38.Сепаратор . [Електронний ресурс] : режим доступу <https://damilk.com.ua/ua/novosti/separator-dlya-moloka-v-domashnih-usloviyah/>
39. Ультрафільтраційна установка. [Електронний ресурс] : режим доступу <https://aw-therm.com.ua/ultrafioletovoe-obezzarazhivanie-vody/>
- 40.Фосфобактерин [Електронний ресурс] : режим доступу <https://studfile.net/preview/8081626/>
- 41.Черныш е. Ю., Пляцук л. Д.. Адсорбційні іммобілізації сульфід-окислюється бактерій в Массі носіїв, виготовлених із фосфогіпсу /—. Технологический аудит и резервы производства 2015. —, N 3. Том 23 — . Ст . 4-4.
- 42.Січка . [Електронний ресурс] : режим доступу <https://uk.wikipedia.org/wiki/Січка>
- 43.Торф. [Електронний ресурс] : режим доступу <https://uk.wikipedia.org/wiki/Торф>
44. Перліт. [Електронний ресурс] : режим доступу <https://uk.wikipedia.org/wiki/Перліт>
- 45.Висівки. [Електронний ресурс] : режим доступу <https://uk.wikipedia.org/wiki/Висівки>
- 46.Деревні щепки. [Електронний ресурс] : режим доступу <https://uk.wikipedia.org/wiki/Тирса>

- 47 . Розпилювальна сушарка [Електронний ресурс] : режим <http://1snau.ru/vivchennya-rozpilyuvalnoi-susharki-firmi-niro-atomajzer/>
<https://www.google.com.ua/search?q=%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D1%96%D1%81%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B4%D0%B8&ie=&oe>
48. Барабанна сушарка [Електронний ресурс] : режим <https://poznayka.org/s1542t1.html>
49. Стрічкова сушарка [Електронний ресурс] : режим https://www.google.com.ua/search?q=%D1%81%D1%82%D1%80%D1%96%D1%87%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%B0+%D1%81%D1%83%D1%88%D0%B0%D1%80%D0%BA%D0%B0&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwi6n9_hxfnnAhXttYsKHR3-CAkQ_AUoAXoECAsQAw&biw=1280&bih=907#imgrc=jkn8KhArwD-jdM
50. Камерна сушарка [Електронний ресурс] : https://www.google.com.ua/search?q=%D0%BB%D1%96%D0%BE%D1%84%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0+%D1%81%D1%83%D1%88%D0%B0%D1%80%D0%BA%D0%B0+%D1%81%D1%85%D0%B5%D0%BC%D0%B0+&tbm=isch&ved=2ahUKEwi3yMmpxfnnAhXOsioKHSOsAO4Q2-cCegQIABAA&oq=%D0%BB%D1%96%D0%BE%D1%84%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0+%D1%81%D1%83%D1%88%D0%B0%D1%80%D0%BA%D0%B0+%D1%81%D1%85%D0%B5%D0%BC%D0%B0+&gs_l=img.3...3021.9109..9594...3.0..0.71.990.16.....0....1..gws-wiz-img.....0i24.-rDB7czqwvk&ei=E85bXvfyA87lqgGj2ILwDg&bih=907&biw=1264&hl=uk#imgrc=OpoLG242th3oqM
51. Фільтр доочистки повітря на 0,1 мкм. Електронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.omega-air.si/ru/produkcija/filtry-szhatogo-vozduha/wfit-seriya>
52. . Реактор СЕРН на 6300 л: Електронний ресурс: [режим доступу] : http://catalog.azovchemservice.com.ua/index.php?id_product=82&controller=product

53. Реактор на 630 л: Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://wise-master.com.ua/p948372616-reaktor-himicheskij-500.html>
54. Реактор СЕРН на 160 л: Электронний ресурс: [режим доступу] : http://catalog.azovchemservice.com.ua/index.php?id_product=59&controller=product
55. Реактор на 63 л: Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://wise-master.com.ua/p1000254035-reaktor-dlya-prigotuvannya.html>
56. Реактор на 12,5 л: Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://wise-master.com.ua/p948372616-reaktor-himicheskij-500.html>
57. Автоклав . Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.phchd.com/us/biomedical/sterilization/autoclaves/mls-37511>
58. Виробничий Біореактор. . Электронний ресурс: [режим доступу] : https://www.alibaba.com/product-detail/in-situ-sterilizable-cell-culture-100001_60701914259.html?spm=a2700.7724857.normalList.7.70742172IUJWy
59. Ферментер на 1000 л Біотехно: Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.biotechno.ru/catalog/bioreactory/promyshlennyy-bioreaktor-biotechno-obemom-1000-3000-l/>
60. Ферментер на 100 л Біотехно: Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.biotechno.ru/catalog/bioreactory/pilotnyy-bioreaktor-biotechno-obemom-50-150-l/>
61. Ферментер на 10 л Біотехно: Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://www.biotechno.ru/catalog/bioreactory/laboratornyy-bioreaktor-pro-lab-s-dvumya-kulturalnymi-sosudami-obemom-7-12-l/>
62. Фільтри індивідуальної очистки : Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://russian.alibaba.com/product-detail/pp-pleated-millipore-0-45-membrane-filter-for-biotechnology-60446538865.html>
63. Дозатори : Электронний ресурс: [режим доступу] <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/29>
64. СІР-мийка: Электронний ресурс: [режим доступу] : <https://promvit.com.ua/category/sip->

[mojki/?gclid=CjwKCAjw5Ij2BRBdEiwA0Frc9ak3nLMHi6-vT8n7t3JsiN5Lj4lr4ETOuiwWrhVFuRopk5dGUfNvhoCDOgQAvD_BwE](https://www.mojki.com.ua/?gclid=CjwKCAjw5Ij2BRBdEiwA0Frc9ak3nLMHi6-vT8n7t3JsiN5Lj4lr4ETOuiwWrhVFuRopk5dGUfNvhoCDOgQAvD_BwE)

65. Реактор на 50 л [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://perryvidex.prom.ua/p900520233-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html>

66. Реактор на 70 л [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://perryvidex.prom.ua/p900520233-reaktor-nerzhaveyuschej-stali.html>

67. Насоси : Электронный ресурс: [режим доступа] https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/standartizirovannyye/seriya_rg

68. Реактор на 6300 л [Электронный ресурс] : <https://dzerzhinskros.flagma.ru/reaktor-emalirovanny-stalnoy-6-3-l-o3564847.html>

69. Центрифуга проточка [Электронный ресурс] : <https://bio-rus.ru/oborudovanie/protochnyye-czentrifugi/protochnyye-trubchatyye-czentrifugi/>

70. Реактор на 400 л [Электронный ресурс] : <https://odessa.flagma.ua/reaktor-emalirovanny-400-litrov-himicheskij-o3745414.html>

71. Сушарка контактна [Электронный ресурс] : режим <https://dl.sumdu.edu.ua/textbooks/22852/266179/index.html>

72. Пакувальний автомат . [Электронный ресурс] : режим доступа <https://prom.ua/p1024854834-pakuvalnij-avtomat-hualian.html>

24

73. Насос відцентровий [Электронный ресурс] : режим https://vaterpass.com.ua/catalog/centrobezhnie-nasosi/gigienicheskie_nasosyi

74. Дробарка [Электронный ресурс] : <https://lvov.flagma.ua/uk/drobarka-valcovaya-drobilka-soloda-melnica-o6844899.html>

75. Сито вібраційне [Электронный ресурс] : <https://minipress.ru/katalog/eksperimentalnoe-oborudovanie/vibratsionnye-sita-proseivaniya-poroshka/promyshlennoe-vibratsionnoe-sito-vs-04/>

76. Фарбування за Грамом [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://studopedia.com.ua/1_229434_tehnika-farbuвання-za-gramom.html

77. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
https://www.researchgate.net/figure/Bacillus-megaterium-colonies_fig6_6077428
78. Метод Коха [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://studfiles.net/preview/6052473/page:3/>
79. Концентрація біомаси [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://studfiles.net/preview/5194349/page:18/>
80. Горюшкіна Т. Б, О. В. Остроухова. В. О, Солдаткін.О .П, Дзядевич С. В. Оптимізація методики визначення вмісту глюкози у виноматеріалі ензимним амперометричним біосенсором//– УДК 577.15:573.6. БІОТЕХНОЛОГІЯ. - 2009. – Т 2 , N 1. – . Ст . 89-93