



## РЕФЕРАТ

Представлено проект виробництва  $\beta$ -глюканази у вигляді рідини культивуванням штаму *Bacillus subtilis* ZJF-1A5, який синтезує на середовищі з мукою 14,26 г/л цільового продукту.  $\beta$ -глюканаза-ферментний біокаталізатор високого ступеня очищення і ферментативної активності, цей фермент каталізує 1,3 і 1,4 гликозидні зв'язку з  $\beta$ -глюканов, розбиває макромолекули в'язкого полімеру до низьков'язких ізомальтози і мальтотріози, та використовується для забезпечення чистоту суслу пива знижуючи в'язкість затору, підвищує екстрактивність суслу і прискорює фільтрування затору, а також впливає на краще і швидке освітленню пива під час дозрівання.

Розрахована потреба в бета-глюканазі, що складає  $G_{нд} = 2170$  кг/рік. Технологія виробництва субстанції складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів, підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, , титрантів, та ін.) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, інокуляторі та посівному апараті, виробничого біосинтезу, центрифугування культуральної рідини, дезінтеграції та екстракції бактеріальних клітин, очищення ферменту, та дозування та розлив готового ферментного препарату), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладений на 145 стор. друкованого тексту, містить 21 таблиць, 9 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (73 джерел) та графічної частини (6 креслень формату A1).

**Ключові слова:**  $\beta$ -глюканаза, фермент, штам-продуцент, бактерія *Bacillus subtilis* (ZJF-1A5), біосинтез, виділення, очищення.

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

КоА коензим А

ЦТК цикл трикарбонових кислот

УЗ ультразвук

УФ-ультрафільтрація

ПЛК-Програмований логічний контролер

ПК-персональний комп'ютер

АРМ-Автоматизоване робоче місце

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	8
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента....	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	12
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	20
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	24
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	26
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	26
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	26
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	28
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	29
3.5 Одержання посівного матеріалу.....	29
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту.....	32
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	32
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	33
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	35
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	35
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	35
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	38
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	39
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	50
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	54
РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс і розрахунок обладнання.....	64
6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів).....	65

6.2 Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу.....	66
6.3 Визначення кількості стадій вирощування посівного матеріалу.....	66
6.4 Розрахунок технологічного обладнання.....	84
РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання.....	90
РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми.....	97
РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва.....	114
9.1. Карта постадійного контролю.....	114
9.2. Мікробіологічний контроль.....	115
9.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	124
9.3.1. Концентрація біомаси.....	124
9.3.2. Концентрація цільового продукту.....	124
9.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	126
РОЗДІЛ 10. Автоматизація ділянки виробництва.....	128
ЛІТЕРАТУРА.....	138

## ВСТУП

На сьогоднішній день пиво є одним з найвідоміших алкогольних напоїв у всьому світі і кожен рік відсотки його виробництва зростають та з'являються все нові компанії виробництва пива. Всі заводи будь то великі компанії чи маленькі крафтові приватні пивоварні намагаються зробити процес отримання готової продукції більш автоматизованим та зменшити затрати на його виробництво, основною економічною задачею у виробництві пива є зниження його собівартості, чому служить використання високопродуктивного обладнання і скороченого технологічного циклу. При будівництві нових пивзаводів і реконструкції деяких старих встановлюють варильні агрегати великої одноразової засипки зернопродуктів. Очевидно, що приготування на них сусла не повністю збігається з аналогічним процесом на невеликих підприємствах. В сучасних варильних відділеннях пивзаводів необхідно інтенсифікувати виробничий процес зі зниженням енергоспоживання, максимально ефективно використовувати сировину, знизити кількість вторинних матеріальних ресурсів (дробини) і викидів в атмосферу, забезпечити ефективну роботу обслуговуючого персоналу.

І для того, щоб забезпечити виробництво пива швидшим, простішим, дешевшим та екологічнішим, майже всі виробники використовують ферменти, які забезпечують функціональні переваги чи переваги в процесі обробки. Все це дозволяє краще контролювати процес пивоваріння незалежно від типу операції або від того, які інгредієнти ви використовуєте[1].

Одним з найважливіших ферментів є  $\beta$ -глюканаза, що забезпечує чистоту сусла знижуючи в'язкість затору, підвищує екстрактивність сусла і прискорює фільтрування затору, а також впливає на краще і швидке

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мармаш І.С.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Гудзенко О.В.					6	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

освітленню пива під час дозрівання. Фермент використовується в пивоварінні, в процесі затирання, для забезпечення ефективності розщеплення бета-глюканів, пентозанів і інших слизнів. Дві основні причини поганого освітлення пива - це високий вміст бета-глюканів в суслі і надмірна завантаження фільтраційного чана. Високий вміст бета-глюканів також погіршує фільтрацію пива. Тому зниження завантаження і додавання бета-глюканази при затирання, звичайно, підвищує продуктивність фільтраційних чанів і фільтрів і дозволяє значно спростити і здешевити процес виробництва пива [2,3].

**Метою даної роботи** є проектування ділянки виробництва (апаратурна і технологічна схеми) субстанції  $\beta$ -глюканази бактерією *Bacillus subtilis*ZJF-1A5 у вигляді невязкої, прозорої рідини для подальшого очищення та розливання у каністри.

**Актуальність теми.**  $\beta$ -глюканаза ферментний біокатализатор високого ступеня очищення і ферментативної активності, що каталізує 1,3 і 1,4 гликозидні зв'язку з  $\beta$ -глюканов, розбиває макромолекули в'язкого полімеру до низьков'язких ізомальтози і мальтотріози. Тому  $\beta$ -глюканаза становить інтерес для вирішення проблеми забезпечення чистоти сусла пива, підвищення екстрактивності сусла і прискорення фільтрування затору, а також кращого і швидшого освітлення пива під час дозрівання, що є досить важливим питанням у пивоварінні для багатьох країнах світу, у тому числі й в Україні.

**Новизна.** Біологічний агент *Bacillus subtilis*ZJF-1A5 є єдиним бактеріальним продуктивним продуцентом  $\beta$ -глюканази – концентрація цільового продукту становить 14.26 г/л. Як ростовий субстрат використовується дешева сировина кукурудзяна та ячмінна мука.

Метод виділення цільового продукту дозволяє збільшити вихід  $\beta$ -глюканази до 90 % .

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Бета-глюканаза - Фермент отриманий з високоякісного мікроорганізму шляхом глибинної рідкої ферментації і очищення, цей фермент каталізує 1,3 і 1,4 глікозидні зв'язки з  $\beta$ -глюканів, розбиває макромолекули в'язкого полімеру до низькоякісних ізоматоза і мальтотриози.

Бета-глюканаза здатна знизити в'язкість суслу і покращити якість готової продукції.

Сфери застосування:

- кормовиробництво (збільшення поживної цінності кормів, гідроліз некрохмальних полісахаридів і білків кормів)
- харчова промисловість (гідроліз некрохмальних полісахаридів, зменшення в'язкості розчинів, збільшення виходу цільового продукту).
- Фермент бета-глюканазу застосовують у виробництві етилового спирту;
- У целюлозно-паперовій промисловості ферментом обробляють волокнисті напівфабрикати перед помелом. Це дозволяє знизити витрати енергії на процес. Крім цього, поліпшується зневоднення розмеленої маси і підвищуються показники механічної міцності целюлози.
- Застосовують в пивоварінні для «виправлення» погано відфільтрованого пива, або пива, що має недостатню прозорість, викликану присутністю високомолекулярного бета-глюкана. Застосування ферментних препаратів в пивоварінні, гідролізуючих некрохмальні полісахариди дозволяє: знизити в'язкість суслу і пива і, тим самим, поліпшити їх фільтрованість; запобігти появі вторинних помутнінь. прискорює фільтрацію пива і суслу;

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Мармаш І.С.						8	
Керівник	Гудзенко О.В.					Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Фермент бета-глюканазу застосовують при переробці жита, при приготуванні замісу з жита і ячменю утворюється сусло з підвищеною в'язкістю, що ускладнює атакування крохмалю амілолітичними ферментами[4]

Основні фізико-хімічних властивості ферменту:

Хімічна формула

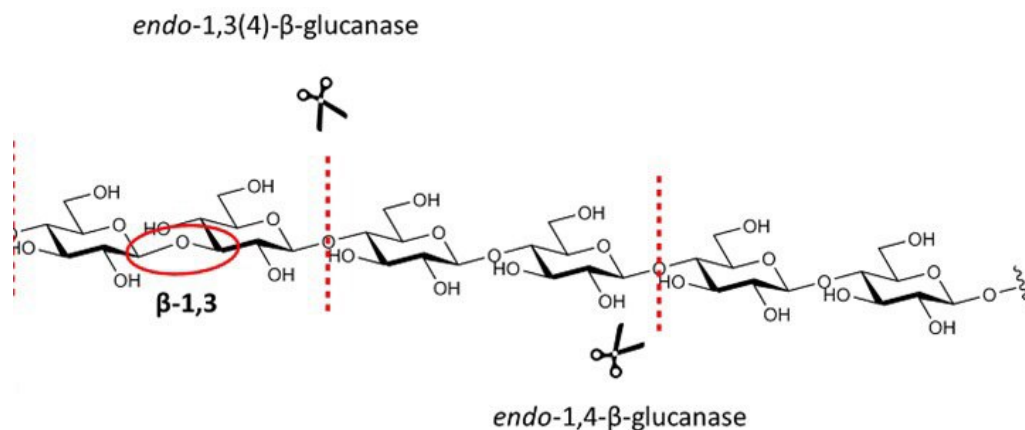


Рис.1.1.ендо-1,3(4)-β-глюканаза[5]

- Молекулярна маса - 26750
- Температурний оптимум 48° С
- Температурна стабільність 30 до 70 °С.
- Активність~ 240 Од / мг
- Ізоелектрична точка- 9
- Стабільність рН 4 -7,5
- Оптимальний рН 6,5 - 7,0[6].

Всі β-глюканаза є кислими білками, що містять велику кількість карбоксильних і гідроксильних груп. Ці ферменти є гликопротеїдами, вони мають вуглеводні фрагменти, що містять залишки манози, глюкози, галактозих[7].

β-глюканаза становлять значний інтерес як компонент ферментних препаратів для пивоваріння, а також для отримання глюкози з природної сировини, що містить β-глюкан, для руйнування клітинних стінок рослин і мікроорганізмів з метою більш повної екстракції корисних речовин і для утилізації відходів мікробіологічних виробництв.

Розглянемо, як приклад ферментних препаратів «Альфааза АПЗ».

Альфааза АПЗ - комплексний препарат, отриманий при культивуванні спеціального відібраного штаму *Bacillus subtilis*. Препарат являє собою збалансовану суміш  $\alpha$ -амілази, нейтральної протеази і  $\beta$ -глюканаза.

#### Типові характеристики

Зовнішній вигляд: не в'язка, прозора рідина темно-коричневого кольору

Питома щільність: 1,1-1,15 г / см<sup>3</sup>

Клас: харчовий

#### Активність

Визначається по ГОСТ 20264-4-89

Амілолітична активність (АС) - 480 од. / г

Протеолітична активність (ПС) - 45 од. / г

$\beta$ -глюканазна активність (( $\beta$ -ГЛА) - 420 од. / г

Оптимальні умови наведені в *Таблиці 1.1*:

*Таблиця 1.1*

#### **Температурна і рН залежність**

Найменування ф / п	Діапазон рН	Температура, ° С
$\alpha$ -амілаза	5,0-7,5	70-80
Протеіназа	5,0-8,5	50-60
$\beta$ -глюканаза	5,0-7,5	55-65

#### Рекомендоване використання

- Альфааза АПЗ - ф / п застосовують на стадії затирання при переробці солоду зниженого якості з метою підвищення виходу екстракту, поліпшення

оцукрювання, зменшення в'язкості сусла, скорочення часу фільтрації і оптимізації змісту  $\alpha$ -амінного азоту.

- При використанні несоложеним зернопродуктів до 50% при переробці солоду високої якості.

#### Дозування

0,1 - 0,2 кг - на 1 т. солоду

0,1-1,0 кг - на 1 т. несоложеної сировини

#### Умови зберігання

Альфалазу АПЗ зберігають в сухому прохолодному приміщенні, подалі від сонячних променів при температурі не вище 25 ° С.

Гарантійний термін зберігання - 12 місяців без втрати активності.

#### Упаковка

Препарат розфасовується в каністри по 25 кг

#### Безпека і поводження з препаратом

Уникати вдихання пилу від препарату. У разі контакту препарату зі шкірою та очима, промивати щонайменше протягом 15 хвилин[8].

## РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Вибраним мною біологічним агентом є *Bacillussubtilis*, який є продуцентом β-глюканази. β-глюканаза - це ферментний біокаталізатор високого ступеня очищення і ферментативної активності, отриманий з високоякісного мікроорганізму шляхом глибинної рідкої ферментації і очищення, цей фермент каталізує 1,3 і 1,4 глікозидні зв'язки з β-глюканів, розбиває макромолекули в'язкого полімеру до низьков'язких ізомальтози і мальтотріози[9].

Мікроорганізм *B. subtilis* ZJF-1A5 був виділений з ґрунту і мутований ультрафіолетом та діетилсульфатом[10].

Також, є інші мікроорганізми, які здатні синтезувати β-глюканазу наприклад такі, як *Trichodermaharzianum*, *Rhizopusmicrosporus* var. *microsporus* та *Bacillussubtilis* ВКПМ В-3936.

Але в порівнянні з ними вибраний мною біологічний агент *Bacillussubtilis*ZJF-1A5 має більше переваг.

Порівняння характеристик цих організмів наведено в *табл. 2.1*.

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Мармаш І.С.					12	
Керівник		Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

## Характеристика продуцентів β-глюканази

Продуцент	Склад поживного середовища (% , г/л)	Умови культивування	Ферментативна активність (од/мл)	Література
<i>Bacillus subtilis</i> ZJF-1A5	ячмінне борошно 63,5; кукурудзяне борошно 44,8; КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> -1.0; MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O-0,1; CaCl <sub>2</sub> -0,1.	рН 7 протягом 36 годин, при 37 °С з перемішуванням (200 об / хв).	131	<i>Tang, X.-J., He, G.-Q., Chen, Q.-H., Zhang, X.-Y., &amp; Ali, M. A.</i> Medium optimization for the production of thermal stable b-glucanase by <i>Bacillus subtilis</i> ZJF-1A5 using response surface methodology// <i>Bioresource Technology</i> .-2004.- Vol.93.-P.175–181[10].
<i>Trichoderma harzianum</i> 1051	бактопептон-1, глюкоза-0.2, хітин -5. сечовина-0.3 КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> -2, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -1.4, MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O-0.3, CaCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O-0.3; 1 - 0,1% мікроелементного розчину Fe <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Mn <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	рН 5,5 протягом 72 годин при 28 °С з перемішуванням (250 об / хв).	0,270	<i>Marco, J. L. de, &amp; Felix, C. R.</i> Purification and Characterization of a β-Glucanase Produced by <i>Trichoderma harzianum</i> Showing Biocontrol Potential//2007.- Vol.50, N. 1. P. 21-29[11].

<p><i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i></p>	<p>батопептон-0.03, глюкоза-0.2, хітин-5, сечовина- 0.03, агар-20. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-1.4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-0.3, CaCl<sub>2</sub>-0.152, 1- 0,01% розчинів мікроелементів Fe<sup>+2</sup> Mn<sup>+2</sup> Zn<sup>+2</sup> Co<sup>+2</sup></p>	<p>pH 6,8 протягом 24 годин при 40 ° C. з перемішуванням (120 об / хв)</p>	<p>0,197</p>	<p><i>Celestino, K., Cunha, R. B., &amp; Felix, C. R.,</i> Characterization of a β-glucanase produced by <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>, and its potential for application in the brewing industry// BMC Biochemistry.- 2006.-Vol.7(1).- P.23[12].</p>
<p>*<i>Bacillus subtilis</i> ВКПМ В-3936</p>	<p>нерозчинний крохмаль -239.0, кукурудзяний екстракт – 11.4, дріжджі пивні -2.2, лактоза- 0.6, амоній фосфорнокислий, 2-заміщений- 8.4, CuSO<sub>4</sub>– 0.0036, NaCl- 0.28, MgSO<sub>4</sub>. 0.15, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-2.9, CaCl<sub>2</sub>-0.45, H<sub>2</sub>O-до 1 л.</p>	<p>pH 6,5 протягом 72 годин 37°C з перемішуванням (180-2400 об / хв)</p>	<p>41,6</p>	<p>Пат.2046141 РФ, Штамм бактерій <i>bacillus subtilis</i>- продуцент комплексу гідролитических ферментов, обогащенных β – глюкоканазой/ <i>Бочкарева Н.Г.;</i> <i>Белогорцев Ю.А.;</i> <i>Удалова Э.В.</i> та ін.- Опубл. 20.10.95[13].</p>

Виходячи з даних, які наведені в таблиці(табл. 2.1), можна відмітити переваги та недоліки кожного з продуцентів порівняно з обраним мною (*B. subtilis* ZJF-1A5):

- *Trichoderma harzianum*:

- Недоліки: має більшу кількість компонентів поживного середовища, більш тривалий період культивування та дуже малу ферментативну активність.
- Переваги: температура нижче і витрат на неї менше .

- *Rhizopus microsporus var. microsporus*:

- Недоліки: потребує більшої кількості кожного з компонентів поживного середовища, потрібно підтримувати вищу температуру культивування, і має низьку ферментативну активність.
- Переваги: менша потужність.

- *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3936:

- Недоліки: має велику кількість компонентів поживного середовища, більш тривалий період культивування та більшу потужність, менша активність порівняно з обраним мною штамом.
- Переваги: ферментативна активність порівняно з грибами значно більша

Отже, найбільш вигідним для використання у промисловості для виробництва  $\beta$ -глюканази є *Bacillus subtilis* ZJF-1A5, так як він має ряд переваг серед розглянутих вище продуцентів.

Також, порівнюючи вартість поживного середовища для кожного продуцента, яке наведено в табл. 2.2, можна відмітити пріоритетність вибору саме обраного мною штаму *Bacillus subtilis* ZJF-1A5.

**Вартість компонентів поживних середовищ для культивування *Bacillus subtilis* ZJF-1A5, *Trichoderma harzianum* 1051, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3936**

Продуцент	Компонент середовища, г/л	Ціна компонента, грн./кг	Ціна компонента на 1 л середовища, грн	Джерело
<i>Bacillus subtilis</i> ZJF-1A5	Склад поживного середовища для вирощування інокуляту			
	Ячмінне борошно 63,5 [1]	24	1,52	1
	кукурудзяне борошно 44,8; [2]	30	1,34	2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -1.0 [3]	55	0,06	3
	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O-0,1 [4]	12	0,001	4
	CaCl <sub>2</sub> -0,1 [5]	27	0,003	5
	Вартість 1 л середовища для культивування – 2,92 грн			
<i>Trichoderma harzianum</i> 1051	Склад поживного середовища для ферментації			
	бактопептон-1 [6]	720	0,72	6
	глюкоза-0.2 [7]	50	0,01	7
	хітин -5 [20]	935	4,7	8
	сечовина-0.3 [8]	31	0,01	9
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -2 [3]	55	0,1	3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -1.4 [9]	50	0,07	10
	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O-0.3 [4]	12	0,004	4

Продовження таблиці 2.2

	CaCl <sub>2</sub> х 6H <sub>2</sub> O-0.3 [5]	27	0,01	5
	1 мл- 0,1% мікроелементного розчину Fe <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> [10]	265	0,3	11
	Вартість 1 л середовища для культивування –5.9 грн			
<i>Rhizopusmicrospor</i> <i>usvar. microsporus</i>	батопептон-0.03 [6]	720	0,02	6
	глюкоза-0.2 [7]	50	0,01	7
	хітин-5 [20]	935	4,7	8
	сечовина- 0.03 [8]	31	0,001	9
	агар-20 [11]	650	13	12
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -2 [3]	55	0,1	3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -1.4 [9]	50	0,07	10
	MgSO <sub>4</sub> х7H <sub>2</sub> O-0.3 [4]	12	0,004	4
	CaCl <sub>2</sub> -0.152 [5]	27	0,004	5
	1 мл- 0,1% розчинів мікроелементів Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , [10]	265	0,3	11
	Вартість 1 л середовища для культивування –18.2грн			
<i>Bacillusubtilis</i> ВКПМ В-3936	нерозчинний крохмаль -239.0, [12]	21	5,02	13

Закінчення таблиці 2.2.

кукурудзяний екстракт – 11.4 [13]	259	3	14
дріжджі пивні - 2.2 [14]	40	0,1	15
лактоза- 0.6, [15]	49	0,03	16
амоній фосфорнокислий, 2-заміщений- 8.4, [16]	70	1	17
NaCl- 0.28,[17]	65	0,02	18
MgSO <sub>4</sub> - 0.15, [4]	12	0,002	4
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -2.9,[18]	24	0,1	19
CaCl <sub>2</sub> -0.45,[5]	27	0,01	5
CuSO <sub>4</sub> - 0.0036,[19]	79,95	0,0003	20
Вартість 1 л середовища для культивування – 9,3 грн			

Примітка: \* - ціни наведено, станом на 2019 рік

Джерела: 1-<https://prom.ua/p518399490-muka-yachmennaya.html>

2-<https://prom.ua/p685734021-muka-kukuruznaya-1kg.html>

3-<https://prom.ua/p593711259-digidroortofosfat-kaliya.html>

4-<https://prom.ua/p41851476-sulfat-magniya-mnogovodnyj.html>

5-<https://prom.ua/p148481371-kaltsij-hloristyj-hlorid.html>

6-<https://www.systopt.com.ua/ru/pepton-fermentatyvnyj-2/>

7-<https://prom.ua/p705871106-glyukoza-pischevaya-fasovka.html>

- 8-<https://prom.ua/p878526088-karbamid-mochevina-1kg.html>  
 9-<https://prom.ua/p610428073-ammonij-sernokislyj-sulfat.html>  
 10-<https://prom.ua/p30288912-pitatelnyj-rastvor-universalnyj.html>  
 11-<https://prom.ua/p175934153-agar-agar.html>  
 12-<https://prom.ua/p646574686-krahmal-kartofelnyj.html>  
 13-<https://prom.ua/p596725985-kukuruznyj-ekstrakt-csl.html>  
 14-<https://prom.ua/p379698986-drozhzhi-pivnye-kormovaya.html>  
 15- <https://prom.ua/p23118286-laktoza-pishevaya-1kg.html>  
 16-<https://prom.ua/p266087020-ammonij-fosfornokislyj-dvuzameschennyj.html>  
 17-<https://prom.ua/p907643454-natrij-hloristyj-farm.html>  
 18-<https://prom.ua/p662883829-sulfat-kaliya.html?primelead=MS4xMQ%3D%3D>  
 19-<https://prom.ua/p621244073-sulfat-mednyj-kuporos.html>  
 20-<https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-supply-top-quality-chitin-chitosan-with-fast-delivery-60813890620.html?spm=a2700.8699010.normalList.26.4d04eba3osFndX>

Таблиця 2.3.

**Умовна вартість 1 г продукту (бета-глюканази) при культивуванні**

<b>Біологічний агент</b>	<b>Вартість 1 л середовища, грн.</b>	<b>Фермента-тивна активність од/мл</b>	<b>Тривалість культивування, год</b>	<b>Ферментативна Активність за годину, од/год</b>
<i>Bacillus subtilis</i> ZJF-1A5	2,92	131	36	3,64
<i>Trichoderma harziana</i> <i>num</i> 1051	5,9	0,270	72	0,004
<i>Rhizopus microsporus</i> <i>var. microsporus</i>	18,2	0,197	24	0,01
<i>Bacillus subtilis</i> ВКПМ В-3936	9,3	41,6	72	0,6

На основі приведених порівняльних таблиць 2.1, 2.2 і 2.3 бактерії роду *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 і *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3936 та грибів *Trichoderma harzianum* 1051 і *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, продуцентів бета-глюканази було визначено, що *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 є більш ефективнішим штамом, адже він має більшу продуктивність менший за витратами та здатний до надсинтезу.

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

### **Морфолого-культуральні ознаки**

*Bacillus subtilis*, відома також як сінна паличка чи трав'яна бацила, грампозитивна ґрунтова бактерія. Має паличкоподібну форму і здатна утворювати захисні ендоспори.

Вперше вона була описана Крістіаном Готтфрідом Еренбергом в 1835 році і названа *Vibrio subtilis*. В 1872 році була перейменована Фердінандом Коном на *Bacillus subtilis*.

Клітини *B. subtilis* (рис. 2.1) видовжені, вузькі (3–5x0,6 мікрон). Під час фарбування за Грамом спостерігається забарвлення клітин в фіолетовий колір. При вирощуванні *B. subtilis* на агаризованих середовищах спостерігається утворення колоній таких типів (рис. 2.2) : плоскі, широкі, блискучі; плоскі, тусклі, злегка маслянисті; зморщені з піднятою складчастістю. У *B. subtilis* нараховується від 5 до 10 типів колоній на різних агаризованих середовищах. На рідких поживних середовищах *B. subtilis* утворює пластівцевоподібний, комковатий осад, іноді росте у вигляді плівки. Росте на МПА, МПБ, а також на середовищах, що містять рослинні залишки, на простих синтетичних живильних середовищах для гетеротрофів.

На шматочку картоплі зростання рясний у вигляді сірувато - білого товстої зморшкуватою плівки. На поверхні мясопептонного агару культура 65 утворює тонку плівку жовтувато - білого кольору, бульйон залишається прозорим [14,15].

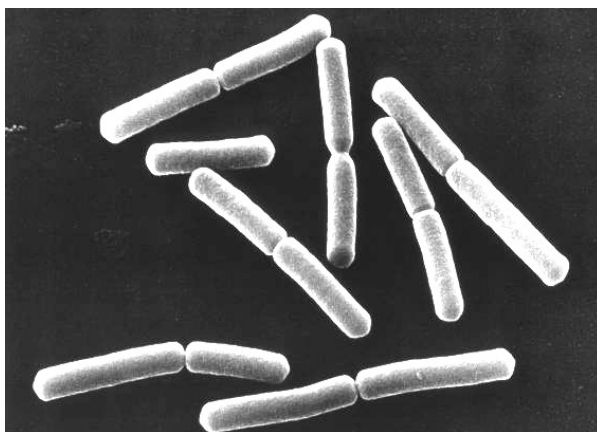


Рис. 2.1. Мікрофотографія *B. subtilis*[16]

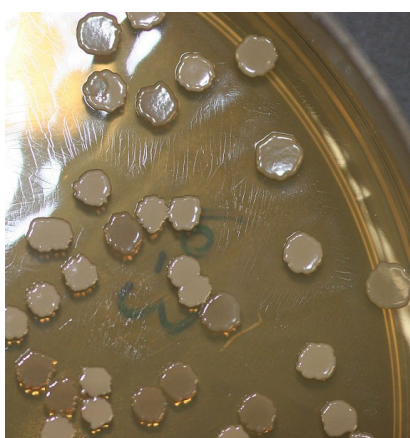


Рис. 2.2. Колонії *B. Subtilis*[17]

Однією із постійних ознак *B.*

*subtilis* є утворення ендоспор при вирощуванні їх в аеробних умовах.

Спороутворення розглядається як важкий процес диференціювання. Розвиток спор починається, коли популяція вегетативних клітин переходить в стаціонарну фазу. В період, перед споруляцією, в клітині знаходяться 2 нуклеотида (0-стадія), які з'єднуючись, утворюють паличковидну структуру (1 стадія). Відбувається поява поперечної перегородки (септи) біля одного з полюсів клітини (2 стадія). В результаті формування септи від вегетативної клітини відділяється частина клітини, яка перетворюється в спору.

Менша клітина містить цитоплазму, ДНК, мембрану. Поступово мембрана великої клітини обвиває малу і, таким чином мала перетворившись в проспору, стає як би поглинутою материнською клітиною (3 стадія).

Проспора представляє собою протопласт, оточений двома шарами мембран. Далі відбувається формування нових поверхневих структур: між внутрішньою і зовнішньою мембранами закладається кортекс (4 стадія). На поверхні зовнішньої мембрани утворюється більш електроннощільний шар – оболонка спори (5 стадія). 6 стадія – формування спори. Відбувається синтез дипіколінової кислоти. 7 стадія – лізис клітини і вивільнення спори. Весь процес споруляції триває 8 годин.

У *B. subtilis* наявна капсула полісахаридної природи. Вважають, що біополімери капсули синтезуються назовні поверхні цитоплазматичної мембрани і виділяються на поверхню клітинної стінки в певних специфічних її ділянках. Також *B. subtilis* виділяє слизові речовини полісахаридної природи. Характерна наявність перитрихіально розміщених джгутиків.

#### **Фізіолого-біохімічні ознаки**

До найбільш важливих властивостей сінної палички варто віднести їх здатність підвищувати кислотність середовища і продукувати антибіотики. Ці бацили є антагоністами для дріжджових грибків, сальмонел, амеб протей та дизентерійної, стрепто-і стафілококів. В процесі життєдіяльності сінні бацили синтезують амінокислоти, антибіотики, ферменти та імуноактивні речовини.

Досить добре вивчені шляхи засвоєння вуглеводів бактеріями роду *Bacillus*. У бацил наявний гліколітичний шлях розщеплення вуглеводів (дисиміляція глюкози) незалежно від наявності в середовищі кисню. В аеробних умовах клітини *B. subtilis* використовують від 60 % до 70 % глюкози за шляхом Ембдена – Мейергофа, іншу частину гексозомонофосфатним шляхом. При температурі інкубації 37°C клітини *B. subtilis* при поглинанні 1 моля глюкози утворює 4 моля АТФ, а при підвищенні температури і концентрації глюкози тільки 2 моля АТФ на моль глюкози, яка споживається. *B. subtilis* характеризується респіраторним енергетичним метаболізмом, проте в анаеробних умовах ця культура зброджує глюкозу з утворенням 2,3-бутандіола, оцтової кислоти, етанолу, гліцерину, CO<sub>2</sub>.

Більшість аеробних спороутворювальних бактерій – мезофіли. Оптимум їх розвитку знаходиться в межах 30 – 40°C. Із гарячих джерел Камчатки з температурою води 50 – 93°C і рН 6,3 – 7,3 виділені спороутворювальні бактерії з температурним оптимумом розвитку біля 65°C. Це *B. subtilis*. Можливо, що багато термофільних бактерій представляють собою варіанти мезофільних видів. Термофільні бактерії відрізняються підвищеною біохімічною активністю. Їх ферменти більш стійкі до нагрівання і денатуруючих сполук, ніж ферменти мезофілів. Серед бацил знайдені психрофільні форми, які мають здатність розмножуватись і утворювати спори при низьких температурах. Так, *B. subtilis* розмножуються при температурі 7°C і нижче. Мінімальна температура розвитку психрофілів 5°C. Але їх здатність існувати при високих температурах обмежена [14].

Оптимум рН для розвитку *B. subtilis* – 7 (крайні значення рН 8 і 2), тобто це нейтрофіли. Сінна паличка переносить концентрацію солей в середовищі від 2 до 25 %.

Розмножується *B. subtilis* шляхом поділу клітини, які відбуваються після розподілу нуклеотидів. Варто відмітити, що у *B. subtilis* не спостерігалося повного розділення клітин навіть при повному завершенні процесу поділу [16].

*B. subtilis* являється хемоорганогетеротрофом. В якості субстратів окислення використовують прості вуглеводи (моно- і дисахариди), деякі полісахариди (декстрин, крохмаль), органічні кислоти і спирти, а також складні високомолекулярні вуглеводи, частково пектин. Оптимальні умови вирощування – температура 30°C, рН 6,5 – 7,0. Також встановлено, що бактерія здатна окислювати такі вуглеводні, як парафін та гексадекан. Також відомо, що сінна паличка не потребує додаткових факторів росту, тобто вона є прототрофом [16,18].

Тип цитохромної системи залежить від умов живлення і стадії культивування. В мембранах вегетативних клітин сінної палички виявлені цитохроми типу а, с, b, аа3. Вміст цитохромоксидази значно вищий в

вегетативних клітинах, ніж в клітинах, які знаходяться в стані споруляції. На середовищі з глюкозою цитохромів aa3 більше, ніж на середовищі з гідролізатом казеїна. Наявність у спорових бактерій різних механізмів переносу електронів обумовлює відмінність їх фізіологічних ознак при культивуванні в різних умовах.

Клітинна стінка жорстка. Вона складається з пептидоглікану, полімеру цукрі та амінокислот. Пептидоглікан бактерій – муреїн. Інші складові клітинної стінки – тейхоєві, ліпотейхоєві кислоти, білки.

Тейхоєві кислоти являють собою гетерополімери гліцерофосфата чи рибітфосфата, цукру. Тейхоєві кислоти *Bacillus subtilis* в експоненційній фазі росту містять біля 30 % всього запасу фосфору клітини. Також в цитоплазмі клітин сінної палички наявні включення. В якості запасних поживних речовин міститься глікоген, ліпіди, волютин.

### 2.3 Таксономічний статус

Згідно з IX виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій (фенотипові систематика) *BacillusSubtilis* відносяться до

Царство-*Archaea*

Відділ-Firmicutes

Клас-*Bacill*

Ряд-*Bacillalus*

Порядок-*Bacillales*

Родина-*Bacillaceae*

Рід-*Bacillus*

Вид-*BacillusSubtilis*

В останньому виданні Визначника Бергі описано 22 види роду *Bacillus*, які становлять першу групу. Види роду *Bacillus* розділені в три морфологічні групи. *BacillusSubtilis* відноситься до першої групи, клітини якого не роздуваються при спороутворенні; спори еліпсоподібні чи циліндричні, розміщені центрально чи термінально. Види першої морфологічної групи підрозділяються на дві підгрупи: підгрупа А і підгрупа Б.

*Bacillus Subtilis* відносять до підгрупи Б. Культура характеризується відсутністю глобул в протоплазмі клітин.

В таксономічних дослідженнях роду *Bacillus* на теперішній час застосовуються методи генетичного аналізу. В клітинах аеробних сорових бактерій молярний вміст ГЦ-основ становить 32-65% загальної кількості основ ДНК. За молярним вмістом ГЦ-основ в молекулі ДНК були вивчені наступні групи: 1 група; 2 група; 3 група. *Bacillus Subtilis* відноситься до першої групи (41,5-47,7%).

Положення згідно книги «*Prokaryotes*» (1999-2001 рр., філогенетична класифікація) рід *Bacillus* відносять до грампозитивних бактерій, які утворюють одну групу, яка складається з двох підгруп. Рід *Bacillus* входить до першої підгрупи «*Clostridium*» (з низьким вмістом ГЦ у ДНК)[19].

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1 Потреба у цільовому продукті

Одним з найбільш поширених алкогольних напоїв в Україні і в світі пиво. В Україні пиво споживають 60% людей і кожен такий українець випиває 42 літри пива в рік тому існує потреба у виробництві якісного і очищеного пива.

Однією з головних ферментних добавок для виробництва пива є бета-глюконази.

Наявність в препараті даного ферменту суттєво впливає на реологічні властивості жита і ячменю, і утворює при цьому в додатковій кількості зброджувані вуглеводи, веде до збільшення виходу спирту, поліпшення фільтрації пивного сусла.

Бета-глюканаза руйнує полісахариди глюкани, що призводить до більш легкої фільтрації та більш чистого сусла. Допомогає позбутися від помутніння сусла.

Особливо актуально застосовувати цей фермент при кислотою паузи, для соложеного (жита, вівса, кукурудзи).

### 3.2 Розрахунок потужності виробництва

На сьогоднішній день існує потреба у забезпеченні пивзаводи та пивоварні додатковими ферментами, такими як бета-глюканаза. Яку використовують під час кислотної паузи для:

- Більш легкої фільтрації та більш чистого сусла.
- Допомогає позбутися від помутніння сусла.
- Особливо актуально застосування цієї паузи, в разі застосування несоложені (жита, вівса, кукурудзи). [20].

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Мармаш І.С.					26	
Керівник		Гудзенко О.В.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						Кафедра БТМ

**Вихідні дані для розрахунку річної потреби  $\beta$ -глюканазі, що входить до складу для забезпечення пивзаводів України**

Доза препарату у складі солоду г/т [21]	Тривалість споживання, рік	Кількість препарату на 100 л пива,г [22]	Кількість виробленого пива на 2018 рік в Україні, л [23]	Загальна кількість препарату, кг
150	1	0,3	180 млн 841,2 тис.	72337

Згідно технології виробництва пива [21], на 100 л пива йде 17 кг солоду. Отже, розраховуємо кількість препарату на 100 л пива, якщо на 1 т йде 150 г препарату.

$$150 \text{ г} - 1 \text{ т} = 1000 \text{ кг}$$

$$X - 17 \text{ кг}$$

$$X = 0,4 \text{ г}$$

Згідно статистики [22] в Україні виробляється л пива за рік.

Знаючи дозу препарату у складі 100 л пива розраховуємо потрібну кількість препарату для виробництва річного обсягу пива.

Складемо пропорцію

$$100 \text{ л} - 0,4 \text{ г}$$

$$18084120000 \text{ л} - X$$

$$X = 72336480 \text{ г} = 72337 \text{ кг}$$

В Україні виготовляється та імпортується з-за кордону велика кількість препаратів для виробництва пива, в склад яких входить бета-глюканазя. Прикладом є та інші.

Приймаємо, що на виробництві буде вироблятися 3% від загальної потреби.

$$G_{\text{гп}} = 72336480 \text{ г/рік} \cdot 0,03 = \approx 2170094,4 \text{ г} = 2170 \text{ кг}$$

Концентрація цільового продукту при біосинтезі становить 14,26 г/л [22].

Кількість необхідної культуральної рідини для отримання 2170 кг або 2170094,4 г препарату становить:

$$14,26 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$2170094,4 \text{ г} - x$$

$$x = 152180,5 \text{ л} = 152,2 \text{ м}^3$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (20%), необхідно отримати стільки культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 152180,5 / (1 - 0,2) = 190226 \text{ л}$$

### 3.3. Розрахунок об'єму ферментера для біосинтезу $\beta$ -глюканази

Розрахуємо, скільки потрібно отримати культуральної рідини за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадії приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ( $T_{\text{тр}}$ ) – 90, тоді кількість продукту на добу ( $G_{\text{нтд}}$ ) становитиме:

Кількість продукту на добу:

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нд}} / T_{\text{тр}} = 2170 / 90 = 24,11 \text{ кг/добу.}$$

Кількість готового продукту за цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нтд}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 24,11 \cdot 58 / 24 = 58,27 \text{ кг/цикл.}$$

де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу для *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 (48 год) [22] та час підготовки ферментера до роботи (10 год).

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot \text{СР}_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 58,27 \cdot 0,94 / 14,26 \cdot (1 - 0,2) = 3,4 \text{ м}^3$$

$P_{\text{кр}}$  – концентрація цільового продукту (концентрація  $\beta$ -глюканази – 14,26 г/л);

$\text{СР}_{\text{гп}}$  – вміст сухих речовин в готовому продукті;

$K_1$  – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій.  
( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження поверхневої культури (1 год)

Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нд}} / G_{\text{цк}} = 2170 / 58,27 = 37,2.$$

Округлюємо кількість циклів до цілого  $N_{\text{цк}} = 37$  [23].

Розраховуємо геометричний об'єм ферментера для отримання 3,4 м<sup>3</sup> культуральної рідини:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{кр}} / K_{\text{зап}} = 3,4 / 0,6 = 5,6 \text{ м}^3$$

де  $K_{\text{зап}}$  - коефіцієнт заповнення ферментера.

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{\Phi} = 6,3 \text{ м}^3$ . Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{кр}} / V_{\Phi} = 3,4 / 6,3 = 0,54 \text{ що не перевищує заданого значення [24].}$$

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу $\beta$ -глюканази *Bacillus subtilis* ZJF-1A5**

Знаючи, об'єм ферментатора (див. підрозділ 1.3) та кількість посівного матеріалу розраховуємо кількість стадій підготовки інокуляту та об'єми інокуляторів (посівних апаратів) для його одержання.

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 3,4 \text{ м}^3$  культуральної рідини. Зауваживши, що кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища, знаходимо необхідну кількість поживного середовища для культивування:

### **3.5. Одержання посівного матеріалу**

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 3,4$  культуральної рідини.

Враховуючи те, що втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря становлять 10%, розраховуємо робочий об'єм ферментера з урахуванням втрат:

$$V_{роб1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 3,4/(1-0,1) = 3,7 \text{ м}^3$$

Посівний матеріал штаму одержують у посівному апараті з робочим об'ємом  $V_{ф} = 6,3 \text{ м}^3$ .

Зауваживши, що кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить 10% від об'єму поживного середовища, знаходимо необхідну кількість поживного середовища для культивування:

$$V_{пс1} = V_{роб1}/(1+X_{ф}) = 3,7/(1+0,1) = 3,36 \text{ м}^3$$

Отже, кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 3,7 - 3,36 = 0,34 \text{ м}^3$$

За умови, що втрати у результаті краплевносу через колектор відпрацьованого повітря становлять 10%, підраховуємо кількість посівного матеріалу з урахуванням втрат:

$$V_{роб2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 340/(1-0,1) = 377,7 \text{ л}$$

Знаходимо кількість посівного матеріалу для ферментера, яка має становити 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{пс2} = V_{роб2}/(1+X_{па}) = 377,7/(1+0,1) = 343,4 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 377,7 - 343,4 = 34,3 \text{ л}$$

Кількість інокуляту  $V_{роб2} = 377,7 \text{ л}$  можна одержати під час культивування бактерій у посівних апаратах з геометричним об'ємом 630 л.

Для одержання 34,3 л посівного матеріалу враховуємо втрати у результаті краплевносу через колектор відпрацьованого повітря 10%:

$$V_{роб3} = V_{пм2}/(1-E_{ін}) = 34,3/(1-0,1) = 38,1 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{пс3} = V_{роб3}/(1+X_{ф}) = 38,1/(1+0,1) = 34,6 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для інокулята становить:

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 38,1 - 34,6 = 3,5 \text{ л}$$

Кількість інокуляту  $V_{\text{робз}} = 38,1$  л можна одержати при культивуванні в інокуляті з геометричним об'ємом, який беремо на замовлення 65 л.

Для одержання 3,5 л посівного матеріалу ми використаємо колби на качалці:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пмз}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_3) = 3500 / (750 \cdot 0,2) = 24 \text{ колб.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 24 качалочних колб об'ємом 750 мл[6].

Отже, процес підготовки інокуляту для виробничого біосинтезу у  $6,3 \text{ м}^3$  ферментері з коефіцієнтом заповнення 0,6 складається з 3 стадій.

Для отримання  $\beta$ -глюканази необхідно забезпечити виробництво ферментером об'ємом  $6,3 \text{ м}^3$ , посівним апаратом об'ємом 630 л, інокулятором на 65 л та 24 качалочними колбами.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 є глюкоза, яка утворюється при розщеплення крохмалю ячмінного та кукурудзяного борошна [10]. Згідно KEGG, катаболізм глюкози відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфофруктокінази 1 (КФ.2.7.1.11).

Глюкоза за участю глюкозоспецифічного ферменту (КФ 2.7.1.199) перетворюється на глюкозу 6-фосфат, де остання за дії глюкозо-6-фосфат ізомераз (КФ 5.3.1.9) перетворюється на  $\beta$ -D-фруктозу 6-фосфат. Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення  $\beta$ -D-фруктози 6-фосфат у  $\beta$ -D-фруктозу 1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на  $\beta$ -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)[25].

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Мармаш І.С.					32	
Керівник		Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

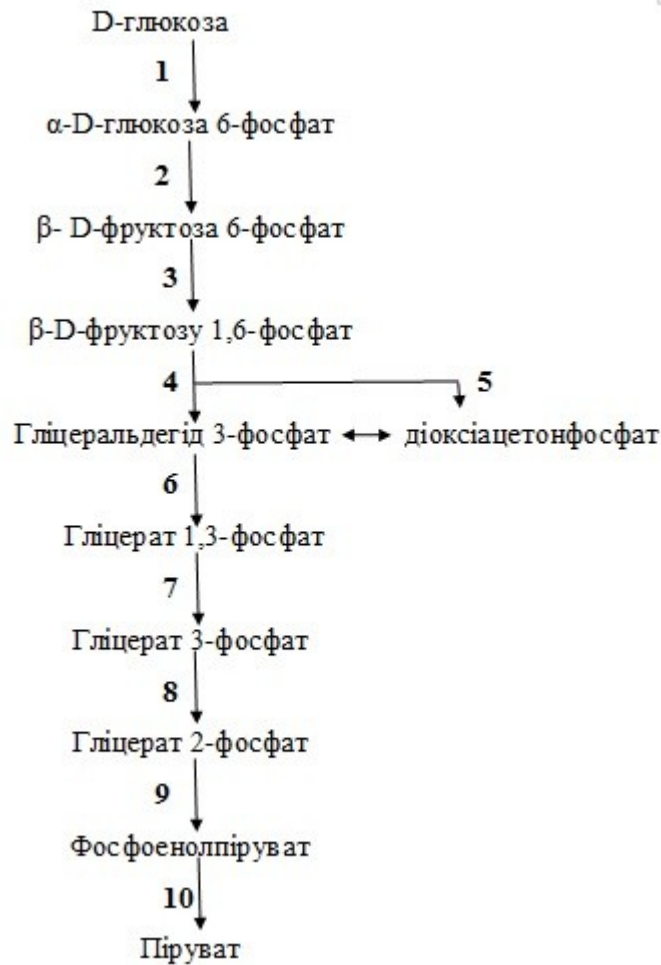


Рис. 4.1. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена-Месейргофа-Парнаса[27]

**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 – фруктозодифосфат 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)[27].

**4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт**

Джерелом вуглецю під час вирощування продуцента *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 є глюкоза, що у свою чергу залучається до гліколізу, кінцевим інтермедіатом якого є піруват.

Цільовим продуктом синтезу є фермент β-глюканаз. Оскільки ферменти мають білкову природу, то для їх утворення необхідно синтезувати

амінокислоти певних родин[26]. Далі наведено n-кінцева амінокислотна послідовність ферменту: Val-Ala-Lys-Glu-Met-Lys-Pro-Phe-Pro-Gln-Gln-Val-Asn-Tyr-Ser-Gly-Ile-Leu-Lys-Pro. Для синтезу амінокислот необхідно синтезувати необхідних їх попередників. На *рис. 4.2.* наведений перелік попередників синтезу амінокислот різних родин.

<b>Попередники біосинтезу амінокислот</b>	
<b>Попередник</b>	<b>Амінокислота</b>
Піруват	Аланін, валін, лейцин
Оксалоацетат	Аспарат, аспарагін, метіонін, лізин, треонін, ізолейцин
2-Оксоглутарат	Глутамат, глутамін, аргінін, пролін
3-Фосфогліцерат	Серин, гліцин, цистеїн
Фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат	Фенілаланін, тирозин, триптофан
5-Фосфорибозид-1-пірофосфат + АТФ	Гістидин

*Рис. 4.2.* попередники синтезу амінокислот [29]

Аланін синтезується з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Відновлення аспартату дає напівальдегід аспарагінової кислоти – попередник лізину та метіоніну. Дезамінування треоніну приводить до утворення 2-оксобутирату який в результаті послідовної дії чотирьох ферментів перетворюється на ізолейцин. Під дією чотирьох ферментів піруват перетворюється на валін. Пролін, аргінін та глутамін синтезуються із глутамату, який у свою чергу утворюється з 2-оксоглутарату. Серин синтезується з 3-фосфогліцерату.

Під час синтезу ароматичних амінокислот початковим етапом є конденсація еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват з утворенням C<sub>7</sub>-сполуки, яка піддається циклізації. Загальним проміжним продуктом синтезу ароматичних амінокислот є хоризмат. Утворення необхідних тирозину та фенілаланіну для синтезу ферменту здійснюється через префенат[28].

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

#### 5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

##### Обґрунтування способу культивування

Перш ніж обирати ферментер, який буде використовуватися для одержання  $\beta$ -глюканази бактеріями *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 необхідно визначити, які умови проведення процесу він повинен забезпечувати. Ці умови безпосередньо залежать від способу культивування і фізіолого-біохімічних особливостей продуцента.

- по відношенню до кисню– облігатний аероб;
- рН нейтральне, оптимальне значення для росту і біосинтезу становить 7;
- бактерія є мезофільною з температурним оптимумом 37°C ;
- здатен до утворення спор;

Зважаючи на те, що бактерія є облігатним аеробом і можливий ризик контамінації це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов, що не неможливо досягти при поверхневому(твердо-фазному) культивуванні.

Тому, використовуємо глибинний спосіб культивування з інтенсивним перемішуванням.

До того ж глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневимоскільки дозволяє:

- значно скоротити виробничі площі;
- виключити важку непродуктивну ручну працю;
- поліпшити гігієну праці;
- спрощує механізацію та автоматизацію виробництва;

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мармаш І.С.			<b>РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Гудзенко О.В.					35	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування;
- раціональніше використовуються живильні речовини середовищ, що дають можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого живильного середовища;
- отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю[30].

Також обов'язковою умовою культивування *B. Subtilise* безперервна аерація поживного середовища. Вона забезпечується шляхом подачі аераційного повітря через барботер. Барботер повинен забезпечувати стабільну аерацію середовища та складати 1 об'єм повітря на 1 об'єм культуральної рідини.

Для виробництво  $\beta$ -глюканази обираємо періодичний спосіб. Під час періодичного процесу культивування, внаслідок того, що субстрат вноситься лише один раз і споживається продуцентом протягом усього часу, можна досягти більш повного споживання субстрату мікроорганізмом.

Виробниче культивування і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 37°C і рН 7. Оскільки, при даних умовах розвивається переважна більшість мікроорганізмів, то постає питання про забезпечення асептичних умов під час отримання  $\beta$ -глюканази. Для перешкодження контамінації проводиться стерилізація обладнання (інокулятори, збірники, ферментери), комунікацій та поживних середовищ для культивування.

Отже, продуцент культивується періодично глибинним способом в аеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу.

### **Обґрунтування вибору типу ферментеру**

В залежності від умов культивування конструкція і облаштування ферментера може відрізнитися. Визначившись зі способом культивування та

фізіолого-біохімічними особливостями продуцента обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов.

1. Оскільки продуцент аероб потрібно забезпечення кисневих умов культивування. Для цього встановлюємо перемішувачий пристрій певної особливої конструкції і типу.

За конструкцією лопатей мішалки розрізняють:

- Лопатеві мішалки;
- Пропелерні мішалки;
- Турбінні мішалки;
- Спеціальні мішалки;

Зважаючи на всі особливості та характеристику мішалок, обираємо лопатеву мішалку с 4-6 лопотями та швидкістю 200 об/хв., оскільки вона має такі переваги:

- простота пристрою і дешевизна виготовлення;
- цілком задовільне перемішування помірно в'язких рідин;
- потребує меншої потужності, відповідно витрати на електроенергію будуть менші, що дозволяє здешевити процес;
- дозволяє забезпечити інтенсифікацію процесу[31].

2. Також потрібне аераційне повітря, тому ферментер повинен бути оснащений барботером.
3. Продуцент є мезофілом, тому оптимальною температурою для його вирощування є 37°C. Для забезпечення та підтримки певного температурного режиму необхідна наявність теплової сорочки з подачею до неї нагрітої води.
4. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком контролю рН.

Для забезпечення заданих умов культивування ферментер повинен бути обладнаний лопатевою мішалкою, барботером, сорочкою, датчиками для контролю рН, CO<sub>2</sub> та N<sub>2</sub>. Обираємо ферментер об'ємом 1 м<sup>3</sup>, з коефіцієнтом

заповнення<sup>0,7</sup>. Для даного мікроорганізму підходить ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу *Рис. 5.1*.



*Рис. 5.1* Ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу

### **5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря**

Оскільки бактерії-продуценти є аеробами вони, для високого синтезу біомаси мають забезпечуватися високим ступенем аерації. Для забезпечення високого очищення повітря використовують волокнисті та пористі матеріали. Оскільки стадії очищення повітря передбачають його звільнення від часточок різного розміру використовують фільтрувальні матеріали різної структури.

Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра.

Для підготовки повітря його забирають через повітрязабірну шахту висотою 30 м, аби повітря було максимально чистим, далі подається на фільтри грубої очистки (діаметр пор 21 мкм) де звільняється від великих часточок (ступінь очищення 80 %) такий відсоток очищення може дати фільтр

з грубим базальтовим волокном чи з тканиною Камінської, тож на даному етапі обираємо тканину Камінської, далі повітря під дією компресора стискається і подається переохолодження задля видалення зайвої вологи на краплевловлювач після воно подається на ресивер, щоб урівноважити його швидкість і звільнити від ривкової подачі, це необхідно для ефективної фільтрації повітря. Після цього воно подається на фільтри другого і третього ступенів очистки де очищається на 98 % такий ступінь очистки можуть дати фільтри типу НЕРА фільтр Петрянова, або фільтри на основі фторопласту. Обираємо фільтр на основі фторопласту оскільки він є дорогим, зате має надвисоку міцність і температурну стійкість порівняно з іншими до того ж дає не менш високий ступінь очистки. Перед ферментером повітря охолоджується до температури 30-40 °С, аби не мати негативного впливу на культуру і проходить через його індивідуальний фільтр(також обираємо фторопластиві фільтри)де очищається на 99,999 %[32].

### **Очищення відпрацьованого повітря**

Після проходження ферментерів відпрацьоване повітря подається на аналогічного типу фільтри де доочищається та знезаражується. Після цього викидається в атмосферу

### **5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

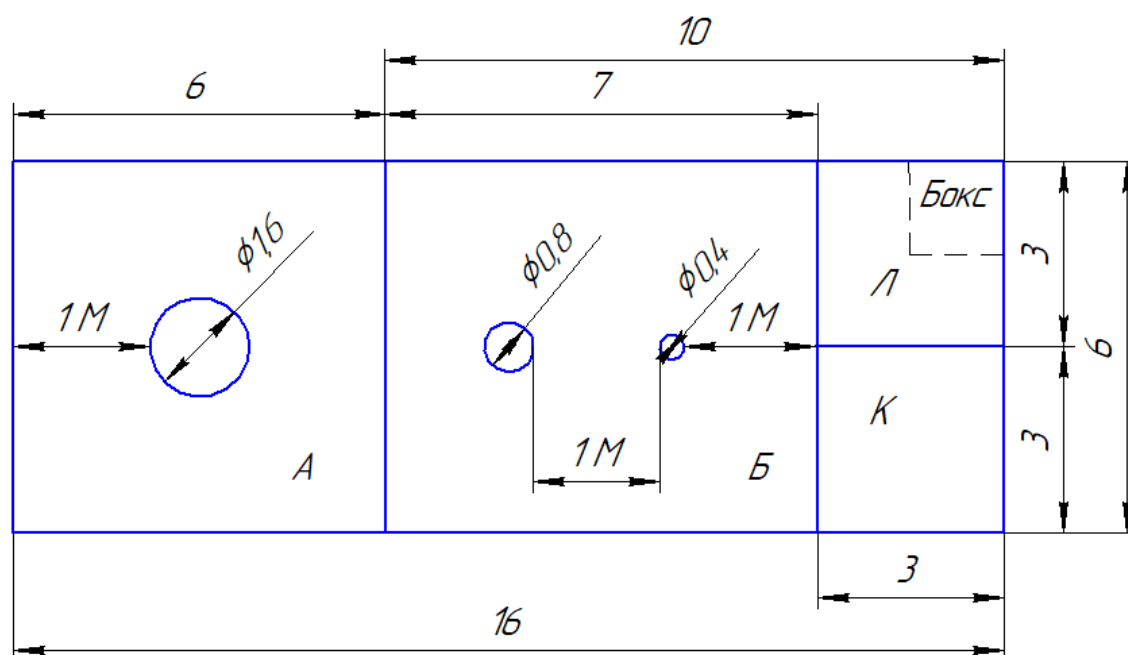
**Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень та вибору дезінфікувальних засобів.**

Підготовка виробничих приміщень має на меті забезпечення чистоти і асептичності процесу, тобто зведення до мінімуму механічних та мікробних забруднень. Процес підготовки включає проведення щоденного (вологе прибирання, обробка підлоги) та генерального прибирання (комплексне миття обладнання та виробничих приміщень). Планування допоміжних стадій виробництва має проводитися з врахуванням особливостей культивування продуцента  $\beta$ -глюканази *Bacillus subtilis* ZJF-1A5[33].

За даними ТЕО, виробництво цільового продукту здійснюється впродовж 90 днів. Генеральне прибирання проводиться щомісяця, щоденне –

перед кожною зміною (враховуючи кількість трудоднів – 90 разів). Після розрахунку кількості необхідних прибирань необхідно знайти приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 2,5 м [34].

Наводимо схему( рис. 2.1) розміщення обладнання з відповідними габаритами для розрахування площі приміщення.Слід звернути увагу, що виробництво буде розташовуватися у двох паралельних приміщеннях, оскільки виробничий ферментер має місткість 6,3 м<sup>3</sup> і потребує окремого приміщення для обслуговування.



**Рис.5.1 План виробничого приміщення для виробництва  $\beta$ -глюканази культивуванням *B.subtilis* ZJF-1A5**

На схемі позначено наступне обладнання:

А – цех виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу ( посівний апарат на 630 л, інокулятор на 65 л );

Б- цех виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу (ферментер 6,3 м<sup>3</sup>)

Л – мікробіологічна лабораторія (бокс та лабораторне устаткування);

К – приміщення з качалками.

Отже, виробництво включатиме наступні цехи: цех виробничого біосинтезу та цех вирощування інокуляту, качалочна кімната, мікробіологічна лабораторія, де знаходяться холодильники, термостати, бокс, автоклав, сухо жарові шафи, та біохімічна (технологічна) лабораторія, оснащена апаратурою для проведення різних видів контролю (рН-метр, хроматограф, ФЕК тощо) та ваги для приготування поживних середовищ. Відстань між стінами та апаратами становить 1,0 - 1,5 метра. Ширина проходів між ємнісними апаратами складає 1 метр.

Розраховуємо узагальнену площу поверхні обробки миючими засобами

Площа стін приміщення становить:

Для ферментера  $((6 \times 2,5) + (6 \times 2,5)) \times 2 = 60 \text{ м}^2$ .

Для посівного апарату та інокулятора  $((7 \times 2,5) + (6 \times 2,5)) \times 2 = 65 \text{ м}^2$ .

Для лабораторії та приміщення з качалками  $((3 \times 2,5) + (3 \times 2,5)) \times 2 = 30 \text{ м}^2$ .

Загальна площа стін приміщень для апаратів становить:

$$60 + 65 + 30 + 30 = 185 \text{ м}^2.$$

Загальна площа стін становить:

$$96 + 107 + 39 + 39 = 281 \text{ м}^2.$$

Площа підлоги – 96 м<sup>2</sup>. Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та дезинфікувати (таблиці.5.1).

Таблиця 5.1

### Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м <sup>2</sup>	Площа стін, м <sup>2</sup>	Загальна площа, м <sup>2</sup>
Цех виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу (ферментер 6,3 м <sup>3</sup> )	36	60	96

*Закінчення таблиці 5.1.*

Цех виробничого біосинтезу та вирощування посівного матеріалу	42	65	107
Мікробіологічна лабораторія	9	30	39
Приміщення з качалками	9	30	39
<b>Загальна площа</b>	<b>96</b>	<b>185</b>	<b>281</b>

Згідно наведених даних, загальний об'єм апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу, становить 6995 л або 7 м<sup>3</sup>.

Кількість виробничих циклів для синтезу бета-глюканази становить 37 циклів.

Оскільки миття обладнання відбувається після кожного циклу, кількість процесів миття за весь період виробництва приймаємо 37.

Підлогу необхідно мити кожного дня (відповідно до кількості трудоднів – 90 разів), а стіни, двері та вікна – 1 раз на місяць, тобто 3 рази. Чистота повітря в приміщеннях повинна відповідати встановленим нормам, отже, обираємо періодичність включення стельових бактерицидних ламп – 1 година після кожного генерального прибирання та 0,5 години кожного робочого дня.

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції наведено в табл. 5.2.

**Габаритні розміри основного обладнання для виробництва  
ферменту  $\beta$ -глюканазиди *B.Subtilis***

Об'єкт миття або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблювального об'єкту м <sup>2</sup>	Кількість процесів миття або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва м <sup>2</sup>
Обладнання, інвентар, комунікації	70	37	2590
Підлога	96	90	8640
Стіни, двері, вікна	185	3	555

*Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів для виробничого біосинтезу  $\beta$ -глюканазиди *Bacillus subtilis**

Щоб обрати дезінфікувальний чи миючий засіб, необхідно врахувати його вартість та витрати на оброблення потрібної площі виробничого приміщення. Середня витрати миючого чи дез. засобу становить 100 мл на 1 м<sup>2</sup> (згідно з методичними рекомендаціями рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502)[35].

Також миючі та дезінфікуючі засоби повинні бути доступними, вони повинні добре мити та дезінфікувати, а також бути безпечними для людини. Більшість обладнання виготовлено із нержавіючої сталі, а отже, миючі засоби не повинні входити з нею в реакцію.

Враховуючи такі вимоги, до миючих та дезінфікуючих засобів, як здатність забезпечувати повне змочування всіх поверхонь із різних конструкційних матеріалів, забезпечувати пом'якшення жорсткої води, необхідність забезпечувати повне видалення механічного, білкового та жирового забруднень шляхом їх диспергування та емульгування, а також бути найбільш ефективними, безпечними і недорогими, тому було проаналізовано наступні миючі та дезінфікуючі засоби: Каустична сода, Кальцинована сода, Хлоратоїн, Біомой, Гембар, Дезактін, Санікон.

Для порівняння миючих та дез. засобів їх вартості концентратів та їх витрати при виробництві наводимо *таблицю 5.4*.

- для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати мийнийзасіб «Каустична сода», «Біомой», «Кальцинована сода».

**Каустична сода**, як ще називають гідроксид натрію, є одним з найвідоміших і широко застосовуваних у різних галузях і побуті лугів. Має вигляд сильно гігроскопічний твердий лускатий або гранульований матеріал білого забарвлення з формулою NaOH. У воді розчиняється добре, з виділенням значної кількості тепла і формуванням мильної консистенції[36].

Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів.

**Кальцинована сода**являє собою зневоднений вуглекислий натрій ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі ( $55 \pm 5$ )°C розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до ( $45 \pm 5$ )°C їх мийна здатність різко

падає. Розчини кальцинованої соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007). У нативному вигляді та концентрованих розчинах подразнює шкіру і слизову оболонку очей Розчини кальцинованої соди не призначені для миття обладнання, комунікацій та інвентарю, які виготовлені з алюмінію[37].

**Біомой** - мийний засіб, що містить синтетичні поверхвоактивні речовини та протеолітичні ферменти (лужна фосфатаза). Являє собою порошок світлого кольору (від білого до світложовтого), який має помірний запах використаної сировини.

Розчинність у воді становить не менше 30 г/куб. дм. при 20 °С. Водні розчини біомою безбарвні, прозорі, виявляють мийні, емульгуючі та диспергуючі властивості, легко видаляють білково-жирову плівку з поверхонь технологічного обладнання, легко змиваються, не залишають нальоту. На відміну від інших мийних засобів, біомой виявляє високу мийну активність при температурі не вище (40 + - 5)°С. Розчини біомою не ушкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі. Не сумісні з катіонними поверхво-активними речовинами[38].

Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007), не виявляє кумулятивні, шкірянорезорбтивні та алергенні властивості. У сухому вигляді подразнює шкіру і слизову оболонку очей.

- для миття та дезинфекції стін, підлоги, та дверей –«Дезактін», «Гембар», «Санікон».

**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[39].

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.

**Дезактін** - дезінфекційний засіб з мийним ефектом виробництва ТОВ "ДЕЛАНА" (Україна). В якості АРД містить дихлорантин. До складу засобу введені аніонні поверхневоактивні речовини, диспергатор, наповнювач. Являє собою порошок від білого до жовтуватого кольору із слабким запахом хлору. Розчинність у воді не менше 20 мг/дм. Для прискорення розчинення дезактіну допускається використовувати теплу воду температурою  $(40 \pm 5) ^\circ\text{C}$ [40].

Водні розчини дезактіну прозорі, безбарвні, мають помірний запах хлору. Не кородують об'єкти, котрі виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, деревини, кахлю, порцеляни, фаянсу, а також поверхні технологічного обладнання та устаткування з лакофарбовим, полімерним та гальванічним покриттям, не фіксують білкові та жирові забруднення на оброблених поверхнях, виявляють змочувальні та мийні властивості, добре змиваються.

У сухому вигляді та концентрованих розчинах подразнює слизову оболонку очей.

Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника у критих складських приміщеннях не більше ніж у 3 яруси осторонь від джерел відкритого вогню та тепла.

Рекомендується використовувати 0.2 % розчини дезактіну для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю, технологічного та санітарно-технічного

обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари 1.0 % розчини дезактіну - для дезінфекції об'єктів, що контаміновані *Mycobacterium tuberculosis* 2.0 % розчини дезактіну - для дезінфекції об'єктів, що контаміновані пліснявими грибами.

**Санікон-** Рідкий концентрований лужний миючий дезінфікуючий засіб з посиленою мийною дією для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, щоденних і генеральних прибирань і санітарної обробки.

Миючий дезінфікуючий засіб «Санікон» володіє широким спектром антимікробної активності, має бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дії.

Має IV клас небезпеки (малонебезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76). Не містить альдегідів, фосфатів, активного хлору, кисню та інших агресивних, високотоксичних, летких і екологічно небезпечних компонентів. Засіб дозволено для застосування в присутності пацієнтів та персоналу, що не бере участь в проведенні дезінфекції, не дратує органи дихання і очі[41].

Таблиця 5.3

**Узагальнена характеристика деяких миючих та дезінфікувальних засобів , що можуть використовуватися у виробництві штаму *B. subtilis***

Назва	Об`єкт миттячи дезінфекції	Концентрація робочого розчину %	Загальна площа чи об`єм миття за весь період виробництва м <sup>2</sup> , (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л, чи кг засобу, грн	Загальна вартість миття за період виробництва протягом року, грн
Дезактін	Інвентар, комунікації, підлога, вікна, двері	0,05	11785	2357	255	601035
Гембар	Інвентар, комунікації, підлога, вікна, двері	0,1	11785	2357	275	648175
Санікон	Стіни, підлога, двері, інвентар, тара	0,2	11785	2357	255	601035
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	2590	259	30	7770

*Закінчення табл. 5.3*

Кальцинована сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	2590	259	28,8	7459,2
Біомой	Обладнання комунікації, інвентар, тара	0,3	2590	259	102	26418

Задля забезпечення відповідної чистоти повітря обираємо періодичність ввімкнення бактерицидних ламп: 1 год після кожного генерального прибирання, та 30 хв після кожного робочого дня.

**Проаналізувавши дані наведені у *табл5.3* , можна зробити наступні висновки:**

- Кожні три місяці для уникнення резистентних штамів змінюють мийно-дезінфікуючий засіб, тому в нашому випадку обирали зразу 2 мийно-дезінфікуючих засоба.
- Для обробки підлоги та інших поверхонь обираємо засіб – дезактін, оскільки засіб є як миючим так і дезінфекційним, тож може пригнічувати ріст мікроорганізмів, що не менш важливо при дезінфекції, до того ж має досить не високу ціну.
- Для миття обладнання, комунікацій, тари доцільно використовувати мийний засіб на основі каустичної соди( 2 % розчин). Оскільки це найбільш простий дешевий і ефективний засіб для видалення складних забруднень з поверхонь ємнісного обладнання.

Отже, для миття та дезінфекції обладнання, комунікацій використовуємо каустичну соду та дезактін, оскільки ці засоби ефективно відмивають різноманітні забруднення, особливо залишки біомаси та поживного середовища, а також саме ці засоби рекомендовані для миття обладнання у більшості галузей промисловості .

#### **5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

Максимальний синтез глюконази у *B.subtilis*.(14.26 г/л за 48 годин) досягається за умов росту на середовищі наступного складу, ZJF-1A5 г/ л ячмінне борошно-63,5;

кукурудзяне борошно-44,8;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1.0;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1;

$\text{CaCl}_2$ -0,1[4].

Процес ферментації проходить в асептичних умовах, тому необхідна стерилізація його компонентів. Для цього поживне середовище розбивають на композиції в залежності від стадії культивування.

*Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках*

Для даного етапу необхідно приготувати 3200 мл поживного середовища, компоненти якого розбивають на наступні композиції:

Складаємо композиції:

*Композиція А:* ячмінне борошно, кукурудзяне борошно, режим стерилізації 112 °С протягом 20 хвилин. Перед стерилізацією необхідно заварити борошна при температурі 90 °С 20 хвилин. Склад композиції обґрунтовується термолабільністю компонентів які входять до борошна, наприклад білки та цукри.

*Композиція Б:*  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  дигідрофосфат калію готують окремо для попередження випадання в осад фосфатів кальцію і магнію. Стерилізують при температурі 131°С, впродовж 40 хв і за тиску 0,15 МПа.

*Композиція В:*  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$  – сульфат магнію та хлорид кальцію стерилізують за принципом звичайних солей, тобто за температури 131°С, впродовж 40 хв і за тиску 0,15 МПа.

*2.4.2. Стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 65 л*

Для даного етапу необхідно приготувати 34,6 л поживного середовища, компоненти якого розбивають на наступні композиції:

Складаємо композиції:

*Композиція А:* ячмінне борошно, та кукурудзяне борошно. Борошно готують шляхом змішування його з водою. Отриману масу заварюють протягом 60 хв при 95°С на водяній бані і стерилізують при 121°С, тиску - 1,5 атм, 1,5 години.

*Композиція Б:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – дигідрофосфат калію, та  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  магній сульфат. Мінеральні солі попередню перемішують і підкислюють у реакторі-змішувачі. Мінеральні солі зазвичай стерилізують окремо для запобігання утворення осаду, проте якщо підкислити середовище до  $\text{pH} = 4..4,5$ , то стає можливою спільна стерилізація солей, що дозволяє зробити процес економніше. Для підкислення використовують  $\text{HCl}$  у розрахунку 2 мл 6% розчину кислоти на 1 л середовища. Орієнтовно для даного етапу культивування необхідно  $2 \cdot 34,6 = 69,2$  мл розчину соляної кислоти. Окремо розчин  $\text{HCl}$  не стерилізують, оскільки його додають до композиції Б перед стерилізацією безпосередньо у інокуляторі.

Оскільки оптимальне  $\text{pH}$  для біосинтезу складає 7,0, то після процесу стерилізації  $\text{pH}$  середовища доводять розчином  $\text{NaOH}$  в об'ємі, еквівалентному кількості  $\text{HCl}$ . Такий об'єм розчину можливо приготувати в лабораторних умовах. Крім того, розчин натрій гідроксиду потребує окремої стерилізації за умов  $131^\circ\text{C}$ , 40 хв, оскільки його подають у апарат уже після стерилізації поживного середовища.

*Стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті 630 л*

Для даного етапу необхідно приготувати 343,4 л поживного середовища, компоненти якого розбивають на наступні композиції:

*Композиція А:* ячмінне борошно, та кукурудзяне борошно. Борошно готують шляхом змішування його з водою. Отриману масу заварюють протягом 60 хв при  $95^\circ\text{C}$  на водяній бані і стерилізують при  $121^\circ\text{C}$ , тиску - 1,5 атм, 1,5 години.

*Композиція Б:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – дигідрофосфат калію, та  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  магній сульфат. Мінеральні солі попередню перемішують і підкислюють у реакторі-змішувачі. Мінеральні солі зазвичай стерилізують окремо для запобігання утворення осаду, проте якщо підкислити середовище до  $\text{pH} = 4..4,5$ , то стає можливою спільна стерилізація солей, що дозволяє зробити процес економніше. Для підкислення використовують  $\text{HCl}$  у розрахунку 2

мл 6% розчину кислоти на 1 л середовища. . Орієнтовно для даного етапу культивування необхідно  $2 \cdot 343,4 = 686,8$  мл розчину соляної кислоти. Окремо розчин HCl не стерилізують, оскільки його додають до композиції Б перед стерилізацією безпосередньо у інокуляторі.

Оскільки оптимальне рН для біосинтезу складає 7,0, то після процесу стерилізації рН середовища доводять розчином NaOH в об'ємі, еквівалентному кількості HCl. Такий об'єм розчину можливо приготувати в лабораторних умовах. Крім того, розчин натрій гідроксиду потребує окремої стерилізації за умов 131 °С, 40 хв, оскільки його подають у апарат уже після стерилізації поживного середовища.

*Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері 6,3 м<sup>3</sup>*

Для виробничого біосинтезу необхідно приготувати 3,36 м<sup>3</sup> поживного середовища, компоненти якого розбивають на наступні композиції:

*Композиція А:* ячмінне борошно, та кукурудзяне борошно. Борошно готують шляхом змішування його з водою. Отриману масу заварюють протягом 60 хв при 95°С на водяній бані і стерилізують при 121°С, тиску - 1,5 атм, 1,5 години.

*Композиція Б:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – дигідрофосфат калію, та  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  магній сульфат. При приготуванні композиції необхідно  $2 \times 3 \times 360 \text{ л} = 6720$  мл розчину соляної кислоти. Такий об'єм розчину можливо приготувати в лабораторних умовах. Окремо розчин HCl не стерилізують, оскільки його додають до композиції Б перед стерилізацією безпосередньо у реакторі-змішувачі. Мінеральні солі попередню перемішують і підкислюють та стерилізують у реакторі-збірнику.

#### **5.4. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту**

При виробництві ферментного препарату Альфааза АПЗ до складу якого входить фермент  $\beta$ -глюканаза, цільовим продуктом є біомаса *Bacillus subtilis*, що складає основу даного ферментного препарату. Він використовується, у пивоварінні під час кислотної паузи.

Необхідність використання у багатьох випадках очищених бета-глюканаз ставить завдання розробки способів виділення та очищення ферментів.

Найбільш складно виділення продукту, що накопичується в клітинах продуцента. Оскільки,  $\beta$ -глюканаза представляє собою ендoferмент мікробного походження, то для цього клітини необхідно відокремити від культуральної рідини, зруйнувати (дезінтеграція) і далі цільовий продукт очистити від маси компонентів зруйнованих клітин.

1. Початковим етапом виділення у виробництві є відокремлення біомаси від культуральної рідини одним із методів, що застосовуються в біотехнології. Цей етап здійснюється з метою позбавлення біомаси від залишків поживного середовища та метаболітів, які утворилися під час попередніх етапів біосинтезу.

2. Наступним етапом є руйнування клітинної оболонки і екстрагування, для отримання внутрішньоклітинної рідини в якій міститься потрібний нам фермент.

3. Далі потрібно позбавитись від «уламків» зруйнованих клітинних стінок продуцента.

4. Після отримання ферменту наступною стадією є його очищення з метою отримання чистого цільового продукту[42].

5. Завершальним етапом є розлив готової продукції в підходящу тару.

#### **Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання**

Першим етапом на шляху виділення і очищення цільового продукту є розділення вмісту біореактора на культуральну рідину і біомасу клітин.

Даний процес носить назву сепарація. До методів сепарації відносять фільтрування, центрифугування і флотацію.

Для отримання очищеного ферменту бета-глюканази продуцента *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 найдоцільніше буде використання центрифугування.

- Фільтрування

Під час фільтрування використовують різні типи фільтрів (барабанні, дискові, стрічкові тощо), які засновані на однаковому принципі – затримання біомаси на пористій фільтруючій поверхні. Фільтрація є не вигідним варіантом, оскільки фільтрація є довго тривалим процесом до того ж потребує регулярної зміни фільтру, а це додає витрати і такий спосіб більш підійде для мікроорганізма-продуцента міцеліального характеру. Так як навіть при найбільш сприятливих умовах спостерігається повільна інактивація ферменту з часом. У зв'язку з цим рекомендується проводити очистку ферменту якомога швидше.

- Флотація

Для відділення клітин від культуральної рідини використовують також флотацію. Метод може бути використаним, якщо клітини продуцента в біореакторі накопичуються у поверхневих шарах рідини. Флотатори різних конструкцій зціджують, відкачують або зскрібають піну, яка містить мікробні клітини. Застосування даного способу для відділення клітин продуцента *Bacillus subtilis* від культуральної рідини є недоцільним, оскільки він призначений для згущення більших і важчих клітин дріжджів і мікроміцетів. Крім того, ступінь очищення культуральної рідини від клітин за допомогою даного способу невисокий, і використання у технології отримання препарату на основі  $\beta$ -глюканази є не досить досконалим методом.

- Центрифугування

Метод ґрунтується на осаджуванні частин, які знаходяться у завислому стані в рідині з використанням центробіжної сили.

І хоча даний спосіб є дорожчим, оскільки потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування та флотація, але він більш підходить тому що має ряд переваг :

- висока продуктивність;
- суспензія фільтрується швидше;
- за допомогою цього методу можна домогтись максимального звільнення культуральної рідини від частинок, які в ній містяться;
- також цим способом можна забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичне дію;
- є можливість варіювати розмір розділювальних часток;
- можливість застосування для суспензій з високою концентрацією твердих частинок;
- він більше підходить для продуцентів – бактерій.[43]

### **Обґрунтування вибору способу дезінтеграції клітин**

Оскільки цільовий продукт міститься в самих клітинах тобто є ендоферментом, який жорстко пов'язаний з субклітинними частинками і мембранами і утворює великі агрегати, поліферментні комплекси, його виділення неможливо без попереднього руйнування клітинних оболонок, а потім розриву і фрагментації субклітинних частинок і мембрани, з якими він пов'язаний. Для руйнування тобто дезінтеграції клітин застосовуються різні методи: механічні, фізичні, хімічні, біологічні й ензиматичні. Іноді для досягнення дезінтеграційного ефекту вдаються до сильних і надсильних впливів. Іноді застосування одного методу не дає бажаного результату. У такому разі клітини мікробів обробляють комплексно.

- Механічні методи – це балистичний, екструзивний і декомпресійний.
- Фізичні методи – осмотичний шок, термошок, плазмоліз, заморожування-відтаювання, висушування клітин, ультразвук, іонізуюча радіація.

- Хімічні методи – дія кислот, лугів, солей органічних розчинників, поверхневоактивних речовин. Ензиматичні методи – дія лізоциму та інших літичних ферментів.
- Біологічні – інгібування біосинтезу клітинної оболонки, дія фагів, одержання мутантних форм мікроорганізмів–продуцентів ферментів із легкоруйнівними стінками.

Для промислового виробництва доцільніше використовувати фізичні методи.

Фізичні способи руйнування більш економічні, ніж хімічні і біологоферментативні. Вони здійснюються без застосування дорогих і дефіцитних реактивів і ферментних препаратів, а також є більш автоматизованими. У той же час цим способам дезінтеграції клітин властива певна невибірковість: обробка може мати негативний вплив на якість одержуваного продукту.

Тому хімічні і біологоферментативні методи краще використовувати на підприємствах з малим обсягом виробництва або в лабораторних умовах.

А оскільки ми обираємо метод дезінтеграції для промисловості, то краще використовувати фізичні або механічні методи це обумовлено економічною вигідністю та автоматизацією виробництва.

Існує декілька основних фізичних і механічних методів руйнування клітини:

- Продавлювання за допомогою преса

Продавлювання за допомогою преса є, ймовірно, найпоширеніший і найкорисніший метод руйнування бактеріальних клітин.

По-перше, немає проблеми з охолодженням, так як циліндр і поршень преса охолоджують заздалегідь, а нагрів відбувається тільки при проходженні клітин через отвір клапана. Температура витікаючої рідини підвищується на 5-10 ° С, але цю рідину можна швидко охолоджувати, якщо збирати в металеву пробірку або стакан, поміщені в крижану баню.

Але у цього методу є ряд недоліків:

- Він не підходить для промислового застосування, так як є не автоматизованим
- здатний виробляти потрібний продукт в малих обсягах
- цей метод добре підходить для лабораторних випробувань.
- Балістичнае руйнування

Балістичні дезінтегратори є придатними для використання в промислових масштабах і дозволяють дезінтегрувати бактеріальну біомасу в безперервному режимі з продуктивністю порядку сотень літрів на годину при ефективності дезінтеграції, близькою до 100%.

Але цей метод має ряд недоліків : локальний перегрів оброблюваного речовини, що призводить до необхідності інтенсивного охолодження, повторне руйнування вже отриманих клітинних фрагментів з утворенням надзвичайно дрібних частинок, що значно ускладнює подальше розділення твердої і рідкої фаз. Все це збільшую витрати на воду для охолодження, електроенергію, більш тривалий час обробки біомаси, здорожує процес дезінтеграції і підвищує кінцеву вартість продукту.

Всі ці фактори уповільнюють виробництво і роблять його більш дорогим, що негативно впливає на просування даного цільового продукту. До того ж на тлі ультразвукового методу, він втрачає свою актуальність.

- Ультразвук

Обробка ультразвуком є ефективним засобом для руйнування клітинних структур. Ультразвукова обробка поперемінно генерує хвилі високої професійності і низького тиску в оброблюваній рідині. Під час циклу низького тиску ультразвукові хвилі створюють дрібні вакуумні бульбашки, які з силою лопаються під час циклу високого тиску. Дане явище носить назву кавітації. Внутрішній вибух кавітаційних бульбашок викликає виникнення сильних гідродинамічних сил зсуву. Сили зсуву поділяють

волокнистий клітинний матеріал на дрібні частинки і руйнують стінки клітинної структури.

Обробка ультразвуком є ефективним засобом для руйнування клітинних структур. Ультразвукова обробка поперемінно генерує хвилі високої професійності і низького тиску в оброблюваній рідині. Під час циклу низького тиску ультразвукові хвилі створюють дрібні вакуумні бульбашки, які з силою лопаються під час циклу високого тиску. Дане явище носить назву кавітації. Внутрішній вибух кавітаційних бульбашок викликає виникнення сильних гідродинамічних сил зсуву. Сили зсуву поділяють волокнистий клітинний матеріал на дрібні частинки і руйнують стінки клітинної структури.

Ультразвук є більш сучасним методом, який має ряд переваг над іншими методами, а найголовніше це:

- швидкий і легкий спосіб руйнування клітин
- можливість регулювати інтенсивність ультразвукової обробки
- можливість контролю і регуляції температури.

І хоча цей метод є дорожчим в порівнянні з іншими за рахунок більшої автоматизації та отримання якісного продукту в дуже короткі терміни, він є найбільш доцільним в промисловості.[44]

Оскільки *Bacillus subtilis* грампозитивна бактерія, то клітинна стінка відрізняється високою механічною міцністю. Тому для руйнування таких міцних субмікроскопічних структур необхідно сильна дія.

Цей метод найбільш підходить для виділення  $\beta$ -глюканази і для виробництва його в промислових цілях.

### **Виділення екстракту від зруйнованих клітин продуцента**

Після дезінтеграції клітин необхідно позбавлятися від їх "уламків", для чого використовують ті ж методи, що і при сепарації, тобто центрифугування за допомогою фільтраційні центрифуги. Однак у зв'язку зі структурою оброблюваного матеріалу в даному випадку доводиться застосовувати більш швидкісні центрифуги і фільтри з меншим діаметром

пір (в більшості випадків використовуються мембранні фільтри). Зазвичай в більшості біотехнологічних процесів "уламки" клітин викидають як відходи, але можливо і їх спеціальне отримання у вигляді цільового продукту.

Виділений екстракту можна здійснювати центрифугуванням, сепаруванням та та за допомогою мембранної фільтрації[45].

### **Очищення цільового продукту**

Існують різні методи очищення ферментів і в основному вони поділяються на мембранні та адсорбційні.

Адсорбційні методи зазвичай використовують в лабораторній практиці для отримання високоочищених і гомогенних ферментів, тому для промислового виробництва обираємо мембранні методи.

У залежності від рухомих сил процесів мембранні методи класифікуються на дифузійні - діалізи (рухома сила - розбіжність концентрацій по різні сторони мембрани), електромембранні - електродіаліз (різниця електричних потенціалів), баромембранні - зворотній осмос, ультрафільтрація, мікрофільтрація (різниця тисків). Всі ці процеси використовуються для переробки ферментних розчинів, вибір яких визначається ціллю переробки[46].

- **Діаліз**

Процес діалізу стосовно очищення розчинів ферментів має ряд істотних недоліків.

- По-перше, при діалізі можлива «втрата» ферменту в результаті вимивання іонів металів, що входять до складу молекули ферменту, або стабілізуючих фермент з'єднань, або фрагментів самого ферменту, наприклад, простетичної групи його.
- По-друге, при діалізі проти звичайної водопровідної води може відбуватися втрата активності ферменту в результаті попадання з води в розчин ферменту іонів металів - інгібіторів ферменту.

- Слід також зазначити, що в процесі діалізу одночасно з очищенням відбувається сильне розведення ферментного розчину через проникнення води під дією сил прямого осмосу в діалізуємих розчин.

Тому зараз цей метод очищення ферментних розчинів від баластних речовин в ферментній промисловості майже не використовується. Цей метод іноді застосовують в лабораторних дослідженнях і при отриманні високоочищених ферментних препаратів.

- Електродіаліз

Електродіалізний метод здійснюється завжди в безперервному режимі і є більш енергоємний, ніж діаліз. Стосовно до обробки ферментних розчинів він має ті ж недоліки. Крім того, електродіаліз не можна застосовувати при виділенні ферментів, що мають, наприклад, четвертинну структуру, яка формується за участю іонів металів, а також при виділенні металоферментів, які, як правило, втрачають активність при електродіалізі ( $\alpha$ -амілази,  $\beta$ -галактозидази і ін. ).

- Ультрафільтрація

Сьогодні баромембранні методи набули широкого поширення в біотехнологічній, харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловості. Зокрема, жодне сучасне виробництво ферментів не може вже обійтися без ультрафільтраційного очищення і концентрування продукту[47].

Оскільки такий метод має ряд переваг і є найбільшим вигідним методом, так як він забезпечує високі показники очищення, а також зручний для використання ферментів і інших білків.

Основними перевагами можна вважати:

- розчини не піддаються термічному і хімічному впливу в установці ультрафільтрації

- демонструє високі показники ефективності при порівняно низьких енерговитратах
- найбільш економічним спосіб очищення
- висока якість відокремленого екстракту від зруйнованих клітин обумовлена міцністю матеріалу мембран в установках ультрафільтрації.
- легкість у використанні
- довгий термін експлуатації
- тривалий термін служби мембранних елементів;
- повна автоматизація.[48]

### **Обґрунтування вибору упаковки та зберігання продукту**

Оскільки наш цільовий продукт виготовляється для забезпечення пивоварень необхідним ферментом, найзручніше його використовувати в рідкому вигляді, тому слід підібрати зручну для транспортування та зберігання тару. Фермент  $\beta$ -глюканаза є відносно стабільною речовиною, не потребує особливих умов, отже, перевезення можна здійснювати в жорсткій тарі.

Жорстка транспортна тара має свої переваги:

- висока міцність
- тривалий термін експлуатації
- надійний захист продукції від зовнішніх чинників

Для зберігання і транспортування готової продукції є декількаосновних матеріалів з яких виготовляють тари: скляна, металева та пластикова тара.Найвигідніше використовувати пластикову тари наприклад каністри об'ємом 25 літрів, так як для перевезення вони більш зручні, та не мають занадто великої ваги в порівнянні з скляними тарами або металевими, також, на відміну від скляної тари,пластикова є більш надійною і має менший ризик її пошкоджень.А матеріал для виготовлення пластикової тари є більш дешевшим на відміну від інших.

Зберігати даний продукт потрібно в сухому, прохолодному приміщенні, подалі від сонячних променів при температурі не вище 25 ° С і відносній вологості не більше 70%.

Отже, так як, ферменти є дуже лабільними, легко інактивованими сполуками, то саме цим і пояснюється специфічність методів виділення і очищення ферментів. Всі операції по виділенню і очищення ферментів проводять в умовах, що виключають можливість денатурації. Ці умови - низька температура, суворе обмеження тривалості операцій, контроль за рН, відсутність домішок солей важких металів та інших з'єднань, які можуть привести до денатурації ферменту[49].

## РОЗДІЛ 6.ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ПАРТІЮ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

Згідно з ТЕО потреба в бета-глюканазі складає  $G_{нд} = 2170$  кг/рік. За умовами замовника цю кількість потрібно виробити за  $T_{рд} = 90$  днів. За даними максимальній синтез ферменту ( $P_{кр}=14,26$  г/л за 48 год) досягається за умов росту штаму *Bacillus subtilis*ZJF-1A5 на середовищі такого складу (г/л):

C1 ячмінне борошно-63,5;

C2 кукурудзяне борошно-44,8;

C3  $KH_2PO_4$ -1.0;

C4  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,1;

C5  $CaCl_2$ -0,1.

**Всього –  $C_{\Sigma n} = 109,5$  г/л.**

Відповідно до нормативно-технічної документації вміст сухих речовин в готовому продукті  $CP_{гп}$  має складати не менше 0,94%.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

час циклу роботи ферментера  $T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 48 + 10 = 58$  год,

де  $T_{ф}$  – час культивування;  $T_{по}$  – час підготовчих операцій; коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5)

$K_1 = 1,1$ – коефіцієнт запасу часу, що враховує можливість нестерильних операцій;

- Коефіцієнт заповнення ферментера  $K_{ф}=0,6$
- Коефіцієнт заповнення посівного апарата  $K_{пп} = 0,6$ ;
- Коефіцієнт заповнення колб  $K_{кол} = 0,2$ ;

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ПАРТІЮ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ,	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Мармаш І.С.					64	
Керівник		Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

- Коефіцієнт заповнення збірника  $K_{зб} = 0,8$

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка  $E_{св} = 0,20$ ;

- кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05-0,1)  $X_{ф} = 0,1$ ;
- кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02-0,1)  $X_{па} = 0,1$ ;
- кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка (0,02-0,1)  $X_{ін} = 0,1$ ;
- кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02-0,1)  $X_{кол} = 0,1$ ;
- втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1-0,2)  $E_{ф} = 0,1$ ;
- втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівних апаратах, частка (0,1-0,2)  $E_{па} = 0,1$ ;
- втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в інокуляторах, частка (0,05-0,1)  $E_{ін} = 0,1$ ;
- втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в колбах, частка (0,01-0,02)  $E_{кол} = 0$ .

### 6.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

Кількість продукту на добу:

$$G_{нтд} = G_{нд} / T_{рд} = 2170 / 90 = 24,11 \text{ кг/добу.}$$

Кількість готового продукту за цикл:

$$G_{цк} = G_{нтд} \cdot T_{цф} / 24 = 24,11 \cdot 58 / 24 = 58,27 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл):

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot CP_{гп} / P_{кр} \cdot (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 58,27 \cdot 0,94 / 14,26 \cdot (1 - 0,2) = 3,4 \text{ м}^3$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нд} / G_{цк} = 2170 / 58,27 = 37,2.$$

Округлюємо кількість циклів до цілого  $N_{цк} = 37$

Вихід продукту з 1 м<sup>3</sup> культуральної рідини, л/м<sup>3</sup>:

$$Q_{кр} = G_{цк} \cdot 1000 / V_{кр} = 58,27 \cdot 1000 / 3,4 = 17$$

## **6.2 Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу**

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

$$V_{\phi} = V_{кр} / (1 - E_{\phi}) = 3,4 / (1 - 0,1) = 3,7 \text{ м}^3.$$

Об'єм готового поживного середовища для виробничого ферментера:

$$V_{пс\phi} = V_{\phi} / (1 + X_{\phi}) = 3,7 / (1 + 0,1) = 3,36 \text{ м}^3.$$

Витрати посівного матеріалу на засів виробничого ферментера:

$$V_{пм\phi} = V_{\phi} - V_{пс\phi} = 3,7 - 3,36 = 0,34 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера  $K_{з\phi} = 0,6$  його приблизний геометричний об'єм ферментера складає:

$V_{г\phi} = V_{\phi} / K_{з\phi} = 3,7 / 0,6 = 6,2$ . Отже, найближчий за номінальним об'ємом ферментер  $V_{н\phi} = 6,3 \text{ м}^3$ .

$$K_3 = 3,7 / 6,3 = 0,58$$

## **6.3 Визначення кількості стадій вирощування посівного матеріалу**

Оскільки кількість ПМ становить  $X_{\phi} = X_i = X_{колб} = 0,1\%$  від кількості ПС визначаємо кількість ПМ для інших стадій. Приблизна кількість ПМ для інших стадій становитиме:

ПМ для ферментера з посівного апарата:

$$V_{пм\phi} = 0,34 \text{ м}^3.$$

ПМ для посівного апарата з інокулятора:

$$V_{пма} = V_{пм\phi} \cdot X_{па} = 0,34 \cdot 0,1 = 0,034 \text{ м}^3 = 34 \text{ л}$$

ПМ для інокулятора з качалочних колб:

$$V_{пмін} = V_{пма} \cdot X_{ін1} = 0,034 \cdot 0,1 = 0,0034 \text{ м}^3 = 3,4 \text{ л}$$

Отже, маємо 3 ступеневу стадію отримання ПМ.

*Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері 6,3 м<sup>3</sup>*

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для виробничого біосинтезу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{\text{псф}}$  складають:

$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\text{ф}} = 3,36 \cdot 109,5 = 367,92$  кг, в тому числі покомпонентно, кг:

Ячмінне борошно  $G_1 = G_{\text{ф}} \cdot C_1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 367,92 \cdot 63,5 / 109,5 = 213,4$

Кукурудзяне борошно  $G_2 = G_{\text{ф}} \cdot C_2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 367,92 \cdot 44,8 / 109,5 = 150,52$

$\text{K}_2\text{HPO}_4$   $G_3 = G_{\text{ф}} \cdot C_3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 367,92 \cdot 1 / 109,5 = 3,4$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $G_4 = G_{\text{ф}} \cdot C_4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 367,92 \cdot 0,1 / 109,5 = 0,3$

$\text{CaCl}_2$   $G_5 = G_{\text{ф}} \cdot C_5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 367,92 \cdot 0,1 / 109,5 = 0,3$

*Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера*

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

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

- у разі стерилізації компонентів у колбах в автоклаві  $K_{\text{кон}} = 0$
- у разі стерилізації компонентів безпосередньо у реакторі-змішувачі або безпосередньо у ферментері  $K_{\text{кон}} = 0,1 - 0,15$
- у разі стерилізації компонентів в УБС  $K_{\text{кон}} = 0,2$

Оскільки об'єм поживного середовища у ферментері складає  $V_{\text{псф}} = 3,18 \text{ м}^3$ , приймаємо рішення щодо використання для стерилізації безпосередньо у реакторі-змішувачі.

Тоді кількість конденсату становитиме  $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}} = 3,36 \cdot 0,1 = 0,336 \text{ м}^3 = 336 \text{ л}$ .

Кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде  $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 3360 - 367,92 - 336 = 2656,1 \text{ л}$ .

Для спрощення розрахунків приймемо, що густина компонентів поживного середовища приблизно дорівнює густині води, тобто 1 л= 1 кг. 2656,1 л води необхідно розподілити між двома композиціями: кукурудзяною та ячмінною мукою (композиція А) та солями (композиція Б).

Загальна кількість води для розчинення композиції А :

Композиція А: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Ячмінна мука } V_{1в} = V_{вф} \cdot (C_1 / C_{\Sigmaф}) = 2656,1(63,5/109,5)=1540,3$$

$$\text{Кукурудзяна мука } V_{2в} = V_{вф} \cdot (C_2 / C_{\Sigmaф}) = 2656,1(44,8/109,5) = 1086,7$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 2627 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Композиція Б: Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 V_{3в} = V_{3в} \cdot (C_3 / C_{\Sigmaф}) = 2656,1(1/109,5) = 24,3$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } V_{4в} = V_{4в} \cdot (C_4 / C_{\Sigmaф}) = 2656,1(0,1/109,5) = 2,4$$

$$\text{CaCl}_2 V_{5в} = V_{5в} \cdot (C_5 / C_{\Sigmaф}) = 2656,1(0,1/109,5) = 2,4$$

Отже, для приготування композиції Б використаємо 29,1 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{Ав} = 2627$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{Бв} = 29,1$$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

$$\text{Композиція А } V_{1к} = V_{фк} \cdot (V_{Ав} / V_{в}) = 336 \cdot (2627/2656,1) = 332,3$$

$$\text{Композиція Б } V_{2к} = V_{фк} \cdot (V_{Бв} / V_{в}) = 336 \cdot (29,1/2656,1) = 3,7$$

Зазначимо, що для економії, солі стерилізуємо разом. Проте задля унеможливлення випадання осаду сульфату готуємо розчин титрантів 6% HCl та 6% NaOH. Розчин титранту HCl додаємо для того, щоб солі готувати

разом в одній композиції і розчин титранту NaOH для того, щоб регулювати рН.

Титрувальні розчини готуються окремо в розрахунку 2 мл на 1 л середовища, отже  $(3,36 \cdot 2) = 6,72$  л

Таблиця 6.1

**Склад композицій для стерилізації поживного середовища в ферментері 6,3 м<sup>3</sup>**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,36 м <sup>3</sup> середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Ячмінне борошно	63,5	213,4	А	2990,9
Кукурудзяне борошно	44,8	150,52		
Вода		2627		
Конденсат		332,3		332,3
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1	3,4	Б	33,1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	0,3		
CaCl <sub>2</sub>	0,1	0,3		
Вода		29,1		
Конденсат		3,7		3,7
<b>Всього</b>		<b>3360 л</b>		

*Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л*

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{па}} = V_{\text{пмф}} / (1 - E_{\text{па}}) = 340 / (1 - 0,1) = 377,7 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в посівному апараті становить:

$$V_{\text{пспа}} = V_{\text{па}} / (1 + X_{\text{па}}) = 377,7 / (1 + 0,1) = 343,4 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання посівного апарата:

$$V_{\text{пмпа}} = V_{\text{па}} - V_{\text{пспа}} = 377,7 - 343,4 = 34,3 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарата  $K_{\text{зпа}} = 0,6$  його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гпа}} = V_{\text{па}} / K_{\text{зпа}} = 377,7 / 0,6 = 629,5 \text{ л}$$

Серед стандартних посівних апаратів найближчий за об'ємом – 630 л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 377,7 / 630 = 0,59$$

*Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в посівному апараті геометричним об'ємом 630 л.*

Згідно з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}}$  складають:

$$G_{\text{зар2}} = V_{\text{пспа}} \cdot C_{\Sigma\text{ф}} = 343,4 \cdot 109,5 = 37,6 \text{ кг, в тому числі покомпонентно, кг:}$$

$$\text{Ячмінне борошно} \quad G1 = G_{\text{зар2}} \cdot C1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 37,6 \cdot 63,5 / 109,5 = 21,8$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} \quad G2 = G_{\text{зар2}} \cdot C2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 37,6 \cdot 44,8 / 109,5 = 15,4$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad G3 = G_{\text{зар2}} \cdot C3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 37,6 \cdot 1 / 109,5 = 0,34$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G4 = G_{\text{зар2}} \cdot C4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 37,6 \cdot 0,1 / 109,5 = 0,03$$

$$\text{CaCl}_2 \quad G5 = G_{\text{зар2}} \cdot C5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 37,6 \cdot 0,1 / 109,5 = 0,03$$

Стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в окремих реакторах гострою парою, приймаємо  $K_{\text{кон}} = 0,1$ , тоді загальна кількість конденсату становитиме:  $V_{\text{пак}} = V_{\text{псп}} K_{\text{кон}} = 343,4 \cdot 0,1 = 34,3 \text{ л.}$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:  $V_{\text{впа}} = V_{\text{псп}} - G_{\text{заг2}} - V_{\text{пак}} = 343,4 - 37,6 - 34,3 = 271,5$  л

Дану кількість води необхідно розподілити між двома композиціями: кукурудзяною та ячмінною мукою (композиція А) та солями (композиція Б).

Загальна кількість води для розчинення композиції А :

**Композиція А:** Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Ячмінна мука } V_{1\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot (C_1 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 271,5 \cdot (63,5 / 109,5) = 157,5$$

$$\text{Кукурудзяна мука } V_{2\text{в}} = V_{\text{вф}} \cdot (C_2 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 271,5 \cdot (44,8 / 109,5) = 111,1$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 268,6 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

**Композиція Б:** Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 V_{3\text{в}} = V_{3\text{в}} \cdot (C_3 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 271,5 \cdot (1 / 109,5) = 2,5$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } V_{4\text{в}} = V_{4\text{в}} \cdot (C_4 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 271,5 \cdot (0,1 / 109,5) = 0,2$$

$$\text{CaCl}_2 V_{5\text{в}} = V_{5\text{в}} \cdot (C_5 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 271,5 \cdot (0,1 / 109,5) = 0,2$$

Отже, для приготування композиції Б використаємо 2,9 л води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{\text{Ав}} = 268,6$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{\text{Бв}} = 2,9$$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

$$\text{Композиція А } V_{1\text{к}} = V_{\text{пак}} \cdot (V_{\text{Ав}} / V_{\text{в}}) = 34,3 \cdot (268,6 / 271,5) = 33,9$$

$$\text{Композиція Б } V_{2\text{к}} = V_{\text{пак}} \cdot (V_{\text{Бв}} / V_{\text{в}}) = 34,3 \cdot (2,9 / 271,5) = 0,4$$

Зазначимо, що для економії, солі стерилізуємо разом. Проте задля унеможливлення випадання осаду сульфату готуємо розчин титрантів 6%

HCl та 6% NaOH. Розчин титранту HCl додаємо для того, щоб солі готувати разом в одній композиції і розчин титранту NaOH для того, щоб регулювати рН.

Титрувальні розчини готуються окремо в розрахунку 2 мл на 1 л середовища, отже  $(343,4 \cdot 2) = 686,8$  мл

Таблиця 6.2

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті 630 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 343,4 середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Ячмінне борошно	63,5	21,8	А	305,8
Кукурудзяне борошно	44,8	15,4		
Вода		268,6		
Конденсат		33,9		33,9
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	0,34	Б	3,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,03		
$\text{CaCl}_2$	0,1	0,03		
Вода		2,9		
Конденсат		0,4		0,4
<b>Всього</b>		<b>343,4 л</b>		

*Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 65л*

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в інокуляторі становить:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{імпа}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 34,3 / (1 - 0,1) = 38,1 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі становить:

$$V_{\text{псін}} = V_{\text{ін}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 38,1 / (1 + 0,1) = 34,6 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання інокулятора:

$$V_{\text{мін}} = V_{\text{ін}} - V_{\text{псін}} = 38,1 - 34,6 = 3,5 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення посівного апарата  $K_{\text{зпа}} = 0,6$  його приблизний геометричний об'єм складатиме:

$$V_{\text{гі}} = V_{\text{ін}} / K_{\text{зпа}} = 38,1 / 0,6 = 63,5 \text{ л}$$

Серед стандартних інокуляторів найближчий за об'ємом – 100 л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зпа}} = V_{\text{ін}} - V_{\text{гі}} = 38,1 / 100 = 0,38$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,45-0,6) то можемо взяти 2 апарата стандартних об'ємів 40 л або замовити інокулятор об'ємом 65 л, що є більш доцільним з економічної точки зору.

$$K_{\text{зпа}} = V_{\text{ін}} - V_{\text{гі}} = 38,1 / 65 = 0,58$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}}$  складають:

$$G_{\text{зарз}} = V_{\text{псін}} \cdot C_{\Sigma\text{п}} = 34,6 \cdot 109,5 = 3789 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Ячмінне борошно} \quad G1 = G_{\text{зарз}} \cdot C1 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3789 \cdot 63,5 / 109,5 = 2197$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} \quad G2 = G_{\text{зарз}} \cdot C2 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3789 \cdot 44,8 / 109,5 = 1550$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \quad G3 = G_{\text{зарз}} \cdot C3 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3789 \cdot 1 / 109,5 = 35$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G4 = G_{\text{зарз}} \cdot C4 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3789 \cdot 0,1 / 109,5 = 3,5$$

$$\text{CaCl}_2 \quad G5 = G_{\text{зарз}} \cdot C5 / C_{\Sigma\text{ф}} = 3789 \cdot 0,1 / 109,5 = 3,5$$

Стерилізація компонентів в композиціях буде проводитись в окремих реакторах гострою парою, приймаємо  $K_{\text{кон}} = 0,1$ , тоді загальна кількість конденсату становитиме:  $V_{\text{кі}} = V_{\text{псі}} \cdot K_{\text{кон}} = 34,6 \cdot 0,1 = 3,46 \text{ л} = 3460 \text{ мл}$

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:  $V_{\text{в}} = V_{\text{псі}} - G_{\text{заг3}} - V_{\text{кі}} = 34600 - 3789 - 3460 = 27351 \text{ мл}$ .

Дану кількість води необхідно розподілити між двома композиціями: кукурудзяною та ячмінною мукою (композиція А) та солями (композиція Б).

Загальна кількість води для розчинення композиції А :

**Композиція А:** Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{Ячмінна мука } V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot (C_1 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 27351(63,5/109,5) = 15861$$

$$\text{Кукурудзяна мука } V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} \cdot (C_2 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 27351(44,8/109,5) = 11190$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 27051 мл води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

**Композиція Б:** Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 V_{3\text{в}} = V_{3\text{в}} \cdot (C_3 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 27351(1/109,5) = 250$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } V_{4\text{в}} = V_{4\text{в}} \cdot (C_4 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 27351(0,1/109,5) = 25$$

$$\text{CaCl}_2 V_{5\text{в}} = V_{5\text{в}} \cdot (C_5 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 27351(0,1/109,5) = 25$$

Отже, для приготування композиції Б використаємо 300 мл води, стерилізація буде проходити в реакторі-змішувачі.

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, л:

$$\text{Композиція А} \quad V_{\text{Ав}} = 27051$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{\text{Бв}} = 300$$

Розраховуємо кількість конденсату по композиціях, л:

$$\text{Композиція А } V_{1\text{к}} = V_{\text{кі}} \cdot (V_{\text{Ав}} / V_{\text{в}}) = 3460 \cdot (27051/27351) = 3422$$

$$\text{Композиція } BV_{2к} = V_{кі} \cdot (V_{БВ} / V_{В}) = 3460 \cdot (300 / 27351) = 38$$

Зазначимо, що для економії, солі стерилізуємо разом. Проте задля унеможливлення випадання осаду сульфату готуємо розчин титрантів 6% HCl та 6% NaOH. Розчин титранту HCl додаємо для того, щоб солі готувати разом в одній композиції і розчин титранту NaOH для того, щоб регулювати рН.

Титрувальні розчини готуються окремо в розрахунку 2 мл на 1 л середовища, отже  $(34,6 \cdot 2) = 69,2$  мл

Таблиця 6.3

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу штаму в інкуляторі 65 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 34600 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Ячмінне борошно	63,5	2197	А	30798
Кукурудзяне борошно	44,8	1550		
Вода		27051		
Конденсат		3422		3422
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	35	Б	342
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	3,5		
CaCl <sub>2</sub>	0,1	3,5		
Вода		300		
Конденсат		38		38
<b>Всього</b>		<b>34600 мл</b>		

*Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування штаму в колбах на качалках*

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{псм}} = V_{\text{кол}} = 3,5 \text{ л}$$

Кількість поживного середовища в колбах становить:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{кол}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 3,5 / (1 + 0,1) = 3,2 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засівання колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 3,5 - 3,2 = 0,3 \text{ л.}$$

Згідно з прийнятим складом поживного середовища загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища  $V_{\text{пс}}$  складають:

$$G_{\text{заг4}} = V_{\text{пск}} \cdot C_{\Sigma} = 3,2 \cdot 109,5 = 350 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Ячмінне борошно} \quad G1 = G_{\text{заг4}} \cdot C1 / C_{\Sigma\phi} = 350 \cdot 63,5 / 109,5 = 203$$

$$\text{Кукурудзяне борошно} \quad G2 = G_{\text{заг4}} \cdot C2 / C_{\Sigma\phi} = 350 \cdot 44,8 / 109,5 = 143,2$$

$$\text{KН}_2\text{PО}_4 \quad G3 = G_{\text{заг4}} \cdot C3 / C_{\Sigma\phi} = 350 \cdot 1 / 109,5 = 3,2$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \quad G4 = G_{\text{заг4}} \cdot C4 / C_{\Sigma\phi} = 350 \cdot 0,1 / 109,5 = 0,3$$

$$\text{CaCl}_2 \quad G5 = G_{\text{заг4}} \cdot C5 / C_{\Sigma\phi} = 350 \cdot 0,1 / 109,5 = 0,3$$

Враховуючи малу кількість компонентів їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві, при цьому конденсат не утворюється.

Загальна кількість води необхідної для розбавлення компонентів поживного середовища буде:  $V_{\text{в}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{заг}} = 3200 - 350 = 2850 \text{ мл.}$

Кількість води, необхідної для розчинення компонентів, розраховуємо із загальної кількості води для розбавлення компонентів, мл:

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

**Композиція А:** Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{Ячмінна мука} \quad V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} \left( \frac{C_1}{C_{\Sigma\phi}} \right) = 2850 \left( \frac{63,5}{109,5} \right) = 1652,74$$

$$\text{Кукурудзяна мука} \quad V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} \left( \frac{C_2}{C_{\Sigma\phi}} \right) = 2850 \left( \frac{44,8}{109,5} \right) = 1166,03$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 2818,77мл води, стерилізація буде проходити в автоклаві.

**Композиція Б:** Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 V_{3\text{в}} = V_{3\text{в}} (C_3 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 2850(1/109,5) = 26,03 \text{ мл}$$

Отже, для приготування композиції А використаємо 26,03 мл води, стерилізація буде проходити в автоклаві.

**Композиція В:** Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} V_{4\text{в}} = V_{4\text{в}} (C_4 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 2850(0,1/109,5) = 2,6 \text{ мл}$$

$$\text{CaCl}_2 V_{5\text{в}} = V_{5\text{в}} (C_5 / C_{\Sigma\text{Ф}}) = 2850(0,1/109,5) = 2,6 \text{ мл}$$

Отже, для приготування композиції Б використаємо 5,2 мл води, стерилізація буде проходити в автоклаві.

Отже, кількість води, яка необхідна для розчинення компонентів композицій, становитиме, мл:

$$\text{Композиція А} \quad V_{\text{Ав}} = 2818,77$$

$$\text{Композиція Б} \quad V_{\text{Бв}} = 26,03$$

$$\text{Композиція В} \quad V_{\text{Вв}} = 5,2$$

**Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування  
посівного матеріалу в колбах на качалках**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3200 мл середовища, мг (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Ячмінне борошно	63,5	203	А	3165
Кукурудзяне борошно	44,8	143,2		
Вода		2818,77		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	3,2	Б	29
Вода		26,03		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,3	В	6
$\text{CaCl}_2$	0,1	0,3		
Вода		5,2		
<b>Всього</b>		<b>3200 мл</b>		

**Розрахунок матеріального балансу (із врахуванням кількості стадій  
підготовки посівного матеріалу, розрахованої у підрозділі 3.4 ( розділ 3  
«Техніко-економчне обґрунтування»))**

**МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДИН ЦИКЛ ВИРОБНИЧОГО  
БІОСИНТЕЗУ**

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і Напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, дм <sup>3</sup>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мг, мл)			
1.1.	Ячмінне Борошно	63,5	Нестерильне ПС	3500
1.2.	Кукурудзяне борошно	44,8		
1.3.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1		
1.4.	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,1		
1.5.	CaCl <sub>2</sub>	0,1		
1.6.	Вода	2850		
	Всього:	3500	Всього:	3500
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ (мл)			

2.1.	Нестерильне ПС	3500	Стерильне ПС	3500
	Всього:	3500	Всього:	3500
3.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ (мг,мл)			
3.1.	Стерильне ПС	3200	Посівний матеріал	3500
3.2.	Посівний матеріал з колби	300		
	Всього:	3500	Всього:	3500
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩАДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (г, мл)			
4.1.	Ячмінне Борошно	63,5	Нестерильне ПС	34600
4.2.	Кукурудзяне борошно	44,8		
4.3.	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1		
4.4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1		
4.5.	$\text{CaCl}_2$	0,1		
4.6.	Вода	27351		
	Всього:	34600		34600
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩАДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА (мл)			

Продовження таблиці 6.5

5.1	Нестерильне ПС	34600	Стерильне ПС	34600
5.2	Конденсат	3460		
5.3	Всього:	34600	Всього:	34600
6.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУВ ІНОКУЛЯТОРІ (мг,мл)			
6.1	Стерильне ПС	34600	Посівний матеріал	34290
6.2	Посівний матеріал з колби	3500		
6.3	Втрати(частка)	0,1	Втрати (кількість)	3810
6.4	Всього:	38100	Всього:	38100
7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ (кг, л)			
7.1	Ячмінне Борошно	63,5	Нестерильне ПС	343,4
7.2	Кукурудзяне борошно	44,8		
7.3	$\text{KN}_2\text{PO}_4$	1		

Продовження таблиці 6.5

7.4	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1		
7.5	CaCl <sub>2</sub>	0,1		
7.6	Вода	271,5		
7.7	Всього:	343,4	Всього:	343,4
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПОСІВНОГО АПАРАТУ (л)			
8.1	Нестерильне ПС	343,4	Стерильне ПС	343,4
8.2	Конденсат	34,3		
8.3	Всього:	343,4	Всього:	343,4
9.	ОТРИМАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУВ ПОСІВНОМУ АПАРАТІ (л)			
9.1	Стерильне ПС	343,4	Посівний матеріал	339,93
9.2	Посівний матеріал з посівного апарату	34,3		
9.3	Втрати(частка)	0,1	Втрати (кількість)	37,77
9.4	Всього:	377,7	Всього:	377,7

10.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (кг, л)			
10.1	Ячмінне Борошно	63,5	Нестерильне ПС	3360
10.1	Кукурудзяне борошно	44,8		
10.2	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1		
10.3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1		
10.4	$\text{CaCl}_2$	0,1		
10.5	Вода	2656,1		
10.6	Всього:	3360	Всього:	3360
11.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА (л)			
11.1	Нестерильне ПС	3360	Стерильне ПС	3360
11.2	Конденсат	336		
11.3	Всього:	3360	Всього:	3360
12.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ (л)			
12.1	Стерильне ПС	3360		3330
12.2	Посівний матеріал з посівного апарата і інокулятора	340		

12.3	Втрати(частка)	0,1	Втрати (кількість)	370
12.4	Всього:	3700	Всього:	3700

#### 6.4 Розрахунок технологічного обладнання

*Розрахунок кількості виробничих ферментерів.*

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому

$$K_{зф}=0,6 \text{ м}^3$$

$$V_{фг} = V_{ф}/K_{зф} = 3,7/0,6 = 6,1 \text{ м}^3$$

Вибираємо з таблиці найближчий за номінальним об'ємом ферментер:

$$V_{фг} = 6,3 \text{ м}^3.$$

Кількість виробничих ферментерів при заданому  $K_3$ :

$$N_{фр} = V_{фг}/V_{фг} = 6,1/6,3 = 0,9 - \text{приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів:

$$K_{зф} = V_{ф}/(V_{фг} \cdot N_{фг}) = 3,7/(6,3 \cdot 1) = 0,58$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів  $N_{фг}=1+1$  запасний.

*Розрахунок кількості посівних апаратів*

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому  $K_{па}=0,6$ :

$$V_{гпа} = V_{па}/K_{па} = 377,7/0,6 = 629,5 \text{ л}$$

Вибираємо з таблиці найближчий за номінальним об'ємом посівний апарат:  $V_{пт} = 0,63 \text{ м}^3$ .

Кількість посівних апаратів при заданому  $K_3$

$$N_{пр} = V_{гпа}/V_{пт} = 629,5/630 = 0,99 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка  $K_{зпа}$

$$K_{зпа} = V_{па} / V_{пт} \cdot N_{пр} = 377,7/630 \cdot 1 = 0,59$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,5-0,65) серед стандартних посівних апаратів найближчим за об'ємом є 630 л

*Розрахунок кількості інокуляторів*

Приблизний загальний геометричний об'єм інокулятора при заданому  $K_{ін} = 0,6$ :

$$V_{гін} = V_{ін} / K_{ін} = 38,1/0,6 = 63,5 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за об'ємом інокулятор  $V_{інт} = 100 \text{ л}$

Кількість інокуляторів апаратів при заданому  $K_{ін}$

$$N_{ін} = V_{гін} / V_{інт} = 63,5/100 = 0,64 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка  $K_{зін}$

$$K_{зін} = V_{ін} / V_{інт} \cdot N_{ін} = 38,1/100 \cdot 1 = 0,4$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в заданих межах (0,5-0,65) то беремо на замовлення інокулятор об'ємом 65.

Кількість інокуляторів апаратів при заданому  $K_{ін}$

$$N_{ін} = V_{гін} / V_{інт} = 63,5/65 = 0,97 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка  $K_{зін}$

$$K_{зін} = V_{ін} / V_{інт} \cdot N_{ін} = 38,1/65 \cdot 1 = 0,58$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,5-0,65) то приймаємо до установки кількість ферментерів  $N_{інт} = 1+1$  запасний.

*Розрахунок кількості качалочних колб*

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому  $K_{кол} = 0,2$ :

$$V_{колг} = V_{кол} / K_{кол} = 3,5/0,2 = 17,5 \text{ л}$$

Об'єм 1 качалочної колби

$$V_{\text{колг}}=0,750 \text{ л}$$

Кількість качалочних колб при заданому  $K_{\text{кол}}=0,2$

$$N_{\text{кол}}=V_{\text{колг}}/V_{\text{колг}}=17,5/0,75=23,3=24 \text{ колби.}$$

*Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композицій А, Б*

Уточнюючий розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом  $6,3 \text{ м}^3$

*Підбираємо геометричний об'єм реактор-змішувача для композиції А ферментера при заданому  $K_{зб}=0,8$*

$$V_{\text{Аг}}=V_{\text{А}}/K_{зб}=2990,9/0,8=3738,6\text{л}=3,7 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор  $V_{\text{рт}}=4 \text{ м}^3$

Кількість реакторів при заданному  $K_{зб}$  становить:

$$N_{\text{р}}=V_{\text{Аг}}/V_{\text{рт}}=3,7/4=0,9 \text{ Приймаємо до установки 1 реактор}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка,

$K_{зр}$

$$K_{зр}=V_{\text{А}}/V_{\text{рт}} \cdot N_{\text{р}}=2990,9/4000 \cdot 1=0,74$$

Дане значення  $K_{зр}$  знаходиться в прийнятих межах (0,7-0,85), отже приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А  $N_{\text{рт}}=1+1$  запасний.

*Підбираємо геометричний об'єм реактор-змішувача для композиції Б ферментера*

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб}=0,8$

$$V_{\text{Бг}}=V_{\text{Б}}/K_{зб}=33,1/0,8=41,4 \text{ л}=0,04 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий об'єм реактор

$$V_{\text{рт}}=0,04 \text{ м}^3$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$

$$N_p = V_{Бг} / V_{рт} = 0,04 / 0,04 = 1 \text{ приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних ферментерів, частка,  $K_{зр}$

$K_{зр} = V_{Б} / V_{рт} \cdot N_p = 33,1 / 40 \cdot 1 = 0,82$  Оскільки дане значення  $K_{зф}$  лежить в прийнятих межах (0,7-0,85). Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А  $N_{рт} = 1 + 1$  запасний

*Підбираємо геометричний об'єм збірника для приготування HCl та NaOH на стадії виробничого біосинтезу.*

Необхідна кількість 6 % HCl – 6,72 л

$V_{\phi} = V_{\phi} / K_{зб} = 6,72 / 0,8 = 8,4$  л обираємо реактор хімічний емальований місткістю 10 л

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить :

$$N_p = V_{\phi} / V_{рст} = 8,4 / 10 = 0,84 \text{ приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора

$$K_{зр} = V_{\phi} / V_{рст} \cdot N_p = 8,4 / 10 \cdot 1 = 0,84$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

Необхідна кількість 6 % NaOH на стадії виробничого біосинтезу.

Необхідна кількість 6 % NaOH – 6,72 л.

$V_{\phi} = V_{\phi} / K_{зб} = 6,72 / 0,8 = 8,4$  л обираємо реактор хімічний емальований місткістю 10 л

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить :

$$N_p = V_{\phi} / V_{рст} = 8,4 / 10 = 0,84 \text{ приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора

$$K_{зр} = V_{\phi} / V_{рст} \cdot N_p = 8,4 / 10 \cdot 1 = 0,84$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не лежить в межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1 + 1 запасний.

*Підбираємо геометричний об'єм реактор-змішувача для композиції А посівного апарата при заданому  $K_{зб}=0,8$*

$$V_{Аг} = V_A / K_{зб} = 305,8 / 0,8 = 382,2 \text{ л} = 0,38 \text{ м}^3$$

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор  $V_{рт}=0,4 \text{ м}^3$

Кількість реакторів при заданному  $K_{зб}$  становить:

$$N_p = V_{Аг} / V_{рт} = 382,2 / 400 = 0,95 \text{ Приймаємо до установки 1 реактор}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка,

$K_{зр}$

$$K_{зр} = V_A / V_{рт} \cdot N_p = 305,8 / 400 \cdot 1 = 0,76$$

Дане значення  $K_{зр}$  знаходиться в прийнятих межах (0,7-0,85). Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А  $N_{рт} = 1+1$  запасний.

*Підбираємо геометричний об'єм реактор-змішувача для композиції В посівного апарата*

Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб}=0,8$

$$V_{Бг} = V_B / K_{зб} = 3,3 / 0,8 = 4 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор:

$$V_{нр} = 4 \text{ л.}$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить:

$$N_p = V_{Бг} / V_{нр} = 4 / 4 = 1 \text{ приймаємо 1.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_B / (V_{нр} \cdot N_p) = 3,3 / (4 \cdot 1) = 0,82$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки 1+1 реактор для приготування композицій В або беремо 5 колби об'ємом 750 мл.

*Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 65 л*

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$ :

$$V_{Аг} = V_A / K_{зб} = 30798 / 0,8 = 38497,5 \text{ мл} = 38 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор:

$$V_{нр} = 40 \text{ л.}$$

Кількість реакторів при заданому  $K_{зб}$  становить:

$$N_p = V_{Аг} / V_{нр} = 38 / 40 = 0,95 \text{ приймаємо } 1.$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{зр} = V_A / (V_{нр} \cdot N_p) = 30,8 / 40 \cdot 1 = 0,77$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення лежить в заданих межах (0,7 – 0,85), приймаємо до установки 1+1 реактор для приготування композицій А.

*Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції Б інокулятора.*

Приблизний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому  $K_{зб} = 0,8$ :

За даним об'ємом 342 мл для композиції Б використовуємо колбу об'ємом 750 мл.

## РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 7.1.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Розроб.		Мармаш І.С.			<b>РОЗДІЛ 7. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Гудзенко О.В.					90	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

**Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезубета-глюканази**

<b>Позиція</b>	<b>Найменування</b>	<b>Технічна характеристика (виробник)</b>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
P3	Реактор-змішувач для проготування дезинфікуючого засобу	Збірник оснащений перемішувачем. Швидкість обертів мішалки 50 об/хв, сталь н/ж. Фірми «Аттіс» (Україна) [50].
H4 H8 H13 H47	Насос відцентровий	Насос відцентровий герметичний з нержавіючої сталі ЦГ Насос 25/50К-5,5-5. Продуктивність від 50 л - 100 м <sup>3</sup> /год, Потужність 0,5-5,5 кВт, напір 50 м Фірми «Grundfos»[51].
P7	Реактор-змішувач для приготування розчину соляної кислоти	швидкість обертів мішалки 60 об/хв; н/сталь New Brunswick Scientific an Eppendorf Company[52].
Ф11 Ф23 Ф25 Ф29 Ф34 Ф36 Ф40 Ф45	Індивідуальний фільтр стерильного повітря	Фільтри марки Bonesco Activecarbonfilter (Швейцарія), E=99[53].
P12	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину NaOH	швидкість обертів мішалки 60 об/хв; н/сталь New Brunswick Scientific an Eppendorf Company[52].

ПЗ14	Пристрій забірний	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень[54]
Ф15	Фільтр попередній	Попередній фільтр AL-KO 110157. Виробник Німеччина[55]
К16	Компресор	Компресор серії «ВКП F Industrial» . Виробник Україна, м. Харків. Потужність від 2,2 кВт до 15 кВт, продуктивність до 2,2 м <sup>3</sup> /хв[56]
Т17	Теплообмінник-охолоджувач	Теплообмінник-охолоджувач фірми «HYDAS», продуктивність до 30 кВт[57]
Р18	Ресивер-вологівідділювач	Ресивер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія), об'єм 430 л, робочий тиск 1,8 МПа[58].
Т19	Теплообмінник-нагрівач	Теплообмінник фірми DEFRO (Україна), потужність 7,5 – 25 кВт, приток повітря 5700 м <sup>3</sup> /год[59].
Ф20	Фільтр головний	Фільтруючий матеріал –волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E=96%[60].
Р24 Р30 Р41	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	Реактори з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв[61].
ФР26	Інокулятор	Ферментер об'ємом 65 л, з мішалкою, тепловою сорочкою та барботером швидкість перемішування 200 об/хв[61].

Р33 Р44	Реактор-змішувач для попереднього розчинення композиції Б	Реактори з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 200 об/хв.[61]
ФР35 ФР37	Посівний апарат	Ферментер об'ємом 630 л, мішалкою, тепловою сорочкою та барботером швидкість перемішування 200 об/хв.[61]
ФР46	Ферментер (інокулятор)	Ферментер барботаажний об'ємом 6,3 м <sup>3</sup> , мішалкою, тепловою сорочкою та барботером швидкість перемішування 200 об/хв.[61]
Н-2 Н-5	Насос шнековий	Пропускна здатність: 30 л / год - 500 м <sup>3</sup> / год; Нагнітається тиск: до 96 бар.[62] фірми Seerex
Ц-3 Ц-6	Горизонтальна центрифуга з автоматичним розвантаженням й ножовим зніманням осаду	Модель - GKF1600 Діаметр барабана-1500 мм Обсяг барабана-690 л Максимальне завантаження-950 кг Максимальна частота обертання барабана-950 об / хв G-фактор-808 Потужність основного двигуна- 90кВт Габарити Д * Ш * В-4200 * 2700 * 2800мм Масса-20000 кг[64]

УД-4	Ультразвуковий дезінтегратор	<p>Модель-UIP 16000</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ультразвукової потужністю 16000 Вт</li> <li>- 24/7 експлуатація</li> <li>- промисловий клас</li> <li>- кольоровий сенсорний дисплей</li> <li>- переглянути пульт дистанційного керування автоматичний запис даних потужності, амплітуди,</li> <li>- час ультразвукової обробки,</li> <li>- температура</li> <li>- вбудований SD / USB ComboCard</li> <li>- підключений датчик температури LAN з'єднання Ethernet-з'єднання без встановлення програмного забезпечення</li> <li>- Автоматична настройка частоти.[65]</li> </ul>
Ро-7	Реактор змішувач «Діоніс»	<p>Об'ємом 630 л.</p> <p>Технічні характеристики:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Номінальний об'єм корпусу, л: 630;</li> <li>- Робочий об'єм корпусу, л: 500;</li> <li>- Частота обертання мішалок, об / хв: плавно регульована від 0 до 80.</li> <li>- Встановлена потужність, при U = 380 В, кВт</li> <li>- Електродвигуна приводу: 3,5;</li> <li>- Матеріали виготовлення корпусу,</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- кришки, мішалки: н / ж сталь 08X18H10T, (AISI 321)</li> <li>- Габаритні розміри, мм L x B x H: 1470x1120x1780.</li> <li>Маса, кг 860,0/[66]</li> </ul>
УФ-8	Ультрафільтраційна установка	<p>Модель- УФ300</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Функція: прибрати взиешенние тверді частинки і протеїн</li> <li>- Акуратність фільтрації</li> <li>- Система: 1-блокова установка</li> <li>- Матеріали: SUS304 / EPDM, санітарний виконання</li> <li>- Контроль: ручне управління</li> <li>- Комплект поставки: модуль (2 шт. Під установку 12 мембран, насос, клапан в санітарному виконанні, інструменти, контрольний фільтр, теплообмінник, бак для СІР промивання, шафа управління</li> <li>- Потужність: 8.2кВ * 380 * 50Гц</li> <li>- Габарити: 1800 * 900 * 2800 мм.</li> <li>- Вага брутто: 400 кг</li> <li>Характеристики рідини: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Продуктивність: 300л / год</li> </ul> </li> <li>- Сухі речовини: 30%, бактерії: 0.5-1.5%</li> <li>- Молочна кислота: 5%, солі: 0.5-1.5%</li> <li>- Біотин - 0.5%</li> <li>- Температура: 40 °С</li> <li>- РН: 4/[67]</li> </ul>

<p>ЛР-1</p>	<p>Лінійна лінія розливу</p>	<p>Фірми –stanco</p> <p>Кількість дозуючих вузлів від 2 шт. до 16 шт.</p> <p>Діапазон регулювання дози від 0,5 л до 20 л</p> <p>Продуктивність до 4000 доз / год (на воді, при дозі 1 л)</p> <p>Точність дозування від + 0,5% до + 1,5%</p> <p>Матеріал деталей, що контактують з продуктом</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• нержавіюча сталь AISI 304 / AISI 316</li> <li>• фторопласт Ф4 (PTFE)</li> <li>• еластомери FPM / NBR / EPDM / MVQ</li> </ul> <p>Джерело енергозабезпечення електрику (220 В / 50 Гц / 1 Ф), стиснене повітря (6-8 бар) [68]</p>
-------------	------------------------------	--

## РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу виділення і очищення ферменту бета-глюканази включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ, підготовка мийних засобів, підготовка розчинів реагентів для дезінтеграції клітин і екстракції ферменту) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу та біосинтез ферменту, відділення біомаси, дезінтеграція та екстракція клітин бета-глюканази *Bacillus subtilis* ZJF-1A5).

### *ДР 1 Санітарна підготовка виробництва*

Санітарна підготовка виробничих приміщень це комплекс заходів, що складається з вологого прибирання, дезінфекційної обробки, та ультрафіолетового опромінення поверхонь приміщень.

#### *ДР 1.1 Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів*

Підготовка миючих розчинів полягає у змішуванні миючих та дезінфікуючих засобів з водою для отримання концентрації, необхідної для мийки обладнання, підлоги, стін, столів.

Миття обладнання здійснюється робочим розчином каустичної соди концентрацією 2%. Для миття збірників, інокулятора об'ємом 65 л, посівного апарату об'ємом 630 л та ферментера (6300 л) у збірник (РЗ) засипають каустичну соду та доливають воду. Час витримки 15–20 хв. Приготування розчину здійснюється за температури 30 – 35°C, для кращого розчинення концентрату вмикають мішалку.

#### *ДР 1.1.1. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину каустичної соди*

Каустична сода являє собою безбарвну кристалічну речовину. Гігроскопічна. Добре розчинна у воді. Гарячий розчин 2% каустичної соди

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 8. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Мармаш І.С.					97	
Керівник		Гудзенко О.В.						99
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

добре, обмиває жири, гідролізує білки, розщеплює вуглеводи. При зменшенні температури є розчинною, миючі властивості зменшуються. Термін зберігання 1 рік. Використовують розчин концентрацією 2% та температурою 55°C для миття технологічного обладнання та комунікацій.

. Приготований розчин зберігають у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці.

#### *ДР 1.1.2. Приготування мийно-дезінфікуючого розчину дезактіну*

Для обробки приміщень, повітроводів, обладнання використовують 2% розчин дезактіну. Для приготування робочого розчину дезактіну через об'ємно-ваговий дозатор у збірник наливають технічну воду, залишають на 24 год в прохолодному приміщенні. Розчин готують для разового застосування.

#### ***ДР 1.2 Підготовка приміщень***

Прибирання виробничих приміщень поділяється на щоденне та генеральне. У якості матеріалу для прибирання застосовують серветки з підшитими краями з тканини бавовняної і змішаної плательної. Матеріал для прибирання (відра, ганчірки і т. ін.) промаркований, використовують його тільки за призначенням, зберігають в спеціальних шафах.

#### *ДР 1.2.1 Генеральне прибирання*

Генеральне прибирання виробничих приміщень проводять не рідше 1 разу на тиждень. Прибирають підлоги, стіни, стелі, повітроводи, підвіконня, поверхні всього обладнання, комунікації, всі виробничі меблі. В якості дезінфікуючих розчинів використовують 2% розчин дезактіну(від *ДР 1.1.2*).

Допоміжні приміщення (відділення водопідготовки і підготовки повітря, побутові приміщення) піддають обробці аналогічно виробничим приміщенням з періодичністю не рідше 1 разу на місяць.

Проводять обробку приміщень у гумових рукавичках, окулярах, респираторі, гумових чоботях і фартуху.

Мікробіологічний контроль проводить мікробіолог за допомогою

змивів стерильними тампонами не рідше 1 разу на тиждень під час виробничого процесу і за 1,5 год до початку роботи.

У змивах з 100 см<sup>2</sup> поверхні допускається не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х чашках Петрі.

Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

#### *ДР 1.2.1 Щоденне прибирання виробничих приміщень*

Щодня проводять прибирання підлоги із застосуванням 2% дезактіну з розрахунку 150-170 мл розчину на 1 м<sup>2</sup>. Панелі, стіни, двері виробничих приміщень щодня протирають вологою хлопчасто-паперовою тканиною, змоченою в 2% розчині дезактіну. Особливо ретельно протирати ручки і нижні частини дверей. Внутрішню скляну поверхню рам промивають і протирають у міру забруднення.

Для знезараження поверхні стін, підлоги, стелі, обладнання, а також повітря мікробіологічної лабораторії використовують бактерицидні лампи. Після проведення дезінфікуючої обробки приміщення звільняють від персоналу і включають настельні бактерицидні лампи не менше ніж на 2 години. Вимикачі для відкритих бактерицидних ламп розміщені поза опромінюваним приміщенням з сигнальним написом "Увімкнені бактерицидні лампи". Через кожні 2-3 години роботи ламп їх вимикають на 1,0-1,5 години. Встановлена потужність відкритих ламп не перевищує 2,0-2,5 Вт потужності на 1 м<sup>3</sup> приміщення.

Відпрацьований розчин направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

#### *ДР 1.3 Підготовка обладнання та комунікацій*

##### *ДР 1.3.1 Миття обладнання*

Для миття обладнання та комунікацій використовують станцію СІР – мийки, питну воду і застосовують розчин каустичної соди у концентрації 2 % (від ДР. 1.1.1) підігрітого до температури 50 – 60 °С.

##### *ДР 1.3.2 Ополіскування*

Оскільки після миття обладнання розчином лугом можливе нанесення шкоди персоналу на наступних стадіях підготовки технологічного обладнання здійснюють ополіскування очищеною водою при температурі 30°C протягом 30 хв. Далі після зливу вода направляється на стадію знешкодження відходів.

#### *ДР 1.3.3 Технічний огляд*

Перед процесом стерилізації проводять технологічний огляд обладнання на наявність пошкоджень, вм'ятин, впадин, в яких можуть залишатись залишки можливого забруднення, що може призвести до перехресної контамінації. Всі знайдені несправності усувають.

#### *ДР 1.3.4 Перевірка на герметичність обладнання*

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,1-0,2 МПа. Перевірку здійснюють за допомогою манометра, якщо упродовж 60 хв тиск не знижується, обладнання вважають герметичним. Особливу увагу при перевірці приділяють фланцевим з'єднанням та зварним швам. В іншому випадку здійснюють пошук неущільнень за допомогою галогенових течієпошукачів. Перед набором тиску в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (чотирихлористий карбон), закривають усю запірну арматуру, апарат нагрівають до температури 80 °C і збільшують тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість операції становить 30-60 хв. У разі виявлення неущільнень здійснюють їх ліквідацію та здійснюють повторну перевірку.

#### *ДР 1.3.5 Стерилізація обладнання*

Стерилізацію ферментеру проводять шляхом подання гострої пари при  $t = 125-130$  °C і тиску 0,2 МПа, впродовж 30 хв. Після стерилізації зупиняють подачу гострої пари, ставлять всі вузли під паровий захист та

знижують тиск. При зниженні тиску проводять охолодження до температури 90 °С. А конденсат, що утворився, подається до знешкодження.

## ***ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря***

### *ДР 2.1 Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник (ПЗ-14) на висоті 30 м.

### *ДР 2.2 Очищення повітря від пилу і механічних часток*

Повітря, що використовується для аерації не повинно мати механічних домішок, бути стерильним та мати певну температуру від 45 до 60 °С.

Очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф15). При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, знижується кількість контамінантів, а очищене повітря надходить у компресор. Ступінь очищення становить  $E = 80 \%$ .

### *ДР 2.3 Стиснення повітря*

Повітря стискають у компресорі (К16), при цьому створюється тиск величиною 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

Інактивується значна кількість контамінантів.

### *ДР 2.4 Охолодження повітря та видалення вологи*

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі (Т17) повітря до температури 20 °С для відведення надлишкової вологи. Далі повітря подають на ресивер (Р18) для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ( $W = 60 \%$ ). Охолоджене повітря підігривають до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику (Т19).

### *ДР 2.5 Нагрівання повітря*

При потребі проводять стабілізацію термодинамічних показників (відносна вологість  $W=40\%$ ): повітря додатково підігривають до температури 70-90 °С у теплообміннику (Т19). При таких температурах не

відбувається конденсація пари на волокнах головного фільтра (Ф20).

#### *ДР 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі*

Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється в фільтрі тонкої очистки (Ф20), що відповідає таким параметрам як міцність, швидкість фільтрування, термостійкість. Стерилізується фільтр паром під тиском 0,2 МПа при 133° С протягом 3 годин. Перебивку головного фільтра ведуть 1 раз на 2–3 місяці, у разі пошкодження, забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

Охолоджене повітря, проходячи крізь шар базальтового волокна, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить 99,5 %.

#### *ДР 2.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальному фільтрі (Ф25, Ф34, Ф36, Ф45), що розміщується безпосередньо перед інокуляторами і ферментером.

Товщина такого фільтру не перевищує 4 мм, матеріал – фторопластові втулки (діаметр отворів – 0,2 мкм; швидкість фільтрування – 0,1 м/с; гідравлічний опір – до 0,1 МПа) ефективність – 99,99%.

Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Специфічною вимогою до фільтрувальних матеріалів являється необхідність їх періодичної стерилізації гострою парою разом з усім обладнанням технологічної лінії.

### ***ДР 3 Приготування та стерилізація титрувальних агентів***

#### *ДР 3.1 Приготування 6 %-го розчину HCl*

*ДР 3.1.1 Приготування 6 %-го розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторі та посівному апараті об'ємом 65 л та 630 л*

У збірники подають 10 л та 100 л питної води. Далі при постійному перемішуванні за допомогою піпетки додають 60 мл та 600 мл 37% HCl. Варто зазначити, що рідини змішуються строго у вищезазначеному

порядку, оскільки може відбутися екзотермічна реакція). Колбу закривають скляною пробкою.

*ДР 3.1.2 Приготування 6 %-го розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>*

У збірник подають 1005 л питної води. Далі при постійному перемішуванні вносять 6,2 л 37 % розчину HCl.

*ДР 3.2 Приготування та стерилізація 6 %-го розчину NaOH*

*ДР 3.2.1 Приготування та стерилізація 6 %-го розчину NaOH для нейтралізації середовища в інокуляторі та посівному апараті об'ємом 65 л і 630 л*

На технічних вагах зважують 60 мл та 600 мл NaOH і вносять далі у збірник. Далі доливають 200 мл та 1,6 л питної води, перемішують. Проводять стерилізацію в автоклаві при температурі 131 °C упродовж 40 хв.

*ДР 3.2.2 Приготування та стерилізація 6 %-го розчину NaOH для нейтралізації середовища в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>*

Зважують 6,2 л NaOH на технічних вагах, який вносять далі у збірник. При постійному перемішуванні доливають 16,8 л питної води. Після повного розчинення стерилізують 40 хв при температурі 131 °C.

***ДР 4 Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 4.1 Приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту в колбах на качалках*

Для вирощування інокуляту в колбах на качалках необхідно приготувати 3000 мл поживного середовища. Джерелом вуглецю і азоту у складі поживного середовища є ячмінне борошно та кукурудзяне борошно. Вміст компонентів для приготування 3000 мл поживного середовища наведено в табл 8.1.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3000 мл  
середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 3200 мл, г середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Ячмінне борошно	63,5	203	А	346,2
Кукурудзяне борошно	44,8	143,2		
$\text{KN}_2\text{PO}_4$	1	3,2	Б	3,2
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,3	В	0,6
$\text{CaCl}_2$	0,1	0,3		
Вода	2850 мл			
<b>Всього</b>	<b>3200 мл</b>			

*ДР 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А*

До складу композиції входить 203 г ячмінного борошна, та 143,2 г кукурудзяного борошна.

Борошно готують шляхом змішування його з 2818,77 мл води. Отриману масу заварюють у реакторі-змішувачі об'ємом 4 л протягом 60 хв при 95°C і стерилізують при 112°C, тиску -0,15 атм, 30 хвилин.

*ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На аналітичних вагах у відтарованому хімічному стакані зважують 3,2 г  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ . Наважку переносять в колбу об'ємом 50 мл та додають 26,03 мл питної води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, впродовж 40 хв і за тиску 0,15 МПа.

#### ДР 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

На аналітичних вагах у відтарованому хімічному стакані зважують 0,3 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  та 0,3 г  $CaCl_2$ . Наважки переносять в колбу об'ємом 20 мл. Додають 5,2 мл питної води. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, впродовж 40 хв і за тиску 0,15 МПа.

#### ДР 4.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 65 л

Для культивування в інокуляторі об'ємом 65 л необхідно приготувати 34,6 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування такого поживного середовища наведено в табл 8.2.

Таблиця 8.2

#### Розрахунок вмісту компонентів для приготування 34,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 34600мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Ячмінне борошно	63,5	2197	А	3747
Кукурудзяне борошно	44,8	1550		
$KH_2PO_4$	1	35	Б	42
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	3,5		
$CaCl_2$	0,1	3,5		
Конденсат	3460 мл			
Вода	27351 мл			
<b>Всього</b>	<b>34600 мл</b>			

#### *ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А*

До складу композиції входить 2197 мг ячмінного борошна, та 1550 мг кукурудзяного борошна.

Борошно готують шляхом змішування його з 27051 мл води. Отриману масу заварюють у реакторі-змішувачі об'ємом 35 л протягом 60 хв при 95°C і стерилізують при 112°C, тиску -0,15 атм, 30 хвилин.

#### *ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стакані зважують 35 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , далі 3,5 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та 3,5 г  $\text{CaCl}_2$ . Всі три наважки переносять в колбу об'ємом 750 мл. За для унеможливлення випадання осаду сульфату стерилізацію проводимо при рН 4-4,5 завдяки додаванню 6 % розчину  $\text{HCl}$  (від ДР 3.1.1). Постійно перемішуючи доливають 300 мл питної води. Закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, впродовж 40 хв і за тиску 0,15 МПа.

#### *ДР 4.3 Приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 630 л*

Для культивування в посівному апараті об'ємом 630 л необхідно приготувати 343,4 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування такого поживного середовища наведено в табл 8.3

*Таблиця 8.3*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 343,4 л середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 343,4 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Ячмінне борошно	63,5	21,8		37,2

Закінчення таблиці 8.3.

Кукурудзяне борошно	44,8	15,4	А	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	0,34	Б	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,03		
$\text{CaCl}_2$	0,1	0,03		
Конденсат	34,3 л			
Вода	271,5 л			
<b>Всього</b>	<b>343,4 л</b>			

*ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А*

До складу композиції входить 21,8 кг ячмінного борошна, та 15,4 кг кукурудзяного борошна.

Борошно готують шляхом змішування його з 268,6 л води. Отриману масу заварюють у реакторі-змішувачі об'ємом 310 л протягом 60 хв при 95°C і стерилізують при 112°C, тиску -0,15 атм, 30 хвилин.

*ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стакані зважують 340г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , далі 30 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та 30 г  $\text{CaCl}_2$ . Всі три наважки переносять в реактор-змішувач об'ємом 4л. За для унеможливлення випадання осаду сульфату стерилізацію проводимо при рН 4-4,5 завдяки додаванню 6 % розчину  $\text{HCl}$  (від ДР 3.1.1). Постійно перемішуючи доливають 2,9 л питної води. Стерилізують при температурі 131°C, впродовж 40 хв і за тиску 0,15 МПа.

*ДР 4.4 Приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>*

На даній стадії необхідно приготувати 3360 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування такого поживного середовища наведено в табл 8.4.

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3360 л  
середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Кількість для приготування 3360 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Ячмінне борошно	63,5	213,4	А	363,9
Кукурудзяне борошно	44,8	150,52		
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1	3,4	Б	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,3		
$\text{CaCl}_2$	0,1	0,3		
Конденсат	336 л			
Вода	2656,1 л			
<b>Всього</b>	<b>3360 л</b>			

*ДР 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А*

До складу композиції входить 213,4 кг ячмінного борошна, та 150,52 кг кукурудзяного борошна.

Борошно готують шляхом змішування його з 2627 л води. Отриману масу заварюють у реакторі-змішувачі об'ємом 3400 л протягом 60 хв при 95°C і стерилізують при 112°C, тиску -0,15 атм, 30 хвилин.

*ДР 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних вагах зважують 3,4 кг  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , далі 300 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та 300 г  $\text{CaCl}_2$ . Всі три наважки переносять в реактор-змішувач об'ємом 40 л. За для унеможливлення випадання осаду сульфату стерилізацію проводимо при рН 4-4,5 завдяки додаванню 6 % розчину  $\text{HCl}$  (від ДР 3.1.1). Постійно

перемішуючи доливають 29,1 л питної води. Стерилізують при температурі 131°C, впродовж 40 хв і за тиску 0,15 МПа.

### **ТП 5 Підготовка посівного матеріалу**

#### **ТП 5.1 Підтримання колекційної культури**

Колекційну культуру *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром під шаром вазелінової олії в холодильниках. Шар олії повинен бути лише на 1 см вище агарового зрізу. Пересіви здійснюють кожні 6 місяців. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

#### **ТП 5.2 Одержання та вирощування робочої культури на середовищі МПА**

Щоб отримати робочу культуру, необхідно колекційну культуру, що зберігається в пробірках з скошеним поживним середовищем розсіяти петлею на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром до ізолюваних колоній, вирощуючи бактерії при температурі 37°C упродовж 48 год.

Ізолювані колонії пересівають петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром, причому одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки. Використовуються колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість вирощування – 24 год при 37°C.

#### **ТП 5.3 Вирощування культури в колбах на качалках**

Для вирощування культури у колбу об'ємом 5 л зі стерильною композицією А (від ДР 4.1.1 ) додають стерильну композицію Б (від ДР 4.1.2 ), композицію В (від ДР 4.1.3). Ретельно перемішують і розливають у 24 колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 вносять фізіологічний розчин. Клітини суспендують, піпеткою вносять в кожну колбу з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Тривалість вирощування інокуляту в колбах на качалках – 48 годин. Вирощування проводиться в автоклаві при температурі 37 °С. Швидкість обертів качалок – 200 обертів на хвилину.

Після закінчення вирощування інокуляту проводять мікробіологічний контроль на відсутність сторонньої мікробіоти у кожній із 24 колб. Після його проведення посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 5 л.

#### *ТП 5.4 Вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 65 л*

Вмикають інокулятор з стерильною композицією Б (від ДР 4.2.2). вмикають мішалку, барботер, контролер рівня рН та температури. Далі додають стерильні композиції А (від ДР 4.2.1 ). Для нейтралізації середовища та підтримки рН на рівні 7 в посівному апараті подають 6%-вий розчин NaOH (від ДР 3.2.1). Далі вносять посівний матеріал (від ТП 5.3).

Культивування проводиться при температурі 37°С. тривалість культивування становить 48 годин. Під час культивування в малому інокуляторі швидкість обертання мішалки становить 200 обертів на хвилину. Також підтримується аерація на рівні 1 об'єм повітря на 1 об'єм поживного середовища.

Через кожні 4 годин відбирають проби для проведення аналізу на відсутність сторонньої мікрофлори.

#### *ТП 5.5 Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 630 л*

Вмикають інокулятор з попередньо простерилізованою композицією Б (від ДР 4.3.2). Вмикають мішалку, барботер, контроль рівня рН та температури. Далі додають стерильні композиції А (від ДР 4.3.1) композицію. Далі вносять посівний матеріал зі збірника (від ТП 5.4). Для нейтралізації середовища та підтримки рН на рівні 7 в інокулятор подають 6%-вий розчин NaOH (від ДР 1.2.2).

Культивування на даному етапі проводять за температури 37°C. Тривалість культивування становить 48 годин, підтримується аерація на рівні 1 об'єм повітря на 1 об'єм поживного середовища. Швидкість обертів мішалки становить 200 обертів на хвилину.

Через кожні 4 годин відбирають проби для проведення аналізу на відсутність сторонньої мікрофлори.

## **ТП 6 Біосинтез**

### *ТП 6.1 Виробниче культивування в ферментері об'ємом 6,3 м<sup>3</sup>*

У посівний апарат зі стерильною композицією Б (від ДР 4.5.2 ) додають композицію А (від ДР 4.5.1 ). Вмикають ферментер, включаючи мішалку, барботер, контролер рН та температури. Вносять посівний матеріал (від ТП 5.5). Для нейтралізації середовища та підтримки рН на рівні 7 в посівний апарат подають 6%-вий розчин NaOH (від ДР 1.2.2 ).

Культивування проводять за температури 37°C, швидкість обертів мішалки становить 200 обертів за хвилину. Підтримується аерація на рівні 1 об'єм повітря на 1 об'єм поживного середовища. Час культивування становить 48 годин. Через кожні 4 години відбирають проби для проведення аналізу на відсутність сторонньої мікрофлори. Культивування припиняють, коли швидкість росту знижується, внаслідок вичерпання субстратів та накопичення продуктів обміну.

## **ТП 7. Зберігання біомаси та культуральної рідини після біосинтезу**

Культуральну рідину, що містить біомасу зберігають в металевому збірнику, в асептичних умовах, щоб не було контамінування та псування продукту.

## **ТП 8. Виділення біомаси**

### *ТП 8.1.Центрифугування біомаси від культуральної рідини*

Біомаса та культуральна рідина (від ТП 7) подається на фільтраційну центрифугу (Ц-3) при швидкості 10 тис g в протягом 10—15 хвилин та

температурі 4°C. Відфільтрована рідина подається на знешкодження відходів. А отримана біомаса на подальшу обробку (до ТП 9).

## **ТП 9. Дезінтеграція і екстрагування**

### *ТП 9.1. Руйнування бактеріальних клітин*

Отримана біомаса (від ТП 8.1.) подається на ультразвуковий дезінтегратор (УД-4) з амплітудою коливань на 22 кГц та температурі 25°C. При обраному значенні опромінюють суспензію клітин (1 г сирової біомаси та 5 мл середовища руйнування) послідовно 6-10 разів з інтервалами в 30 сек. при проміжному охолодженні випромінювача і суспензії у воді з льодом. Після руйнування зруйновані клітини передаються на наступну стадію (до ТП 10)

## **ТП 10. Позбавлення від уламків зруйнованої клітини**

### *ТП 10.1. Центрифугування зруйнованих клітин*

Отриману суміш (від ТП 9.1) подаємо на фільтраційну центрифугу (Ц-6) при 20 тис. g центрифугуємо протягом 10–15 хвилин при 4° С після чого переходимо до очищення ферменту на стадію (до ТП 11)

## **ТП 11. Очищення цільового продукту в ультрафільтраційній установці**

Екстрагований фермент (від ТП 10.1) подають на ультрафільтраційну установку (УФ-8) при температурі  $t=25^{\circ}\text{C}$ , та тиску  $p=0,2-1$  МПа, після чого вже очищений фермент з активністю  $E=45$  МО/г передають на пакування (до ТП 12).

## **ТП 12. Дозування та розлив продукту**

### *ТП 12.1 Дозування та розлив у каністри*

Очищений цільовий продукт (від ТП 11) за допомогою лінійної лінії розливу (ЛР-11) дозують та розливають по 25 л. Можливі зміни в вазі обов'язково відмічають на тарі. Далі готовий продукт відправляють на зберігання та реалізацію (до ТП 13)

## **ТП 13. Зберігання та реалізація**

Готовий продукт зберігають в сухому, прохолодному приміщенні, подалі від сонячних променів при температурі не вище 25 ° С відносній вологості не більше 70%.

#### ***ЗВ 14. Знешкодження відходів***

Відпрацьовані робочі розчини мийних та мийно-дезінфікуючих засобів, воду та аераційне повітря знешкоджують.

##### ***ЗВ 14.1. Знешкодження рідких відходів***

Знешкодження рідких відходів відбувається шляхом пропускання останніх через фільтри комплексної очистки. Стічні води біотехнологічних виробництв можуть містити живу мікрофлору та інші шкідливі речовини. На виході з цеху стічні води стерилізують і нейтралізують. Надалі їх спрямовують на очисні споруди та в подальшому, можуть залучатися в виробництво, або ж спускатися в каналізацію.

##### ***ЗВ 14.2. Знешкодження газоподібних відходів***

Очищення викидів з ферментерів здійснюють у фільтрах з попереднім охолодженням газів, зниженням вологості вологовідбійниках зподальшим нагріванням, щоб уникнути попадання крапельної вологи і змочування фільтрів.

Під час очищення повітря, що входить в вентиляційну систему, використовують різноманітні фільтри з волокнистих матеріалів.

Очищене повітря викидається через трубу розсіювання.

## РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 9.1. Карта постадійного контролю

Згідно науково-технічної документації на підприємстві забезпечується контроль процесу виробництва  $\beta$ -глюканази та контроль готової продукції. Це здійснюється для забезпечення відповідності готової продукції вимогам.

Упродовж всього процесу виробництва продукту, необхідно проводити контроль санітарного стану цехів та робочих місць, відповідність сировини, допоміжних матеріалів, та ін.

					НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Мармаш І.С.					114	
Керівник		Гудзенко О.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

## 9.2. Мікробіологічний контроль

### Карта контрольних точок виробництва препарату

#### «Альфалаза АПЗ»

Таблиця 9.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх Приготування мийно-дезинфікуючого розчину каустичної соди	Концентрація розчину каустичної соди	Хімічний контроль	Після приготування розчинів.	C = 2 %
Кх Приготування мийно-дезинфікуючого розчину Дезактіну	Концентрація розчину Дезактіну	Хімічний метод	Після приготування розчинів	C = 0,2%
Км, Кх Генеральне прибирання	Підлога, стіна, обладнання Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 800/см <sup>2</sup>
Км, Кх Щоденне прибирання виробничих приміщень	Підлога, стіна, обладнання Чистота	Візуальний огляд, мікробіологічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 300/см <sup>2</sup>

Кт Миття обладнання	Мийно-дезинфікуючий розчин обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки, візуальний огляд після миття	$t = 50-60^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 60$ хв чисте обладнання
Кт Дезинфекція та ополіскування	Мийно-дезинфікуючий розчин, обладнання Температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції обробки	$t = 36^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв
Кт Перевірка на герметичність обладнання	Герметичність роботи обладнання, Час роботи, тиск, температура	Манометр технічний, годинник, термометр	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність, перепад тиску визначають після проведення операції	$P = 0,1-0,2$ МПа, $\tau = 30$ хв
Кт Стерилізація обладнання	Обладнання Температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Манометр технічний, годинник, термометр технічний	Температура визначається безперервно під час стерилізації, надлишковий тиск визначають після проведення стерилізації	$P = 0,2$ МПа, $\tau = 30$ хв, $t = 125 - 130^{\circ}\text{C}$

Кт Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 85 \%$
Кт Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P = 0,4 \text{ МПа}$ , $t = 120\text{--}150 \text{ }^\circ \text{C}$
Кт Охолодження повітря та видалення вологи	Охолоджене повітря, після видалення зайвої вологи температура	Датчик температури, психометричний метод	Після охолодження повітря та видалення зайвої вологи	$t = 20 \text{ }^\circ \text{C}$ , $W = 60 \%$
Кт Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Датчик температури	Після нагрівання повітря	$t = 35 \text{ }^\circ \text{C}$ $W = 60 \%$
Кт, Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в інокуляторі об'ємом 65 л, посівному апараті 630 л та ферментері об'ємом 6,3 м <sup>3</sup> .	Розчин соляної кислоти Концентрація	Хімічний метод	Концентрація розчину визначається після приготування	$C = 6 \%$

Кт, Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища в інокуляторі об'ємом 65 л, посівному апараті 630 л та ферментері об'ємом 6,3 м <sup>3</sup> .	Розчин гідроксиду натрію Температура, час, концентрація, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, концентрація розчину визначається після приготування, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ = 40 хв, С=6 %, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ = 30 хв, Р=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ = 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло- гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ = 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти

Км Підтримання колекційної культури	<b>Колекційну культуру Bacillus subtilis ZJF-1A5</b> Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольо- ваних мутацій	Мікробіоло- гічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять кожні 6 місяців при пересіві культури	Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіоло- гічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, мікробіологіч ний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин	t= 37 °С, τ= 48 год, періодичне перемішу- вання, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 65 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск,	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин	t= 37 °С, τ= 48 год, ω = 200 об/хв (періодичне перемішу- вання кожні 4 год), P <sub>надл.</sub> =0,03— 0,04 МПа, відсутність

	мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів			сторонньої мікробіоти
Кт, Км Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 630 л	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 48$ год, $\omega = 200$ об/хв (періодичне перемішування кожні 4 год), $P_{\text{надл.}} = 0,03\text{—}0,04$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км Виробниче культивування в ферментері об'ємом 6,3 м <sup>3</sup>	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 48$ год, $\omega = 200$ об/хв (періодичне перемішування кожні 4 год), $P_{\text{надл.}} = 0,03\text{—}0,04$ МПа, відсутність сторонньої мікробіоти

	а чистота культури, морфологічна відповідність організмів			
Кх Зберігання біомаси та культуральної рідини після біосинтезу	Наявність сторонньої мікрофлори	Мікробіологічні методи висівання, або експрес-тести	Весь час	Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт Центрифугування культуральної рідини	Швидкість обертання, відносна вологість біомаси	Манометри на вході та виході з фільтру, метод визначення відносної вологості методом різниці маси вологої біомаси та висушеної	Швидкість весь час, відносна вологість після закінчення фільтрування	Швидкість обертів 1000об/хв, мінімальна кількість культуральної рідини на біомасі
Кт Руйнування в ультразвуковому дезінтеграторі	Амплітуда коливаль, температура	Термометр, датчик	Весь час	t=25°C A=22 кГц

Кт Центрифугування зруйнованих клітин	Відсутність уламків клітин, швидкість обертання	Мікроскопію вання	В кінці процесу	Відсутність Уламків клітин, швидкість обертів 2000 об/хв
Кх, Кт Виділення ферменту	Температура,к онцентрація	Термометр Титрування	Весь час	t=25°C C=27-33%
Кт Очищення цільового продукту в ультрафільтраційн ій установці	Температура, Активність, тиск	спектрофото метричні методи	Температура весь час, активність в кінці	t=25oC p=0,2-1 МПа E=45 МО/г
Кт Дозуваннята розлив продукту у каністри	Масса продукту яку дозують, цілістність тари	Ваговий дозатор, фізична та фактична цілістність тари	Весь час процесу	По 25 л, цілістність
Кт Зберігання та реалізація	Температура, вологість повітря	Електронний термометр та клімат- контроль	Весь час	t=25 С, вологість повітря не вище 70%

Виходячи з того, що культивування бактерій *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 з метою одержання  $\beta$ -глюканази здійснюється в асептичних умовах, то необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації. Тому упродовж культивування періодично (кожні 8 години) з інокуляторів та ферментера відбирають проби культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється шляхом розсіву культуральної рідини на агаризовані середовища та мікроскопіюванням.

Пробу культуральної рідини за допомогою петлі розсівають на чашки Петрі, до ізольованих колоній, з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, глюкозо – картопляним агаром (ГКА) та сусло – агаром (СА) – грибів та дріжджів.

Колонії *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 при вирощуванні на МПА мають округлу форму, сірувато-білого кольору, матові, з нерівним хвилястим краєм. Розмір коливається в межах 2-5 мм (рис. 9.1).

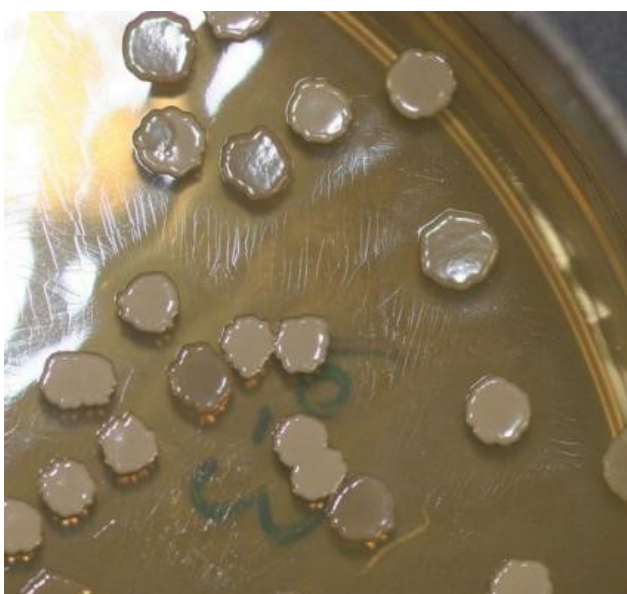


Рис. 9.1. Культура *Bacillus subtilis* ZJF-1A5. Колонії на МПА[69]

Для мікроскопування використовують метод з імерсійною системою. Препарат готують на знежиреному предметному склі, в асептичних умовах, на яке наносять невелику краплю культуральної рідини. Краплю розподілюють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка 1 см<sup>2</sup>). Мазок висушують при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. На сухий препарат наносять 1-2 краплини імерсійного масла та мікроскопіюють.

За відсутності сторонньої мікрофлори в полі зору будуть лише клітини бактерій *Bacillus subtilis* ZJF-1A53. Клітини даного мікроорганізму мають вигляд безбарвних прямих паличок, розміром приблизно 0,7 мкм в

товщину і 2-8 мкм в довжину. За Грамом бактерії грампозитивні, та під час фарбування спостерігається забарвлення клітин в фіолетовий колір[70].

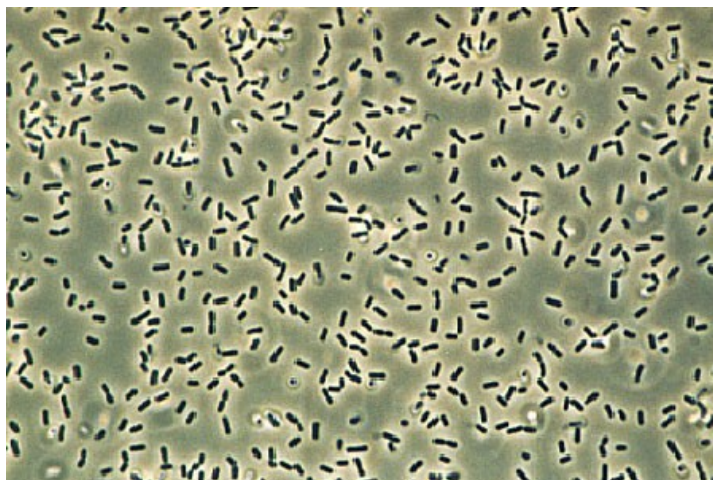


Рис. 6.2. Клітини *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 під мікроскопом [70].

### 9.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

#### 9.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютну суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком. У пробірки із 9 мл стерильної води вносимо по 1 мл культуральної рідини.

Суміш перемішують, потім вимірюють оптичну густина за допомогою спектрофотометра (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком[71].

#### 9.3.2. Концентрація цільового продукту

##### Визначення активності $\beta$ -глюканази

Для визначення активності  $\beta$ -глюканази використовують метод за Шомоді-Нельсону.

Суть методу: метод заснований на кількісному визначенні редукуючих цукрів, які утворюються при дії  $\beta$ -глюканази на  $\beta$ -1,4-зв'язки  $\beta$ -глюкану при визначенні в стандартних умовах.

Метод Шомоді-Нельсона полягає в взаємодії карбоксильної груп редукуючих цукрів з двохвалентним іоном міді і арсено-молібденовим

реактивом з утворенням блакитного забарвлення, інтенсивність якого вимірюється колориметрично при довжині хвилі 660 нм.

За одиницю  $\beta$ -глюканазної активності приймають кількість ферменту, який діє на  $\beta$ -глюкан з вивільненням 1 мкмоль редуруючих цукрів (в перерахунку на глюкозу), утворюваного за 1 хв при стандартних умовах: температурі 50°C; рН = 4,7; продовжуваність гідролізу 10 хв.

Вміст редуруючих цукрів, які утворюються в результаті ферментативної реакції, визначають колориметричним методом і розраховують по градулювальному графіку, побудованому для глюкози.

Проведення аналізу:

В три пробірки (дві дослідні і одна контрольна) вносять по 1 см<sup>3</sup> субстрату  $\beta$ -глюкану. Пробірки закривають пробками, розміщують у термостаті або на водяній бані з температурою 50°C і витримують 5 хв.

В дві дослідні пробірки додають по 1 см<sup>3</sup> робочого розчину аналізуючої проби (культуральної рідини), попередньо підігрітою при температурі 50°C, і ретельно перемішують. Три пробірки (дві дослідні та одна контрольна) поміщають в ультратермостат або на водяну баню з температурою 50°C на 10 хв.

В контрольну пробірку вносять 1 см<sup>3</sup> робочої культуральної рідини.

В усі пробірки додають по 1 см<sup>3</sup> реактива Шомоді. Пробірки витримують 20 хв в киплячій водяній бані, потім охолоджують до кімнатної температури. Додають 1 см<sup>3</sup> реактива Нельсона, перемішують протягом 5 хвилин. В пробірки додають по 5 см<sup>3</sup> дистильованої води і центрифугують при 3000 хв<sup>-1</sup> протягом 5 хв або фільтрують через воронку зі скляним фільтром.

Освітлені розчини колориметрують на фотоколориметрі або спектрофотометрі при довжині хвилі 660 нм в кюветах з товщиною поглинаючого світла слою 10 мм проти контрольної проби на реактиви.

Ферментативна активність  $\beta$ -глюканази в контрольному розчині, од/мл, розраховують за формулою:

$$\beta - \text{ГЛА} = \frac{C_0 - C_k}{t \cdot c},$$

де  $C_0$  – молярна концентрація глюкози в дослідній пробі, знайдена по калібрувальному графіку, мкмоль/см<sup>3</sup>;

$C_k$  – молярна концентрація глюкози в контрольній пробі, знайдена по калібрувальному графіку, мкмоль/см<sup>3</sup>;

$t$  – продовжуваність гідролізу, хв

$c$  – масова концентрація ферментного препарату [72].

### 9.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

#### Визначення концентрації амінного азоту.

Джерелом азоту в середовищі для культивування *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 є ячмінне борошно, до складу якого входить азот в аміній формі.

Концентрацію азоту визначають у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 при 3000 об/хв протягом 20 хв, для видалення біомаси, мідним методом.

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням. Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  у боратному буферному розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату додають оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді.

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину додають йодид калію. В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитрують розчином тіосульфату натрію.

1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідне 0,28 мг змінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу  $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$ .

Техніка визначення. В мірну колбу місткістю 50 мл піпеткою вносять 5 мл дослідного розчину, додають 3-4 краплини індикатору тимолфталеїну і по краплям розчин гідроксиду натрію концентрацією 0,1 моль/л до появи блідно-блакитного забарвлення. До слабо лужного розчину із циліндра при перемішуванні порціями обережно приливають 30 мл суспензії ортофосфату міді, вміст колби доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, додають 0,5 мл 80 %-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л . В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію.

При прийнятому розбавленні кількість амінного азоту в 10 мл фільтрату отримують множенням маси тіосульфату натрію, витраченого на титрування, на 0,28. З урахуванням розчинення це відповідає 1 мл культуральної рідини. Вміст амінного азоту X розраховують за рівнянням:

$$X = \frac{a \cdot 0,28 \cdot b \cdot 10 \cdot 100}{50},$$

де а - кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, витраченого на титрування, л ;

б - об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, л[73].

## РОЗДІЛ 10 АВТОМАТИЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА

### Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки з формуванням

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.02.26.ДП ПЗ			
Розроб.		Мармаш І.С.			<b>РОЗДІЛ 10</b> <b>АВТОМАТИЗАЦІЯ</b> <b>ВИРОБНИЦТВА</b>	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Клименко О.М.					128	
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Таблиця 10.1

## Завдання на розробку системи автоматизації

Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Оптимальні значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
Реактор-змішувач для композиції А, 400 л	Температура	112°C ± 2°C	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
			Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
	Тиск пари	0,15 МПа ± 20 кПа	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
	рН	7 ± 0,5	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
	Рівень рідини в апараті	80% ± 3%	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора
	Витрати води	252,8	Контроль	Відображення реєстрація	АРМ оператора

## Перелік контурів автоматичного контролю, сигналізації і керування

№ прикладу	Призначення контуру
1	Контроль температури приладами встановленими «по місцю»
2	Контроль тиску пари
3	Контроль рН приладами встановленими «по місцю» (лічильники)
4	Контроль рівня рідин, що не кристалізуються буйковими/поплавковими рівнемірами
5	Контроль витрат рідини
6	Контроль витрат рідини
7	Контроль тиску
8	Контроль тиску
9	Контроль витрат рідини
10	Контроль кількості обертів мішалки

**Опис схеми автоматизації**

Згідно до завдання, розроблена таблиця 1, у першому контурі автоматичного контролю і управління контролюємо і регулюємо температуру, яка має конкретне значення 112°C в межі  $\pm 2^\circ\text{C}$ . Контроль за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога з (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для регулювання температури використовується її стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни витрати пари в «парову рубашку» апарата.

У даному контурі автоматизації передбачається як контроль так і управління.

Виходячі з того, що контроль температури відбувається постійно в певному діапазоні, треба розглядати приклади контролю, які від датчика отримують аналоговий (неперервний) сигнал. Для цього найкраще

підходить приклад №4, якій зображений на схемі автоматизації. Зображення датчика температури (термометру опору) ми розташовуємо на технологічній схемі біля зображення технологічного апарата. Лінію зв'язку від датчика температури продовжуємо на прямокутники «ПЛК» і «ПК». Для спрощення роботи з зображенням ліній зв'язку на СА (щоб не було їх перетину), ця лінія має розрив, на кожному з кінців якої вказується цифра 1, за допомогою яких можна відрізнити цей розрив.

На перетині цієї лінії зв'язку від датчика з функціональними лініями ПЛК та ПК крапками вказуємо функції, які повинні бути виконуватись ними у відповідності з завданням.

На ПЛК з сигналом від датчика зображено виконання функцій:

- перетворення сигналу в цифрову форму (літера Y). Вважаючи, що від датчика температури подається аналоговий сигнал, крапку ставимо саме на перетині вертикальної лінії (від датчика) з горизонтальною лінією-функцією ВА (перетворення аналогового вхідного сигналу в цифрову форму);
- для показу, що інформація від датчика використовується для регулювання температури – крапку ставимо на перетині лінії від датчика з лінією літери С.

Перетворений сигнал від датчика після контролера подається на персональний комп'ютер ПК (АРМ оператора–технолога), де виконуються такі функції:

- контроль за показами температури на екрані АРМа оператора-технолога – крапка ставиться на перетині сигналу від датчика з лінією від літери І.
- запис зміни значень температури архів (тренд), з можливістю його перегляду – крапка ставиться на перетині сигналу від датчика з лінією від літери R.
- інформація про те, що в системі управління передбачена можливість зміни завданого значення технологічного параметра,

налаштувань (параметрів) регулятора – крапка ставиться на перетині сигналу від датчика з лінією від літери С.

*Реалізація функції управління.*

Згідно з завданням на автоматизацію цього контуру вказано, що виконання контролю та правки температури відбувається за рахунок зміни подачі пари, на схемі автоматизації на трубопроводі подачі пари показуємо зображення регулюючого органу і виконавчого механізму, до якого буде під'єднуватись лінія зв'язку, яка буде виходити з ПК і ПЛК. У нас застосовують аналогове регулювання для реалізації даного управляючого контуру може бути вибраний приклад 31, в якому показаний аналоговий пневматичний виконавчий механізм для керування яким необхідно передбачити електро-пнеumo перетворювач, який показується на схемі автоматизації у прямокутнику «Щит перетворювачів». На нього поступає сигнал з ПЛК, який в свою чергу отримує сигнал з АРМа оператора технолога.

Крапки на пересіченні лінії зв'язку з функціональними лініями ПЛК і ПК показують що:

- крапка на функціональній лінії ПК «С» показує, що схема передбачає можливість ручного управління клапаном подачі пари, зміни налаштувань регулятора і зміну заданого значення з АРМа оператора-технолога;
- крапка на функціональній лінії ПЛК «С» показує, що регулюючим органом керує ПЛК;
- крапка на функціональній лінії ПЛК «АВ» показує, що з ПЛК на перетворювач поступає аналоговий управляючий сигнал.

Лінія зв'язку від електро- пневмоперетворювача до виконавчого механізму має розрив, який позначений цифрою 2.

Всі прилади, які входять до цього контуру мають позначення, яке складається з цифри 1 і літери, яка за алфавітом змінюється від датчика до виконавчого механізму і регулюючого органу: 1а (первинний

перетворювач – датчик), 1б (електро- пневмоперетворювач), 1в (виконавчий механізм і регулюючий орган).

Регламентоване значення технологічного параметра (температури) проставляється на лінії зв'язку від датчика, біля першого прямокутника. У нашому випадку це значення 112°C.

Зображення цього контуру контролю і управління наноситься на схему автоматизації

У другому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати тиск пари в паровій рубашці апарату №1, який має регламентоване значення 0,15 МПа і має припустимі межі  $\pm 20$ кПа. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві.

Враховуючи, що вимірювання тиску відбувається неперервно в часі в певному діапазоні, тому необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий (неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю». Цьому завданню саме відповідає приклад №5, зображення якого ми переносимо на схему автоматизації. Для цього контуру безпосередньо біля технологічного апарату вказується тільки місце відбору параметра. Функціоналу лінію зв'язку від датчика тиску подаємо на прямокутники «ПЛК» і «ПК».

На перетині цієї лінії зв'язку з функціональними лініями ПЛК та ПК крапками вказуємо необхідні нам функції:

На ПЛК з сигналом від датчика виконуються функція перетворення сигналу в цифрову форму (літера Y). Враховуючи те, що від датчика тиску подається уніфікований аналоговий сигнал, зображаємо крапку саме на перетині вертикальної лінії (від датчика) з горизонтальною лінією-функцією ВА (перетворення аналогового вхідного сигналу в цифрову форму).

Після контролера перетворений сигнал від датчика подається на персональний комп'ютер ПК (АРМ оператора–технолога), де виконуються наступні функції:

- відображення значення тиску на екрані АРМі оператора–технолога
- крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною літерою І;
- запис зміни значень тиску в архів (тренд), який можна переглядати -  
крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною літерою R).

Лінія зв'язку з розривом, позначена цифрами 11. Прилад для вимірювання тиску має позицію – ба.

У **третьому** контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати значення величини рН в технологічному апараті, який має регламентоване значення 7 рН і має припустимі межі  $\pm 0,5$  рН. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Для регулювання значенням величини рН передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок зміни подачі окислювача в апарат . Для реалізації використовується датчик рН метр (приклад 20).

У **четвертому** контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати і регулювати рівень рідини в технологічному апараті №1, який має регламентоване значення 80% і має припустимі межі  $\pm 3\%$ . Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Для регулювання рівня передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі рідини в технологічний апарат.

В **п'ятому і шостому** необхідно управляти роботою двигунів насосів подачі рідини в апарат.

Для управління двигунами насосів пропонується використати приклад №29, зображення якого ми переносимо на схему автоматизації.

Схемою передбачено:

- управління з АРМа оператора включенням - відключенням насосів.
- ручне управління з щита перетворювачів включенням - відключенням насосів;
- аварійне відключення насосів кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса.

Для управління з АРМа на схемі показана крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПК «літерою S».

Крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПК «літерою І» показує, що стан насоса (включено-відключено) відображається на АРМі оператора.

Крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПЛК «літерою S» показує, що управління насосом відбувається саме з ПЛК, а саме через дискретні виходи ПЛКІ про що свідчить крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПЛК «ДВ» (дискретні виходи).

Для забезпечення безаварійної роботи насосів необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» з щита управління SB2, SB4 та безпосередньо біля насосів («по місцю») SB1, SB3. Для вибору місця з якого саме буде здійснюватись управління використовується тумблер SA1 та SA2 (перемикачі). Подача напруги на двигуни насосів здійснюється за допомогою магнітних пускачів КМ1 та КМ2. Лінії зв'язку з розривом, позначені цифрами 7 та 8.

У дев'ятому контурі передбачена відкачки рідини з технологічного апарату. Для управління двигунами насосів також пропонуємо використати приклад №29, зображення якого ми переносимо на схему автоматизації.

Схемою передбачено:

- управління з АРМа оператора включенням - відключенням насосів.

- ручне управління з щита перетворювачів включенням - відключенням насосів;
- аварійне відключення насосів кнопкою, розташованою «по місцю» біля насоса.

Для управління з АРМа на схемі показана крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПК «літерою S».

Крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПК «літерою І» показує, що стан насоса (включено-відключено) відображається на АРМі оператора.

Крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПЛК «літерою S» показує, що управління насосом відбувається саме з ПЛК, а саме через дискретні виходи ПЛКІ про що свідчить крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною лінією ПЛК «ДВ» (дискретні виходи).

Для забезпечення безаварійної роботи насосів необхідно використати елементи управління (кнопки «Пуск» та «Стоп») в «ручному режимі» з щита управління SB2, SB4 та безпосередньо біля насосів («по місцю») SB1, SB3. Для вибору місця з якого саме буде здійснюватись управління використовується тумблер SA1 та SA2 (перемикачі). Подача напруги на двигуни насосів здійснюється за допомогою магнітних пускачів КМ1 та КМ2.

У десятому контурі автоматичного контролю і управління, необхідно контролювати кількість обертів мішалки в апараті, яка має значення 100 об/хв і має припустимі межі  $\pm 10$  обертів. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрація) цих змін в його архіві. Для регулювання рівня передбачається його стабілізація на заданому значенні за рахунок подачі електроенергії для збільшення потужності мотора.

Враховуючи, що вимірювання кількості обертів відбувається неперервно в часі в певному діапазоні, тому необхідно розглядати приклади контролю в яких від датчика отримується аналоговий

(неперервний) сигнал. При цьому сам датчик розташований «по місцю». Цьому завданню саме відповідає приклад №5, зображення якого ми переносимо на схему автоматизації. Для цього контуру безпосередньо біля технологічного апарату вказується тільки місце відбору параметра. Функціоналу лінію зв'язку від датчика тиску подаємо на прямокутники «ПЛК» і «ПК».

На перетині цієї лінії зв'язку з функціональними лініями ПЛК та ПК крапками вказуємо необхідні нам функції:

На ПЛК з сигналом від датчика виконуються функція перетворення сигналу в цифрову форму (літера Y). Враховуючи те, що від датчика тиску подається уніфікований аналоговий сигнал, зображаємо крапку саме на перетині вертикальної лінії (від датчика) з горизонтальною лінією-функцією VA (перетворення аналогового вхідного сигналу в цифрову форму).

Після контролера перетворений сигнал від датчика подається на персональний комп'ютер ПК (АРМ оператора–технолога), де виконуються наступні функції:

- відображення значення тиску на екрані АРМі оператора–технолога
- крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною літерою I;
- запис зміни значень тиску в архів (тренд), який можна переглядати - крапка на перетині лінії зв'язку з функціональною літерою R).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ферменты для пивоварения [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/ru\\_RU/products/enzymes/brewing.html](https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/ru_RU/products/enzymes/brewing.html)
2. Фермент Ультрафло L [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Water\\_and\\_heat\\_processing/Sacharification\\_station/Ultraflo\\_L.htm](http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Water_and_heat_processing/Sacharification_station/Ultraflo_L.htm)
3. Ферменты для пивной промышленности [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://homebeer.csutio.ru/articles-from-beer/fermentyi/>
4. Ферменты ENZIM [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ferment.enzim.biz>
5. Структурная формула [Электронный ресурс]. <https://www.megazyme.com/focus-areas/beta-glucan-portal>
6. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [file:///C:/Users/v/Desktop/доки%20нухт/BTR2018\\_6\\_012.pdf](file:///C:/Users/v/Desktop/доки%20нухт/BTR2018_6_012.pdf)
7. Геміцеллюлазные ферменты [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://chemanalytica.com/book/novyy\\_spravochnik\\_khimika\\_i\\_tekhnologa/06\\_syre\\_i\\_produkty\\_promyshlennosti\\_organicheskikh\\_i\\_neorganicheskikh\\_veshchestv\\_chast\\_II/5429](http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/5429)
8. Альфалаза [Электронный ресурс]. <http://ekspoteh.ru/index.php?name=production&op=view&id=128>
9. Дехтяренко Н.В. Виробництво ферментних препаратів в Україні // Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2013
10. Tang, X.-J., He, G.-Q., Chen, Q.-H., Zhang, X.-Y., & Ali, M. A. Medium optimization for the production of thermal stable b-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology // Bioresource Technology. -2004.- Vol.93.-P. 175–181.

11. *Marco, J. L. de, & Felix, C. R.* Purification and Characterization of a  $\beta$ -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential//2007.-Vol.50, N. 1.-P.21-29.
12. *Celestino, K., Cunha, R. B., & Felix, C. R.*, Characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry// BMC Biochemistry.-2006.Vol.7(1).-P. 23.
13. Пат. 2046141 РФ, Штамм бактерий *bacillussubtilis*- продуцент комплекса гидролитических ферментов, обогащенных  $\beta$  – глюкоканазой/*Бочкарева Н.Г.; Белогорцев Ю.А.; Удалова Э.В.* та ін.- Оpubл. 20.10.95.
14. Бациллюс субтилис (*Bacillus subtilis*, сенная палочка): биохимические свойства, выращивание и применение [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://fb.ru/article/438399/batsillyus-subtilis-bacillus-subtilis-sennaya-palochka-biohimicheskie-svoystva-vyiraschivanie-i-primeneni>
15. *Marco, J. L. de, & Felix, C. R.* Purification and Characterization of a  $\beta$ -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential// Vol.50, n. 1 : pp.21-29, January 2007 ISSN 1516-8913 Printed in Brazil
16. Сенная палочка помогла увидеть прошлое бактерий [Электронный ресурс]. Режим доступа:<https://lenta.ru/news/2009/02/13/bacteria/>
17. Colony Morphology [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.syracusebiotechnology.com/wp-content/uploads/2013/07/Colony-Morphology.pdf>
18. *Пархоменко Татьяна Юрьевна*/Новый перспективный штамм *Bacillussubtilis* [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/novyuy-perspektivnyuy-shtamm-bacillus-subtilis>

19. Определитель бактерий Берджи [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o\\_61284#13](https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_61284#13)
20. Ферменты в пивоварении [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://ekspoteh.ru/index.php?name=production&op=view&id=128>
21. Солод в пиве [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://barley-malt.ru/?p=8882>
22. Украина наращивает производства пива [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://delo.ua/business/ukraina-naraschivaet-obemy-proizvodstva-piva-351887/>
23. *Карлаш Ю.В.* Основы проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до практ. занять для студ. напр. підгот. 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч.– К.: НУХТ, 2016. – 83 с.
24. *Пирог Т.П., Карлаш Ю.В., Красінько В.О.* Основы проектування біотехнологічних виробництв: метод. Рекомендації до викон. курсового проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навчання. К.: НУХТ, 2015. – 87 с.
25. Гликолиз КЕГГ [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=bsx&mapno=01100&mapscale=0.35&show\\_description=hide&show\\_module\\_list](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=bsx&mapno=01100&mapscale=0.35&show_description=hide&show_module_list)
26. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ, 2010. – 632 ст.
27. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Streptomyceslavendulae* [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=slx&mapno=00010&mapscale=&show\\_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=slx&mapno=00010&mapscale=&show_description=show)
28. Citratecycle (TCAcycle) - *Streptomyceslavendulae* [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=slx&mapno=00020&mapscale=&show\\_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=slx&mapno=00020&mapscale=&show_description=show)

29. Біосинтез амінокислот [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://studopedia.com.ua/1\\_8636\\_biosintez-amlnokislot.html](https://studopedia.com.ua/1_8636_biosintez-amlnokislot.html)
30. *А. С. Пастушенко, Н. С. Храмов, О. І. Норинський.* Процеси і апарати біотехнологічного виробництва Методичні рекомендації до виконання практичних робіт для здобувачів ступеня вищої освіти «Бакалавр» напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання- Миколаївського національного аграрного університету, 2016.- 49 с.
31. Конструкції мішалок [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukrbukva.net/813-Konstrukcii-meshalok.html>
32. *Карлаш Ю.В.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до практич. занять для студ. напр. підгот. 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч.– К.: НУХТ, 2016. – 83 с.
33. *Пирог Т.П., Карлаш Ю.В., Красінько В.О.* Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. Рекомендації до викон. курсового проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навчання. К.: НУХТ, 2015. – 87 с.
34. *Пирог Т.П., Ігнатова О.А.* Загальна біотехнологія. – Київ: НУХТ, 2009. – 336 с.
35. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 №502.
36. Хімічний метод дезінфекції. Каустична сода[Електронний ресурс] // Режим доступу : <https://veterinarua.ru/1epizootologiya/2205-khimichnij-metod-dezinfektsiji.html>
37. Кальцинована сода [Електронний ресурс] // Режим доступу : [https://www.covalent.com.ua/shop/soda\\_ash/](https://www.covalent.com.ua/shop/soda_ash/)

38. Біомой [Електронний ресурс] // Режим доступу :  
<https://dezmed.com.ua/uk/instrukcii/761-biomoj-metodicheskie-rekomendacii-instrukciya-po-primeneniyu>
39. Гембар [Електронний ресурс] // Режим доступу :  
<http://www.attis.com.ua/site/liquid/gembar.html>
40. Дезактін [Електронний ресурс] // Режим доступу :  
<https://dezmed.com.ua/uk/instrukcii/760-dezaktin-prilozheniya-k-metodicheskim-rekomendaciyam-instrukciya-po-primeneniyu-chast-1>
41. Санікон [Електронний ресурс] // Режим доступу :  
<https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanikon-interdez-kiev>
42. Чуешов В. И., Гладух Е.В Сайко И.В. и др./ Технология лекарств промышленного производства. Том 2/Винница: Новая книга,2014.- 664 с.
43. Отделение биомассы [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
<https://studfile.net/preview/6405386/page:19/#37>
44. Выделение ферментов [Електронний ресурс]. Режим доступу:  
[http://scask.ru/f\\_book\\_b\\_chem1.php?id=44](http://scask.ru/f_book_b_chem1.php?id=44)
45. Грачева И.М., Кривова А.Ю./ Технология ферментных препаратов. – 3-е изд. – М/ Изд-во «Элевар», 2000.
46. Выделение и очистка продуктов биотехнологии[Електронний ресурс]. Режим доступу:  
<http://elib.bsu.by/bitstream/123456789/105661/1/Курс%20л.%20Выд.%20пр.%20биотех.%20Новиков%20Д.pdf>
47. Д.А. Новиков/ Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие / Минск.: БГУ, 2014. – 256 с.
48. М.А. Климова, А.Т. Епринцев/Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств/Учебно-методическое пособие для вузов (Практикум)/2008-36 с.

49. Чечина О.Н./Общая биотехнология:учеб. Пособие для вузов 2-е изд, перераб и доп.-М./Издательство Юрайт/2019,-231 с.
50. Реактор-змішувач[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/brands/Attis-1>
51. Насос[Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://ua.grundfos.com/Grundfos-product-center.html>
52. Реактор-змішувач [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://online-shop.eppendorf.com/OC-en/Bioprocess-44559/Bioprocess-Systems-60767/New-Brunswick-CelliGen510-PF-12575.html>
53. Індивідуальний фільтр [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://alterair.ua/product/boneco-2562-active-carbone-filter/>
54. Пристрій забірний[Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://www.huahangfilter.net/products/air-filter/carbon-air-filter/activated-carbon-filter.html>
55. Фільтр попередній[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.al-ko.com/shop/ru/predvaritel-nyj-fil-tr-al-ko-100-1.html>
56. Компресор[Електронний ресурс]. Режим доступу:<http://www.l-c.com.ua/425/>
57. Теплообмінник-охолоджувач[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.hydac.com/ru-ru/glavnaja.html>
58. Ресивер-вологовідділювач[Електронний ресурс]. Режим доступу:<http://abccorp.ru/aso-receivers-rv430-16.html>
59. Теплообмінник-нагрівач [Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://eurounica.com/c-Defro-2-16-1>
60. Фільтр головний[Електронний ресурс]. Режим доступу:[https://partnersfarming.com/catalogue/teleskopichni\\_navantazhuvachi/manitou/rozhidni\\_materiali\\_navantazhuvacha/manitou-898.html](https://partnersfarming.com/catalogue/teleskopichni_navantazhuvachi/manitou/rozhidni_materiali_navantazhuvacha/manitou-898.html)
61. Ферментери[Електронний ресурс]. Режим доступу:<https://biotechno.ru/catalog/promyshlennye-fermentery/>

62. Насос шнековый [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://teplo.com/Товар-SEEPЕХ/SEEPЕХ-группа-N-серия-BN-насосы-базовые-шнековые-эксцентриковые-с-прифланцованным-напрямую-приводом-200638>
63. Винтовые насосы [Электронный ресурс] <https://tehnograpp.com/katalog/nasosy-po-tipu/vintovye-nasosy>
64. Промышленные центрифуга [Электронный ресурс] <https://alsi-ft.ru/equipment/element/horizontal-centrifuge-with-knife-discharge-gkf/>
65. Ультразвуковая установка [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.hielscher.com/ru/i4000\\_p.htm](https://www.hielscher.com/ru/i4000_p.htm)
66. Реактор эмалированный, реактор из нержавеющей стали [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://prom.ua/p6490813-reaktor-emalirovannyj-400.html>
67. Ультрафільтраційна установка [Электронный ресурс]. Режим доступа [https://prom-nasos.pro/catalog/inzhiniring/filtratsionnye\\_ustanovki/ultrafiltratsiya/ustanovka\\_ultrafiltratsii\\_na\\_keramicheskikh\\_membranakh/?gclid=CjwKCAjwnIr1BRAWEiwA6GpwNSpfN0FpulH9OAIk2vaw7pcIPWIXB7P5qUOj37ZOQdTkz5nDPpK6tRoCPqYQAvD\\_BwE](https://prom-nasos.pro/catalog/inzhiniring/filtratsionnye_ustanovki/ultrafiltratsiya/ustanovka_ultrafiltratsii_na_keramicheskikh_membranakh/?gclid=CjwKCAjwnIr1BRAWEiwA6GpwNSpfN0FpulH9OAIk2vaw7pcIPWIXB7P5qUOj37ZOQdTkz5nDPpK6tRoCPqYQAvD_BwE)
68. Лінійна лінія розливу [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://stanco.com.ua/linear-filling-line/>
69. \_ Бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*. Электронный ресурс: <https://bio-x.ru/articles/bakterii-bacillus-subtilis-i-bacillus-licheniformis>
70. *Bacillus subtilis* (сенная палочка). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/5648>
71. .Егоров Н.С. Биотехнология: проблемы и перспективы. – М.: Высшая школа, 1997. – 282 с.

72. ГОСТ Р54905-2012 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности  $\beta$ -глюканазы. [Электронный ресурс].  
Режим доступа: <https://www.internet-law.ru/gosts/gost/52146/>
73. Уклад.: *Л.М. Буценко, В.О. Красінько* Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Лабор. практикум для студ. за напрямком підгот. 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання – К.: НУХТ, 2011. –75 с.