

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

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

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

« ____ » _____ 2021 р.

« ____ » _____ 2021 р.

Кваліфікаційна робота

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр та назва спеціальності)

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

на тему: Культивування *Bacillus macerans* для одержання пектинази

Виконав: здобувач III курсу, групи 1ск

Літовченко Олександр Вікторович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Скроцька Оксана Ігорівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент _____

Хоменко Л.А.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет): біотехнології та екологічного контролю

Кафедра: біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь: бакалавр

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«28» жовтня 2020 року

ЗАВДАННЯ НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА Літовченка Олександра Вікторовича

1. Тема роботи: «Культивування *Bacillus macerans* для одержання пектинази»

керівник роботи: Скроцька О.І., к.б.н., доцент

затверджені наказом вищого навчального закладу від «27» жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем проекту (роботи): 31 січня 2021 року

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент – *Bacillus macerans*, цільовий продукт – пектиназа

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Розділ 1. Характеристика пектинази, як кінцевої продукції виробництва. Розділ 2. Характеристика біологічного агента – *Bacillus macerans*. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування. Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Розділ 5. Специфікація обладнання. Розділ 6. Опис технологічної схеми. Розділ 7. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу: Технологічна схема ділянки біосинтезу пектинази – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема ділянки біосинтезу пектинази – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання: «28» жовтня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Розділ 1. Характеристика пектинази, як кінцевої продукції виробництва	28.10.20-10.11.20	
2.	Розділ 2. Характеристика біологічного агента – <i>Bacillus macerans</i>	11.11.20-18.11.20	
3.	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування	19.11.20-28.11.20	
4.	Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	29.11.20-05.12.20	
5.	Розділ 5. Специфікація обладнання	06.12.20-10.12.20	
6.	Розділ 6. Опис технологічної схеми	11.12.20-21.12.20	
7.	Розділ 7. Контроль виробництва	22.12.20-27.12.20	
8.	Виконання графічної частини проекту	28.12.20-16.01.21	
9.	Оформлення пояснювальної записки	17.01.21-25.01.21	

Здобувач _____

(підпис)

Літовченко О.В.

Керівник роботи _____

(підпис)

Скороцька О.І.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕКТИНАЗИ, ЯК КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	9
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА – <i>BACILLUS MACERANS</i>	13
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Bacillus macerans</i>	16
2.3. Таксономічний статус <i>Bacillus macerans</i>	18
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт ..	18
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	22
3.1. Потреба у цільовому продукті (пектиназі)	25
3.2. Розрахунок потужності виробництва пектолітичного комплексу ферментних препаратів	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	29
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу ..	30
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ...	32
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	32
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	32
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря	34
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	36
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	42
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	45

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПЕКТИНАЗ <i>BACILLUS MACERANS</i> BS-04	49
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	64
7.1. Карта постадійного контролю	65
7.2. Мікробіологічний контроль	68
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	69
7.3.1. Концентрація біомаси <i>Bacillus macerans</i>	69
7.3.2. Визначення активності ферменту пектинази	70
7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	74
ЛІТЕРАТУРА	80
ДОДАТОК	
ГРАФІЧНА ЧАСТИНА	
Технологічна схема виробництва	
Апаратурна схема виробництва	

РЕФЕРАТ

Пектолітичні ферменти мають велике промислове значення в різних галузях біотехнології: при отриманні пектинів; для інтенсифікації виробництва соків з плодово-ягідної сировини і освітлення вин; для отримання харчових барвників і танінів; при обробці текстильних волокон.

Новизною даної роботи є отримання пектинази за допомогою нового штаму *Bacillus macerans* BS-04, що окрім пектиназ продукує ще протеази, ксиланази і амілази. Даний штам дозволяє отримати широкий комплекс ферментів і характеризується коротким циклом зростання з підвищеним накопиченням біомаси.

В роботі здійснено техніко-економічне обґрунтування випуску пектинази для її використання у виноробстві. Зроблено аналіз українських виробників вин. Наведено інформацію щодо виробників ферментних препаратів, основою яких є пектиназа. Обґрунтовано вибір продуцента пектинази – бактерій *Bacillus macerans* BS-04, а також умов їх культивування. Обрано глибинне культивування за наступних умов: температура – 37 °С, інтенсивність аерації 1 л/л×хв, інтенсивність перемішування – 180 об/хв, рН 7,4-7,6. Розраховано, що для виробничого культивування продуцента у ферментері з геометричним об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 процес одержання посівного матеріалу буде проходити у 6 етапів.

Наведені методики контролю процесу культивування – методики для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та джерела вуглецю (полігалактуранової кислоти), джерела азоту (органічного та неорганічного) та активності ферменту (полігалактураназну активність).

Кваліфікаційна робота викладена на 84 сторінках друкованого тексту, містить 13 таблиць, 4 рисунки і складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (42 джерела) та графічної частини (2 креслення формату А1).

Ключові слова: *Bacillus macerans*, пектиназа, ферментація, біосинтез.

ВСТУП

В даний час велика увага приділяється пектиновим речовинам, деполімеризація яких здійснюється ферментами, що входять в пектолітичний комплекс: пектингідролазами і пектинліазами.

Пектолітичні ферменти мають велике промислове значення в різних галузях біотехнології: при отриманні пектинів; для інтенсифікації виробництва соків з плодово-ягідної сировини і освітлення вин; для отримання харчових барвників і танінів; при обробці текстильних волокон; Потреба в цих ферментах стабільно зростає.

Ефективність розщеплення пектинвмісних речовин залежить не тільки від застосування біопрепаратів-джерел активних пектолітичних ферментів, але і від співвідношення пектиназ різної специфічності і механізму дії в складі пектолітичного комплексу, що обумовлено фізіологічними і культуральними особливостями штаму-продуцента. Одним з основних джерел отримання пектолітичних ферментів є мікроміцети, які володіють характерною особливістю синтезувати широкий спектр активних позаклітинних пектиназ.

Роботи багатьох дослідників присвячені створенню активних штамів-продуцентів пектиназ і технологій виробництва та застосування ферментних препаратів пектолітичної дії.

Раніше широкое застосування в різних галузях промисловості таких як виноробство, фармація, мав ферментний препарат Пектофоетидин. У біотехнології отримання Пектофоетидину використовують гриб *Aspergillus foetidus*, культивований твердофазним методом.

Однак, на сучасному етапі перспективним напрямком науки є створення з використанням генетичних і селекційних методів нового високоефективного штаму-продуцента пектолітичних ферментів для глибинного культивування, з метою розробки наукових основ ферментних технологій для переробних галузей АПК.

Застосування вітчизняних біокаталізаторів дозволить не тільки інтенсифікувати існуючі біотехнологічні процеси в харчовій промисловості і створити конкурентоспроможну продукцію нового покоління з заданими властивостями, але і зробити імпортозаміщення, так як висока ціна біопрепаратів обмежує їх широке застосування.

Новизною даної кваліфікаційної роботи є отримання пектинази за допомогою бактерій *Bacillus macerans* BS-04. Вказаний штам, окрім пектиназ, продукує ще такі ферменти, як протеази, ксиланази і амілази. Використання даного штаму дозволяє отримати широкий комплекс пектолітичних ферментів. Також клітини *Bacillus macerans* BS-04 характеризуються відносно невеликою тривалістю культивування (18-24 год) з підвищеним накопиченням біомаси [1].

РОЗДІЛ 1.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕКТИНАЗИ, ЯК КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Пектиназа – тип ферментів, що розчиняють пектин, полісахаридний компонент клітинної стінки рослин. Однією з найкраще досліджених та популярних в комерційному виробництві пектиназ є полігалактоуроназа. З 1960-тих років пектинази широко використовуються в процесах, що вимагають розрушення рослинного матеріалу, наприклад при отриманні та освітленні фруктових соків та виробництві вина. Зазвичай пектинази, що використовуються в промисловості, є натуральними ферментами, отриманими з таких організмів як грибок *Aspergillus niger* (цей грибок паразитує на рослинах і використовує фермент для проникнення гіф всередину рослини). При кип'ятінні пектиназа денатурує і втрачає активність.

Пектиназа (полігалактуронази, пектолаза, полігалактуронідаза) – ферментний препарат здійснює гідролітичні розщеплення б-1,4-глікозидних зв'язків в пектинових речовинах. Пектиназа, являє собою порошок білого кольору. Робочий температурний діапазон: 20-60°C. Оптимум дії: 35-45°C. Робочий рН 3,0-6,0. Оптимум рН 4,0-4,5. Пектиназа є багатокомпонентною системою і проявляє велику специфічність до субстрату.

Ферменти, що діють на пектинові речовини, поділяють на дві групи: деетерифікуючі та деполімеризуючі. Деполімеризуючі ферменти відносять до наступних класів: гідролази та транселіменази (ліази). Саме їх використовують для проведення регулюючого ферментативного гідролізу пектинових речовин рослинних полісахаридів.

					НУХТ БТЕК 03.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Літовченко О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕКТИНАЗИ, ЯК КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив		Скороцька О.І.						
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П						
						Кафедра БТМ 9		

Активність деполімеризуючих ферментів вимірюють за зниженням в'язкості, що дозволяє враховувати активність ендоферментів. Гідроліз ендо-ПГ проходить неупорядкованим шляхом, здебільшого розщеплюються внутрішні зв'язки полімеру:



Олігогалактуронові кислоти + моногалактуронова кислота

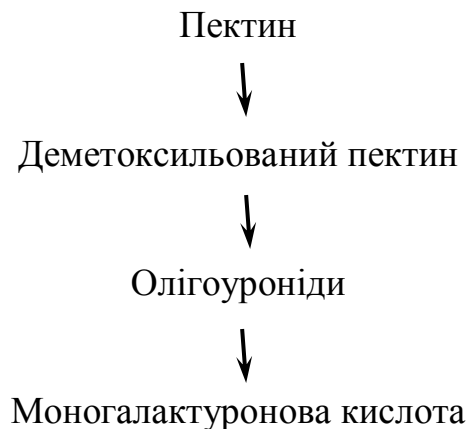
При гідролізі 1-10 % зв'язків, в'язкість розчинів галактуронанів знижується не менше, ніж на 50 %. Основним кінцевим продуктом гідролізу пектинів, в залежності від джерела ферменту, можуть бути моно-, ди-, три- або тетрагалактуронова кислота. Більшість ендо-ПГ – ферменти молекулярної маси 3-80 кДа, оптимум дії при рН від 3,5 до 6,5, температура 50 °С. Екзо-ПГ каталізує розщеплення кінцевих α -1,4-глікозидних зв'язків між залишками неетерифікованої галактуронової кислоти в різних пектинових полісахаридах (полігалактуронова кислота, пектати, пектини) з утворенням моногалактуронової кислоти [2].

Гідроліз супроводжується незначним зниженням в'язкості розчинів субстратів. Фермент розщеплює пектати не повністю, приблизно на 50%. Екзо-ПГ мають оптимум дії при рН від 3,4 до 6,0 і температурі 30-50°С. Частково деградовані субстрати, як правило, гідролізуються екзо-ПГ швидше високополімерних.

Пектинметилестерази (ПМЕ) каталізують відщеплення металних груп від поліметилгалактуронової кислоти з утворенням метанолу і частково деметоксильованої галактуронової кислоти. ПМЕ деетерифікує пектин на 60-70 %. По мірі зниження ступеня етерифікації субстратів знижується спорідненість ферменту до них, і процес гідролізу проходить не до кінця. ПМЕ в основному діє на крупні молекули, метоксильовані олігоуроніди розщеплюються повільніше. ПМЕ проявляють максимальну активність в інтервалі рН 4,4-8, оптимальна температура 30-40 °С [3].

При сумісній дії ПГ і ПМЕ на високометоксильований пектин, перша стадія гідролізу проходить під дією ПМЕ. Після часткового деметоксилювання субстрату починається гідроліз полігалактуронової кислоти. Зниження молекулярної маси пектину призводить до зниження реакції деметоксилювання.

Основні перетворення пектину при гідролізі комплексом ендо-ПГ, екзо-ПГ и ПМЕ можуть бути представлені наступним чином:



Для деградації пектинових речовин поряд з пектингідролазами використовують ферменти, що відносяться до класу ліаз – пектинтранселіменази (ПТЕ). Ці ферменти викликають розривання глікозидного 1-4 зв'язку шляхом транселімінації. Розрив між напівацетальним киснем та 4-им вуглеводом супроводжується видаленням кисню, що знаходиться в транспозиції на 5-ому вуглеводі, в результаті чого виникає подвійний зв'язок між цими двома вуглеводами (рис. 1.1).

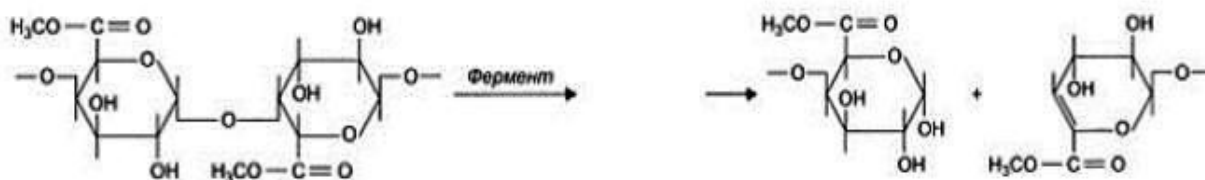


Рис. 1.1. Механізм дії пектинтранселіменази на молекулу пектинових речовин

Отже, для досягнення поставленої мети, слід проводити регулюючий ферментативний гідроліз комплексом ферментів, який складається з ферменту ендоектолітичної дії (ендо-ПГ) та транселіменазою (ендо-ПТЕ). Відомо, що такі олігосахариди складаються із залишків галактуранової кислоти і мають у кінці молекули між С4-С5 атомами вуглецю подвійний зв'язок, володіють антиадгезивними властивостями. Саме така властивість дозволяє олігосахаридам блокувати зв'язок ліганд-рецепторів з патогенними речовинами (під патогенними у цьому випадку розуміють бактерії, віруси, гриби, катіони важких металів) та проявляти себе як пребіотики [4].

Фермент використовуються для екстракції компонентів мезги в виноробстві і для освітлення сусла. Впливаючи на мезгу червоного винограду, даний фермент сприяє кращій екстракції фарбувальних речовин з шкірки, покращуючи тим самим його структуру без необхідності тривалої мацерації на шкірці. Такий підхід може бути використаний у разі, коли виноград не досяг оптимальної поліфенольної зрілості і коли тривалий контакт з насінням і шкіркою може надати вину небажані зелені відтінки, грубість і гіркоту в смаку. У разі ж повного визрівання шкірки і насіння, необхідності в ензимах для екстракції немає. Хіба тільки коли є обмеження по тривалості мацерації, що мається на увазі нестачі бродильних ємностей.

Пектиназа полегшує пресування плодово-ягідної мезги, підвищує вихід соку, знижує кількість гущевих опадів, покращує освітлення і фільтрацію соку. Значно скорочується період бродіння сусла.

Ряд фруктів (особливо ягоди, сливи, айва та ін.) містять значну кількість пектину. Це призводить до осаду і помутніння в концентрованих соках. При використанні пектинази соковиділення збільшується на 5-25% в залежності від виду вихідної сировини, а фільтрація проходить в 2-3 рази швидше. При освітленні соків додавання пектинази призводить до розщеплення осаду і освітлення відбувається в 3-5 разів швидше.

РОЗДІЛ 2.
ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА –
BACILLUS MACERANS

2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування

В якості можливих продуцентів пектинази розглядаються багато мікроорганізмів: мікроскопічні гриби, дріжджі, бактерії. Пектинази, отримані за допомогою грибних штамів продуцентів, активні в кислих значеннях рН, в той час як лужні ферменти виробляються бактеріальними штамми. Найбільш поширеною технологією є отримання пектиназу з *Aspergillus niger* з використанням методів глибинного та поверхневого культивування.

Відзначається, що застосування методів твердофазної ферментації для культивування грибних штамів-продуцентів, дозволяє отримати високий вихід концентрованих пектиназ з меншими витратами, ніж при глибинній ферментації. Умови культивування з використання поверхневого методу культивування найбільш оптимальні для росту *Aspergillus sp.*

Для отримання бактеріальних пектиназ застосовують обидва методи культивування. Незважаючи на те, що для зростання бактерій оптимальним є застосування глибинного культивування, повідомляється про збільшення виходу пектиназ при застосуванні твердофазної ферментації. При поверхневому культивуванні *Bacillus sp. DT7* на пшеничних висівках відзначається більш високий вихід лужної термостабільної пектиназу.

					НУХТ БТЕК 03.01.05 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА – <i>BACILLUS MACERANS</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Літовченко О.</i>						
<i>Перевірив</i>		<i>Скороцька О.І.</i>						
<i>Рецензент</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П</i>				Кафедра БТМ 13		

Методи поверхневого культивування дозволяють використовувати як субстрат відходи агропромислового комплексу. Оскільки агровідходи відновлюваних, то вони представляють потенційне дешеву сировину для біотехнологічного отримання пектиназ.

Більшість публікацій за останні 10-15 років розглядає виробництво пектиназ на агросубстратах, використовуючи поверхнєве культивування, як перспективний напрямок. Дослідницькі центри, які розглядають дану тему, зосереджені в Індії, Туреччині, Бразилії, Єгипті. Також зустрічаються публікації російських дослідників.

Для продукції пектиназ заявлені наступні агросубстрати: пшеничні висівки, ягідні і плодови вичавки, кавовий шрот, цитрусові відходи, очеретяна бегаса, буряковий жом і ін. Проте для успішного застосування агровідходів для виробництва пектиназ, необхідно використовувати субстрати, що містять велику кількість пектину – головного індуктора синтезу ферменту.

Найбільш перспективним є буряковий жом (містить до 30% пектинових речовин). Відомі технології отримання пектиназ із застосуванням твердофазного культивування (*Aspergillus niger*), і глибинного культивування (*Bacillus gibsoni*).

Високий рівень пектинових речовин містять плодово-ягідні жоми, відходи виробництва соків і спиртних напоїв. Для отримання пектиназ успішно використовується яблучний (*Aspergillus niger*) і виноградний жом (*Aspergillus awamori*).

Застосування очеретяної бегаси – виправдовує себе тільки в якості високо волокнистого, пухкого субстрату, що дозволяє підтримувати оптимальні умови культивування. Для синтезу пектинази необхідно додавати індуктор – сахарозу, крохмаль або джерела пектину. Розглядаються технології з використанням штамів-продуцентів *Aspergillus niger*, *Moniliella* sp., *Thermoascus aurantiacus*, *Penicillium* sp. та ін.

Найбільш широко для отримання пектиназ з використанням методу твердофазної ферментації застосовуються пшеничні висівки. Запропоновано

різні технології, які дозволяють використовувати висівки в якості єдиного вуглеводного джерела, так і в якості твердого субстрату з додаванням індукторів: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Streptomyces* sp., *Streptomyces lydicus*, *Penicillium viridicatum*, *Thermoascus auriantacus*, *Fusarium moniliforme*, *Bacillus* sp.

Методи очищення і виділення ферменту залежать від прикладного застосування отриманого пектолітичного препарату. Для технічних цілей можливо використовувати «сирий» фермент, тоді як застосування ферменту в харчовій промисловості вимагає обов'язкової стадії очищення. Для отримання препаратів пектиназ використовують осадження сольовими розчинами і очищення хроматографічних методами. Застосування стадій очищення позначається на кінцевій вартості ферменту. При використанні очеретяної бегаси і індукторів виходить більш чистий препарат пектиназу, ніж при використанні пшеничних висівок. Тому для вибору оптимального субстрату для отримання пектиназ, необхідно виходити від мети застосування ферментного препарату [5].

Штам *Bacillus macerans* BS-04 – здатний синтезувати широкий комплекс ферментів, що володіє підвищеним синтезом пектіназ, а саме, пектат- і пектинліаз, ендо- та екзо- полігалактуранази, пектінестераза; і додатковим синтезом протеази, ксиланази, амілази, і характеризується коротким циклом зростання з підвищеним накопиченням біомаси [6].

Штам *Bacillus macerans* BS-04 виділено в результаті багаторазового пересівання вихідного штаму *Bacillus macerans* ЦМПМ В-2692 і виділення моноспорових варіантів [1]. Для отримання пектинази *Bacillus macerans* BS-04 вирощують на поживному середовищі наступного складу, г/л:

Буряковий жом мелений	20,0
Кальцій хлористий	0,9
Натрій вуглекислий (сода)	2,0
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	2,6
Натрій фосфорнокислий однозаміщений	2,2
Кукурудзяний екстракт	7,4
Вода питна	до 1,0 л

2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Bacillus macerans*

Клітини прямі, паличкоподібні, 2,0-5,0×0,9-1,0 мкм, рухливі, грампозитивні, зустрічаються в довгих і коротких ланцюжках. Спори еліпсоїдні, без екзоспориума, 2,0-2,4×1,0-1,2 мкм, розташовані центрально або субтермінально [1].

На картопляному агарі:

- ✓ на першу добу росту колонії світло-бежеві, круглі, середина шорстка, матова, краї нерівні, блискучі, розмір колоній від 1 до 4 мм в діаметрі, пігмент у середовище не дифундує;
- ✓ на другу добу колонії світло-бежеві, круглі, середина шорстка, матова, краї нерівні, блискучі, розмір колоній від 1 до 6 мм в діаметрі;
- ✓ на шосту добу колонії від світло-бежевого до бежевого кольору, блискучі, однорідні, круглі, краї нерівні, розмір колоній від 1 до 6 мм в діаметрі.

На сушло-агарі:

- ✓ на першу добу колонії світло-бежеві з більш світлої і щільною серединою, матові, шорсткі, краї рівні, розмір від 0,5 мм до 5 мм;
- ✓ на другу добу колонії світло-бежеві з більш щільною опуклою, блискучою, непрозорою серединою, краю колонії матові, шорсткі, непрозорі, нерівні, розмір колоній від 1 мм до 10 мм;
- ✓ на третю добу колонії світло-бежеві з більш світлої і щільною, трохи опуклою серединою. Всі колонії блискучі, напівпрозорі, краї нерівні. Розмір колоній від 1 мм до 11 мм.

На середовищі Чапека з глюкозою:

- ✓ на першу добу колонії однорідні, опуклі молочно-білого кольору, блискучі, прозорі, краї рівні, розмір колоній від 0,5 мм до 1,5 мм;
- ✓ на другу добу колонії неоднорідні світло-бежевого кольору, середина блискуча у вигляді гудзиків, краї нерівні, матові, шорсткі, розмір колоній від 1 мм до 4 мм;
- ✓ на третю добу колонії неоднорідні світло-бежевого кольору, середина блискуча у вигляді гудзики, краї нерівні, матові, шорсткі, розмір колоній від 1 мм до 7 мм;
- ✓ на шосту добу колонії неоднорідні, краї нерівні, матові, шорсткі; середина блискуча у вигляді гудзики, непрозора, розмір колоній 0,2-1,2 мм, колір світло-бежевий.

На середовищі Чапека з крохмалем:

- ✓ на першу добу розмір колоній 0,01-0,5 мм, колонії блискучі, непрозорі, однорідні, опуклі, колір білий, краї нерівні;
- ✓ на третю добу розмір колоній 0,5-2,0 мм, колонії блискучі, непрозорі, однорідні, опуклі, колір молочно-білий, краї нерівні;
- ✓ на четверту добу колонії 0,5-2,5 мм, блискучі, опуклі, непрозорі, колір молочно-білий, центр щільніший (точкове ущільнення), краї нерівні глибоко порізані;
- ✓ на шосту добу колонії від 0,5 до 5 мм, непрозорі, блискучі, неоднорідні з точковим ущільненням в центрі, краю матові, нерівні.

Bacillus macerans по відношенню до вуглеводів: засвоює глюкозу, сахарозу, ксилозу, арабінозу, мальтозу і маніт з утворенням кислоти і газу, гідролізує крохмаль.

Утворює каталазу, ацетон, кристалічні декстрини. Нітрати редукує в нітрити. Фенілаланін не дезамінується, тирозин не розщеплюється. Аміак і сірководень не утворює. Гіпурат не гідролізують. Желатин розріджує на 1 см у верхній частині. Молоко пептонізує з утворенням згустку і газу. Клітини

ростуть на середовищі з 0,001% лізоцимом. Не спостерігається ріст на середовищі з 5% хлористим натрієм.

Добре росте на скибочках моркви, картоплі, ріпи, капусти білокачанної, кабачка, гарбуза, яблука (некислих сортів) і груші з повною мацерацією субстрату.

На середовищі з 1% азотнокислим натрієм в анаеробних умовах відзначається затримка спороутворення.

По відношенню до кисню бактерії *Bacillus macerans* є аеробами. Їх мінімальна температура росту + 10 °С, максимальна – + 45 °С, оптимальна температура для росту 37-42 °С, оптимальне значення рН 7,4-7,8. Час культивування в аеробних умовах 10-18 год, в умовно-анаеробних – 18-30 год [1].

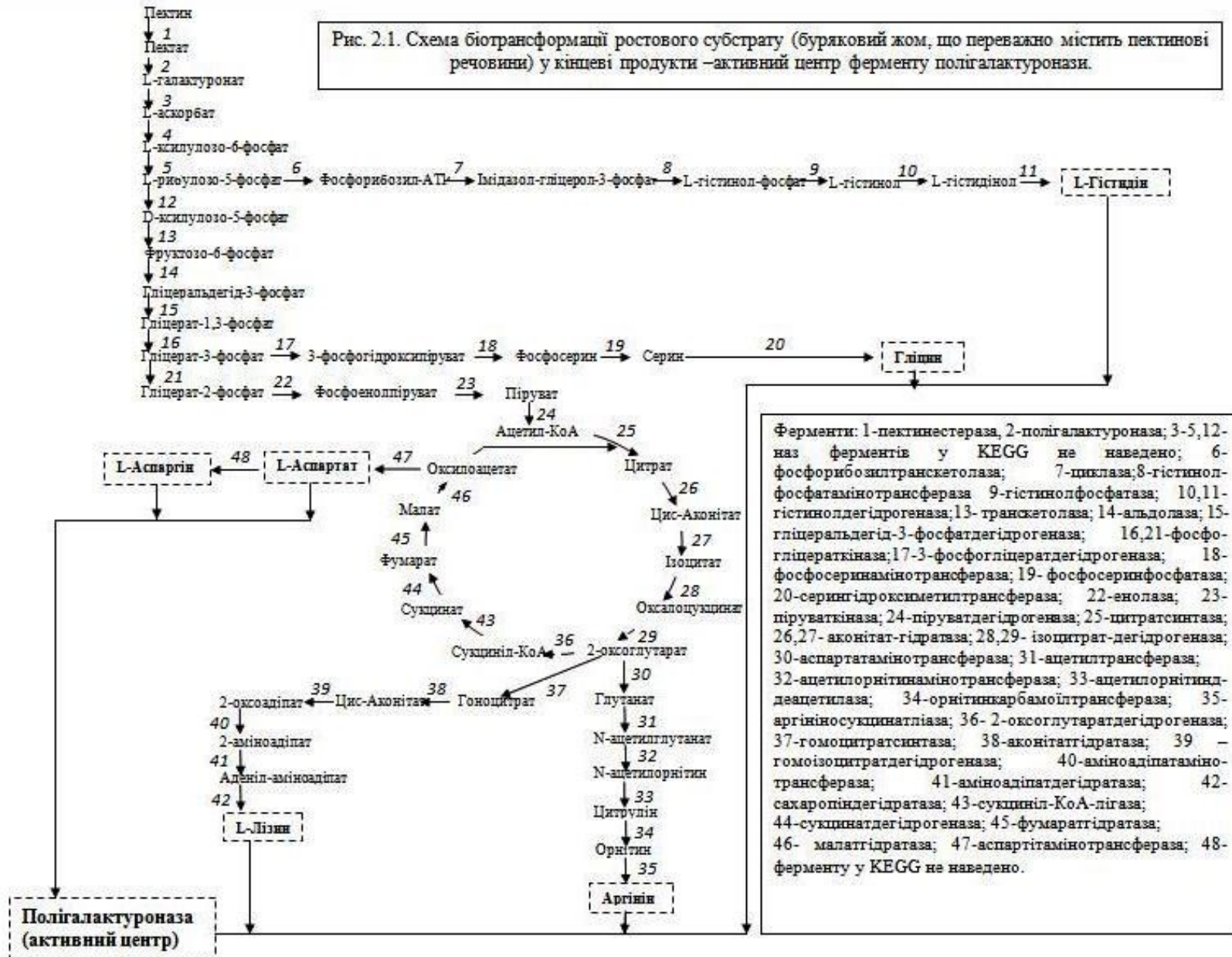
2.3. Таксономічний статус *Bacillus macerans*

Царство:	<i>Bacteria</i>
Відділ:	<i>Firmicutes</i>
Клас:	<i>Bacilli</i>
Підклас:	<i>Bacillales</i>
Родина:	<i>Bacillaceae</i>
Рід:	<i>Bacillus</i>
Вид:	<i>Bacillus macerans</i>

2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Джерелом вуглецю у складі бурякового жому є пектинові речовини. Це полісахариди (гетерополісахариди), які складаються із залишків галактуранової кислоти. Отже ростовим субстратом є галактуранова кислота. Біотрансформацію пектину у пектиназу наведено на рис. 2.1.

Рис. 2.1. Схема біотрансформації ростового субстрату (буяковий жом, що переважно містить пектинові речовини) у кінцеві продукти – активний центр ферменту полігалактуранози.



Під час росту *Bacillus macerans* на поживному середовищі бурякові ворlockна є джерелом вуглецю. У його складі переважають пектинові речовини (понад 50%). Пектат проходить біотрансформацію через метаболізм аскорбату, пентозофосфатний шлях і гліколіз до пірувату.

Спочатку відбувається розщеплення пектату, або полігалактуронової кислоти, що за допомогою полігалактуранази (КФ 3.2.1.15) перетворюється на D-галактуронат, що у свою чергу залучається до метаболізму аскорбату. D-галактуронат перетворюється на ксилулозо-5-фосфат (через L-аскорбат, L-ксилулозо-5-фосфат, L-рибулозо-5-фосфат відповідно).

Рибулозо-5-фосфат за допомогою фосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.17) перетворюється на фосфорибозил-АТФ, що за допомогою циклази (КФ HisF) перетворюється на імідазол-гліцерол-3-фосфат. Гістинол фосфатамінострасфераза (КФ 2.6.1.9) каталізує перетворення останнього до L-гістинолу і через L-гістидинал (гістидинолдегідрогеназа) (КФ 1.1.1.23) на гістидин.

Попередником гліцину виступає гліцерат-3-фосфат. За допомогою 3-фосфогліцератдегідрогенази (КФ 1.1.1.95) перетворюється на 3-фосфогідроксипіруват. Останній перетворюється на фосфосерин (фосфосеринамінострасфераза, КФ 2.6.1.52), потім на серин (фосфосерин фосфатаза, КФ 3.1.3.3). Серин перетворюється на гліцин за допомогою серингідроксиметилтрансферази (КФ 2.1.2.1).

Піруват за допомогою ацетилтрансферазного комплексу перетворюється на ацетил-КоА. Останній залучається до ЦТК. Попередником аспарагіну є інтермедіат ЦТК-оксалоацетат. За допомогою аспартатамінострасферази (КФ 2.6.1.1) трансформується у аспарат, останній є попередником аспарагіну.

2-оксоглутарат є попередником лізину. Його біосинтез відбувається наступним чином: 2-оксоглутарат трансформується на гомоцитрат (гомоцитратсинтаза, КФ 2.3.3.14). Гомоцитрат перетворюється на цис-аконітат за допомогою аконітатгідратази (КФ 4.2.1.). Він перетворюється на 2-оксоадіпат (гомоізоцитрат дегідрогеназа, КФ 1.1.1.87). 2-оксоадіпат

трансформується α -аміноадіпатамінотрансферазою (КФ 2.6.1.57) на 2-аміноадіпат. Останній перетворюється на аденіл-аміноадіпат, далі L-лізин.

Попередником аргініну є 2-оксоглутрат. Біосинтез аргініну починається перетворення 2-оксоглутарату на глутамат (аспартатамінотрансфераза, КФ 2.6.1.1). Глутамат перетворюється на N-ацетилглутамат за допомогою ацетилтрансферази. Останній трансформується у N-ацетилорнітин (ацетилорнітинамінотрансфераза, КФ 1.2.1.38.27.28), а далі на орнітин (ацетилорнітиндеацетилаза, КФ 3.5.1.6). Він перетворюється на цитрулін (орнітинкарбамоїлтрансфераза, КФ 2.1.3.3), який трансформується у аргінін за допомогою аргініносукцинатліази (КФ 4.3.2.1).

Заключним етапом синтезу полігалактуранази є сполучення наведених вище амінокислотних залишків пептидними зв'язками у молекулу пектинази [7].

РОЗДІЛ 3.

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

Застосування ферментних препаратів у виробництві плодово-ягідних соків, вин і безалкогольних напоїв здійснюється з метою підвищення виходу соку, освітлення і стабілізації соків, безалкогольних напоїв і вин, запобігання окиснювальним процесам в соках і в продуктах, що виготовляються з них, а також для інверсії сахарози у виробництві безалкогольних напоїв і сиропів. В одних випадках необхідно мати набір ферментних препаратів, що містять певний комплекс ферментів, в інших – необхідними є препарати індивідуальних ферментів. Крім того, ферментні препарати повинні задовольняти вимогам, що пред'являються технологією отримання конкретного продукту, не лише за типом каталізованої реакції, але і відносно умов їх перебігу.

Відповідно до специфіки плодово-ягідної сировини і цілей застосування ферментні препарати можна розділити на шість груп:

- 1) препарати, призначені для отримання неосвітлених соків, які збільшують вихід і що підвищують екстрактивність;
- 2) препарати, призначені для отримання освітлених соків, які збільшують вихід, підвищують екстрактивність, і забезпечують повний гідроліз пектинових і білкових речовин;
- 3) препарати, що мацерують плодово-ягідну тканину, вихід, що підвищують, і гомогенність соків з м'якушем;
- 4) препарати, призначені для отримання освітлених плодово-ягідних виноматеріалів, які збільшують вихід і підвищують екстрактивність виноматеріалів;

					<i>НУХТ БТЕК 03.01.05 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Літовченко О.</i>						
<i>Перевірив</i>		<i>Скороцька О.І.</i>						
<i>Рецензент</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П</i>					<i>Кафедра БТМ</i> 22	

5) препарати, що сприяють запобіганню окиснювальним процесам і розвитку аеробних мікроорганізмів в соках, винах, безалкогольних напоях;

б) препарати, що каталізують інверсію цукрових сиропів у виробництві безалкогольних напоїв і товарних сиропів.

Основний біохімічний процес, що відбувається в плодово-ягідній меззі і соку за їх обробки пектолітичними препаратами або за спільного застосування термічної і ферментативної обробки – гідроліз пектинових речовин. Але разом з цим відбуваються перетворення білків, целюлози, геміцелюлози і інших компонентів сировини.

Тому ферментні препарати, що використовуються для отримання повністю освітленого соку з більшості плодів і ягід, повинні містити не лише пектолітичні ферменти, але і ферменти, що гідролізують інші колоїдні сполуки, які зумовлюють опалесценцію соків і нестабільність вин, що виготовляються з них, і безалкогольних напоїв.

З метою максимального витягання соку і полегшення його освітлення під час гідролізу пектинових речовин ягід і плодів необхідно враховувати властивості пектолітичних ферментів самої сировини і препаратів, що вносяться. Залежно від технологічних вимог і хімічного складу сировини слід застосовувати препарати з певним комплексом ферментів і брати до уваги як спектр ферментів (пектинестераза, ендо-, екзополігалактуроназа та ін. супутні ферменти), так і їх співвідношення. Крім того, необхідно шляхом підбору режиму обробки сировини створити оптимальні умови для дії ферментів [8].

У виноробстві застосування пектолітичних ферментів для збільшення виходу й освітлення сусла й вина було запропоновано в 1936 р. Застосування ферментних препаратів збільшує вихід сусла в середньому на 10%, а вихід вина – на 1%. Ферментні препарати застосовуються на різних стадіях виготовлення вина. По-перше, їх доцільно використовувати для фільтрації й освітлення сусла. Свіже виноградне сусло дуже погано фільтрується через високий вміст високомолекулярних речовин. Ферментні препарати частково

гідролізують білки, полісахариди, що призводить до зниження в'язкості суслу, збільшенню швидкості фільтрації, освітлення. Таким чином, обробка виноградної мезги ферментами сприяє підвищенню біологічної цінності соків і вина. У значній мірі підвищується екстракція фенольних і барвних речовин, підвищується вміст флавоноїдів. Вина швидше дозрівають і тому їх потрібно раніше розливати [9].

Ферменти довели свої переваги і цінність, і саме тому виноробні підприємства в усьому світі використовують їх для скорочення тривалості виробничого процесу, зменшення механічної роботи і виготовлення вина з найкращим букетом і смаковим профілем.

Зважаючи на розвинутість в Україні такої галузі переробної промисловості як виноробство (табл. 3.1) [10], варто розглянути потреби у пектолітичному комплексі ферментних препаратів саме для цієї галузі.

Таблиця 3.1

Українські виробники вин

Виробник	Виноградники	Обсяг виробництва, тис. пляшок на рік	Середня вартість вина, грн. за пляшку
Виноробне господарство князя М.П. Трубецького, с. Веселе, Херсонська область	200 га: аліготе, рислінг, каберне, мерло, совіньйон блан, шардоне, піно нуар, піно блан, пті вердо	550	150-200
«Курінь», с. Степанівка, Херсонська область	40 га: шардоне, рислінг, ркацителі, іршаї олівер, мускат одеський, каберне, мерло, сапераві, трамінір рожевий	50-60	100-200
«Шато Чизай», с. Берегове, Закарпатська область	272 га: мускат оттонель, черсегі фюсереш, рислінг італійський, піно нуар, мерло, каберне совіньйон	2000	100-200
«V. Petrov», с. Струмок, Одеська область	76 га: каберне, мерло, шардоне, аліготе, мускат одеський	15	200

«Бейкуш», с. Чорноморка, Миколаївська область	11 га: шардоне, піно нуар, сапераві, ркацителі, мерло, каберне	30	180
«Колоніст», с. Криничне, Одеська область	30 га: одеський чорний, мерло, каберне, суholоманський білий, шардоне	200	150-200
Вина Гулієвих, м. Одеса	2 500 га: мерло, каберне совіньйон, шардоне, рислінг, трамінер, сапераві	2000	90-100
«Don Alejandro Winery», с. Холодна Балка, Одеська область	14 га: мерло, каберне совіньйон, рислінг, мускат	д.в.	200-500
«Сотнаг», с. Мужієво, Закарпатська область	180 га: каберне совіньйон, мерло, трамінер рожевий, мускат оттонель.	д.в.	70-100
«Маркіз де Лакарен», с. Шабо, Одеська область	100 га: каберне, одеський чорний, шардоне, совіньйон, ркацителі, суholиманський білий	д.в.	150-180

Примітка: д.в. – дані щодо обсягів виробництва вина відсутні

3.1. Потреба у цільовому продукті (пектиназі)

Для інтенсифікації технологічних процесів у виноробстві використовується ряд комплексних препаратів, що чинять різноманітну дію на високомолекулярні речовини винограду і вина. При отриманні ординарних вин всіх типів широке застосування отримали пектолітичні ферментні препарати (стандартизуються за загальною пектолітичною активністю; в якості основних ферментів містять полігалактураназу і пектинестеразу, а в якості супутніх – протеїнази, целюлази і геміцелюлози). Оптимальні умови дії препаратів: рН 3,5-4,0, температура 35-40°C.

При отриманні кріплених, а також, червоних столових виноматеріалів ферментні препарати вносять в мезгу, при цьому підвищується загальний вихід суслу на 1-5%, а суслу-самопливу на 10-20%, полегшується пресування, збільшується вміст екстрактивних речовин і інтенсивність забарвлення, прискорюються біохімічні процеси, що протікають при дозріванні вин. При

приготуванні білих столових вин ферментні препарати вносять в сусло. Процес освітлення сусла прискорюється в 2-3 рази, кількість згущеного осаду знижується на 4-5%. Пектолітичні ферментні препарати можуть бути використані для оброблення важкоосвітлюваних виноматеріалів. При цьому значно скорочується витрата оклеюючих речовин, підвищується стабільність вин до помутнінь колоїдного характеру [11].

У виноробстві застосування пектолітичних ферментів для збільшення виходу й освітлення сусла й вина було запропоновано в 1936 р. Застосування ферментних препаратів збільшує вихід сусла в середньому на 10%, а вихід вина – на 1%. Ферментні препарати застосовуються на різних стадіях виготовлення вина. По-перше, їх доцільно використовувати для фільтрації й освітлення сусла. Свіже виноградне сусло дуже погано фільтрується через високий вміст високомолекулярних речовин. Ферментні препарати частково гідролізують білки, полісахариди, що призводить до зниження в'язкості сусла, збільшенню швидкості фільтрації, освітлення. Таким чином, обробка виноградної мезги ферментами сприяє підвищенню біологічної цінності соків і вина. У значній мірі підвищується екстракція фенольних і барвних речовин, підвищується вміст флавоноїдів. Вина швидше дозрівають і тому їх потрібно раніше розливати [12].

Отже, пектолітичні ферментні препарати можуть бути використані на різних етапах обробки сировини і виноматеріалів у процесі виготовлення вина. Проте найбільші потреби у ферментолізі виникають на перших етапах мацерації сировини, тому варто орієнтувати розрахунок потреби саме на цьому етапі. Для розрахунку теоретичної потреби у пектолітичних ферментних препаратах будемо орієнтуватися на рекомендоване дозування цих препаратів для стадії мацерації технологічного процесу виготовлення вина.

Нижче наведено дані щодо пектолітичних ферментних препаратів на ринку України (табл. 3.2).

Пектолітичні ферментні препарати на ринку України

Назва препарату	Виробник	Форма випуску	Активність	Джерело
Пектолад	ENZIM Biotech, м. Ладижин	Рідка і суха. Упаковка: пакет Zip-Lock 1 кг; банка пластикова: 100 г; флакон ПЕТ 200 мл; пластикова каністра 1, 5, 20 л	д.в.	[13]
Enartis 1000S	Enartis, Італія	Концентрований високоочищений ферментний препарат у мікрогранульованій формі	д.в.	[14]
Enartis Zym QUICK	Enartis, Італія	Рідкий препарат	д.в.	[15]
LALLZYME HC	Корпорація «Lallemand», Великобританія	Сухий препарат	3500 од/г (одиниць полігалактуранази); 100 од/г (одиниць пектинліази); 800 од/г (одиниць пектинестерази)	[16]
Lallzyme Cuvee Blanc	Корпорація «Lallzyme Cuvee Blanc», Швейцарія	Сухий препарат	Глюкозидна активність; відсутня целюлазна і геміцелюлазна активність	[17]
Pectinex XXL	«Novozyme», Данія	Сухий препарат	11000 од/г	[18]

Примітка: д.в. – у наведеному джерелі дані щодо активності відсутні

3.2. Розрахунок потужності виробництва пектолітичного комплексу ферментних препаратів

Рекомендоване дозування пектолітичних ферментних препаратів становить 3-4г/100кг сировини як для процесу виготовлення червоних, так і білих й рожевих вин. Відмінність полягає у тому, що для виготовлення червоних вин ферменти додають після подрібнення в момент переливання в бродильний чан, а для виготовлення білих та рожевих – додають у дробарку або транспортну ємкість, перед пресуванням або взаємодією із шкіркою. У

випадку недозрілого винограду або дрібних ягід дозування збільшують до 5г/100кг [19].

Для розрахунку обираємо середнє дозування ферментного препарату – 4г/100 кг винограду.

Згідно статистичних даних за 2019 рік в Україні переробили на виноматеріали 124,2 тис. тонн винограду [20].

Таким чином, для забезпечення річної потреби українського виноробства теоретична потреба у пектолітичних ферментних препаратах у вагових одиницях становитиме:

$$\frac{124,2 \cdot 10^6 \cdot 4 \cdot 10^{-3}}{100} = 4968 \frac{\text{кг}}{\text{рік}}$$

Оскільки на ринку України представлені ферментні препарати імпортованих постачальників, зокрема провідної компанії LAMOTHE-ABIET, виробника серії ферментних препаратів для виноробства, які вже міцно завоювали собі позиції, але також враховуючи необхідність забезпечення на перспективу незалежність від закордонних постачальників, для подальших розрахунків виробничої потужності проєктованого підприємства обираємо 10% від потреби українських виноробів у пектолітичних ферментах. Це становитиме:

$$4968 \cdot 0,1 = 496,8 \approx 500 \text{ кг/рік}$$

Оскільки пектолітичний комплекс ферментів має цілий ряд ферментативних активностей, стандартизацію його здійснюють, як правило, за однією з них. Для потреб виноробства така стандартна активність є полігалактураназною.

Отже, згідно даних провідних виробників ферментних препаратів для виноробства, ферментний препарат Vinozym® Vintage FCE, який нами обрано як препарат порівняння, має полігалактураназну активність 7500 од/г [21].

Таким чином, річна потужність виробництва у одиницях полігалактураназної активності складе:

$$500 \cdot 7500 \cdot 10^3 = 3,75 \cdot 10^9 \text{ од/рік}$$

Враховуючи продуктивність обраного біологічного агента *Bacillus macerans* BS-04 за полігалактуроноазною активністю – 15,1 од/мл [1], що дорівнює $15,1 \cdot 10^6$ од/м³, отже річний об'єм культуральної рідини без урахування втрат має становити:

$$V_{\text{крріч}} = \frac{3,75 \cdot 10^9}{15,1 \cdot 10^6} = 248,3 \text{ м}^3$$

Враховуючи те, що під час виділення і очищення ферментних препаратів спостерігаються значні втрати (40%), з урахуванням втрат об'єм культуральної рідини має становити:

$$V_{\text{крріч}} = 248,3 \cdot 1,4 = 347,6 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для даного розрахунку приймемо загальну кількість робочих днів на рік – 100. Таку кількість трудоднів приймемо для більшої гнучкості організації технологічних процесів. Весь інший час на проектованому виробництві можуть бути одержані інші ферментні препарати при культивуванні інших бактеріальних продуцентів.

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

Розрахуємо цикл роботи ферментера за формулою:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 30 + 10 = 40 \text{ (год), де}$$

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

$T_{\text{др}}$ – тривалість допоміжних робіт, де враховані наступні операції: 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 культуральної рідини (1 год).

Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = \frac{N_{\text{еф}}}{T_{\text{цф}}} = \frac{2400}{40} = 60 \text{ циклів/рік}$$

Об'єм культуральної рідини, який необхідно отримати за цикл буде наступним:

$$V_{\text{крцикл}} = \frac{V_{\text{крріч}}}{\text{пц}} = \frac{347,6}{60} = 5,79 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

З урахуванням того, що *Bacillus macerans* BS-04 є аеробом, обираємо коефіцієнт заповнення ферментера 0,6. Враховуючи це, геометричний об'єм ферментера становитиме:

$$V_{\text{ф}} = \frac{5,79}{0,6} = 9,65 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий стандартний ферментер об'ємом 10 м³ з коефіцієнтом заповнення $K_z = 0,6$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Згідно попереднього розрахунку об'єм ферментера для культивування *Bacillus macerans* BS-04 – продуцента комплексу пектолітичних ферментів для виноробства становить 10 м³. Коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап.}} = 0,6$. Отже, розраховуємо робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб.}} = V_{\text{ф.}} \times K_{\text{зап.}} = 10 \times 0,6 = 6 \text{ м}^3$$

Далі визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу, для приготування 6 м³ культуральної рідини. Необхідний об'єм посівного матеріалу *Bacillus macerans* BS-04 становить 10 % від загального об'єму поживного середовища.

Для приготування 6 м³ культуральної рідини, потрібно: $6 \times 0,1 = 0,6 \text{ м}^3$ посівного матеріалу *Bacillus macerans* BS-04. Таку кількість посівного матеріалу можна отримати у ферментері об'ємом 1 м³.

Для приготування 0,6 м³ (600 л) культуральної рідини, потрібно: $0,6 \times 0,1 = 0,06 \text{ м}^3$ (60 л) посівного матеріалу *Bacillus macerans* BS-04. Таку кількість посівного матеріалу можна отримати у ферментері об'ємом 0,1 м³ (100 л).

Для приготування 60 л культуральної рідини, потрібно: $60 \times 0,1 = 6$ л посівного матеріалу. Таку кількість посівного матеріалу *Bacillus macerans* BS-04 можна отримати у ферментері об'ємом 10 л.

Для приготування 6 л культуральної рідини, потрібно: $6 \times 0,1 = 0,6$ л посівного матеріалу. Таку кількість *Bacillus macerans* BS-04 можна отримати у колбах на качалках.

Таким чином, процес підготовки посівного матеріалу проходитиме у чотири етапи, п'ятим етапом буде сам процес біосинтезу (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Результати розрахунку об'ємів ферментаційного обладнання для підготовки посівного матеріалу і виробничого біосинтезу

Об'єм ферментера, л	Коефіцієнт заповнення	Робочий об'єм ферментера, л	Посівний матеріал (10%), л	Конденсат (10%), л	Об'єм поживного середовища, л
10000	0,6	6000	600	600	4800
1000	0,6	600	60	60	480
100	0,6	60	6	6	48
10	0,6	6	0,6	—	5,4

РОЗДІЛ 4.

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для вибору оптимального технологічного рішення стосовно способу культивування і типу ферментаційного обладнання необхідно у першу чергу врахувати фізіологічні та морфологічні особливості біологічного агента – *Bacillus macerans* BS-04. *Bacillus macerans* BS-04 є аеробними бактеріями з оптимальною температурою для культивування 37 ± 2 °С. Оптимальне значення рН – нейтральне, отже за таких умов можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами. Необхідність забезпечення ефективних масообмінних процесів і асептичних умов під час біосинтезу зумовлює вибір саме глибинного культивування, оскільки поверхнєве культивування бактерій практично не використовується у промислових умовах для отримання ферментних препаратів. Асептичні умови виробництва планується забезпечувати стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища та аераційного повітря. Для запобігання потрапляння контамінантів всередину ферментаційного обладнання в ферментері створюється надлишковий тиск.

Оскільки максимальний синтез пектиназ відбувається у стаціонарній фазі розвитку *B. macerans* BS-04, біосинтез планується здійснювати при періодичному процесі культивування глибинним способом.

					НУХТ БТЕК 03.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Літовченко О.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевірив		Скряцька О.І.						
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П						
						Кафедра БТМ 32		

Отже, для проведення процесу біосинтезу пектинази *B. macerans* BS-04 необхідно обрати ферментер глибинного типу, у якому встановлений пристрій для аерації барботажного типу (бактерії є аеробною культурою). Зважаючи на будову клітин *B. macerans* BS-04, для яких немає небезпеки зрізових зусиль, у ферментері встановлюється турбінна мішалка відкритого типу. Враховуючи те, що у склад поживного середовища не входять компоненти, які можуть спричиняти суттєве спінювання, ферментер достатньо обладнати механічним піногасником.

Усім зазначеним вище вимогам відповідає ферментаційне обладнання BIORUS® (рис. 4.1). Ферментер виконано з нержавіючої сталі марки AISI 316L для всіх поверхонь, що контактують із продуктом. AISI 304 – для неконтактуючих із продуктом поверхонь (сорочка ферментера, зовнішня поверхня та інше). Ферментер обладнаний необхідним набором портів і роз'ємів для підключення датчиків та здійснення обв'язки.



Рис. 4.1 Ферментер BIORUS®

Відношення діаметра до висоти – 1:2,5. Максимальний коефіцієнт заповнення – 70%, що не нижче розрахованого значення (60 %).

Розрахунковий тиск посудини – 0,3 МПа, розрахунковий тиск сорочки – 0,3 МПа. Ефективність теплообміну й розподілу температури усередині посудини підвищена за рахунок поліпшеної системи поділу каналів.

Донна частина ферментера є торосферичною, без застійних зон. Контроль і підтримка заданої температури в ємності під час ферментації здійснюється за рахунок подачі води в сорочку, для охолодження, або активацією нагрівального елемента, для нагрівання, для об'ємів не більш 300 л. Якщо об'єм культуральної рідини більше 300 літрів, то нагрівання здійснюється шляхом циркуляції води через теплообмінник і подачею пари в нього. Використовується непряме нагрівання ферментера. Контроль температури в циркуляційному контурі здійснюється за допомогою вбудованого терморегулятора (робочий температурний діапазон – кімнатна температура + 8 °С, до +60 °С).

Для контролю над рівнем рідини використовується оглядове вікно з великим кутом огляду, є підсвічування 12В.

Контроль і керування параметрами ферментера у стандартній комплектації – температура, швидкість мішалки (20-1000 об/хв), рН, рO₂, датчик піни, подача повітря – через ротаметр, автоматичний контроль – через витратомір [22].

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Бактерії *B. macerans* BS-04 – продуценти пектиназ є аеробними мікроорганізмами. Для накопичення біомаси та синтезу цільового продукту у середовище культивування потрібно подавати стерильне повітря для аерації, яке ще буде виконувати масообмінні функції, сприяючи інтенсивнішому перемішуванню, підтримувати надлишковий тиск в апараті та стимулювати виведення газоподібних продуктів обміну.

Повітря, для вирощування посівного матеріалу в інокуляторах і для виробничого біосинтезу у ферментері, стерилізується рядом фільтруючих систем різного ступеня очистки.

Забір атмосферного повітря здійснюється за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря. Повітрязабірник має ширину 2,5 м, а довжину – 0,5 м, що дозволяє постійно отримувати приток свіжого атмосферного повітря для подальшого його очищення [23].

Стиснення повітря відбувається у компресорі VEGA 200 під тиском 0,35 МПа. В результаті стиснення повітря збільшується його температура до 120-200°C. Продуктивність компресора становить 1730 м³/год повітря [24]. Охолодження стисненого повітря відбувається у теплообміннику AFR 315 до температури 25-30°C. Продуктивність теплообмінника становить 1890 м³/год повітря. Після охолодження вологовміст повітря зменшується до 60 % [25]. Тому далі необхідно здійснити видалення сконденсованої вологи і парів мастила, що потрапили з компресора. Це відбувається у ресивері РВ 500.11.00 [26]. Наступний етап – нагрівання повітря у теплообміннику AFR 315 до 50°C. Продуктивність теплообмінника становить 1890 м³/год повітря. На даному етапі вологовміст повітря зменшується до 50 %.

Для забезпечення очищення і стерилізації аераційного повітря у промислових масштабах використовують механічний спосіб: багатостадійне фільтрування фільтри грубої, тонкої та індивідуальної очистки. Першим етапом, призначеним для затримання основної маси домішок і грубодисперсних часток є грубе очищення повітря. Спираючись на необхідність забезпечення високої продуктивності обираємо вісциновий фільтр, який являє собою металеву прямокутну коробку з двома решітками, між якими засипані кільця Рашига, змочені в вісциновій олії. Фільтр має високу пропускну здатність, розташований горизонтально на висоті 4 м від рівня підлоги. Такі фільтри забезпечують ефективність очищення до 90 %. Циклічність заміни вісцинової олії: 1 раз на 2-3 місяці та в залежності від

забрудненості повітря. [27]. При проходженні повітря крізь кільця змочені у олії, пил з повітря осідає на них, а очищене повітря надходить у компресор.

Головні фільтри встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря і мають забезпечити ступінь очищення від мікроорганізмів-контамінантів не нижче 98 %. Цим вимогам повністю відповідає головний фільтр конструкції «Гіпромедпром», який представляє собою циліндричну ємність з сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщують фільтруючий матеріал – базальтове волокно. Щільність упаковки від 350 до 400 кг/см³. Ступінь очищення повітря після проходження головного фільтру становить 95 % [28].

Для фільтрації повітря в індивідуальному фільтрі обираємо фільтри з фторопласту, оскільки цей матеріал витримує температуру та тиск парової стерилізації.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Як було обґрунтовано вище виробничий біосинтез пектиназного комплексу ферментів *Bacillus macerans* BS-04 вимагає дотримання асептичних умов, тому для запобігання контамінації культури на будь-якому з етапів виробництва (особливо під час процесів завантаження, вивантаження та відбору проб з ферментера) необхідно проводити періодичне миття та дезінфекцію поверхонь приміщень і обладнання [29].

Періодичне прибирання та дезінфекцію у виробничому приміщенні здійснюють щоденно наприкінці зміни. Виробничий біосинтез є безперервним процесом, тому робота персоналу на підприємстві відбувається у три зміни. Однак, оскільки цей процес є автоматизованим і закритим, то доступ персоналу до цеху виробничого біосинтезу необхідний лише для контролю показників та відбору проб. Тому щоденне прибирання може проводитись 1 раз на добу.

Для постійного підтримання чистоти на підприємстві протягом всіх циклів біосинтезу тільки щоденного прибирання недостатньо. Тому для видалення забруднень на всіх поверхнях, в тому числі у важкодоступних місцях після закінчення кожного виробничого циклу проводиться генеральне прибирання. Всього за 100 трудових днів підприємство здійснює 60 виробничих циклів. Відповідно за весь період роботи підприємства необхідно провести 60 генеральних прибирань.

Крім цього, у випадку потреби, персонал повинен проводити поточне прибирання власного робочого місця протягом зміни.

Для того, щоб обрати миючий або дезінфікуючий засіб необхідно проаналізувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення, враховуючи, що на 1 м² витрачається приблизно 100 мл робочого розчину (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

На сьогодні існує широкий асортимент дезінфікуючих та миючих засобів:

Фенольні препарати. Володіють високою активністю проти вегетативних форм бактерій та грибів, мікобактерій та оболонкових вірусів. Особливість фенольних препаратів полягає у здатності їх утворювати кінцеву плівку на дезінфікуючих поверхнях, що забезпечує пролонговану дію на патогенні мікроорганізми [30].

Хлорорганічні сполуки володіють високою антимікробною активністю. Сучасні препарати цієї групи – похідні цианурових кислот, як правило, мають або композиційний склад, або модернізовану форму випуску, що дозволяє значно нівелювати їх негативні якості (клорсепт, неохлаор, дезактин, хлорантоїн, та ін).

Альдегіди – високоактивні сполуки з яскравими антимікробними властивостями до всіх видів мікроорганізмів за рахунок алкілування аміно – та сульфгідрильних груп протеїнів і пригнічення їх синтезу. Доволі часто

використовується для дезінфекції формальдегід. Широке застосування набув препарат дезоформ (на основі глутарового формальдегіду).

Дезінфектанти на основі четвертинних амонієвих сполук. Володіють гарними миючими властивостями, низькою токсичністю, відсутністю різкого запаху. Вони не обезбарвлюють тканини і не викликають корозії оброблюваних поверхонь, гарно розчиняються у воді, стабільні при зберіганні. До цієї групи належать: Септодор, Мікробак форте, Біоклін, декаметоксин, септаксилін, септусин та ін.

Препарати з похідними гуанідину є найбільш перспективними при обробці поверхонь, як малотоксичні сполуки з пролонгованою дією, що не викликають корозії. Вони утворюють на оброблюваній поверхні бактерицидну плівку, що зберігається протягом декількох діб [29].

Також в якості миючих засобів використовуються мила, лужні і кислотні миючі препарати, синтетичні миючі засоби та миючого – дезінфікуючі засоби. Зазвичай для санітарної обробки об'єктів широко застосовують суміші, що складаються з різних хімічних речовин, які здатні підсилювати дію один одного, в результаті чого загальна ефективність суміші значно перевершує ефективність кожного компонента окремо. Крім того, спектр дії композицій значно ширший, ніж окремих хімічних засобів. Для виробництва мийно-дезінфікувальних засобів широко використовуються катіонні речовини з класу четвертинних-амонієвих сполук. Водні розчини четвертинних-амонієвих сполук мають низький поверхневий натяг, що обумовлює їх піноутворювальні, емульгуювальні, мийні та змочувальні властивості. Четвертинно-амонієві сполуки мають виражені бактериостатичні і деякі бактерицидні властивості, вони не мають запаху і кольору, не викликають корозії металевих поверхонь. У лужному середовищі вони діють активніше, ніж у кислому.

Для посилення бактерицидних властивостей дезінфікуючих засобів широко використовують додавання мила. Воно розчиняє жири, змиває

забруднення разом з мікроорганізмами, знижує поверхневий натяг, що сприяє кращому проникненню дезінфектанта в мікробну клітину [31].

Дезінфекцію зовнішніх поверхонь проводять шляхом нанесення або розбризкування робочого розчину дезінфікуючого засобу на поверхню рівномірним шаром. Тривалість контакту робочого розчину дезінфікуючого засобу з поверхнею повинна бути не менше 20 хв. Після закінчення обробки залишки миючого або дезінфікуючого засобу зливають і промивають поверхню водою.

Перш ніж вибрати миючий чи дезінфікуючий засіб, необхідно здійснити їх аналіз. Дана інформація подана нижче.

Новохлор екстра. Мийно-дезінфікуючий засіб на основі активного хлору (7-9%), його робочі розчини мають лужну реакцію та володіють емульгувальними, високими змочувальними і мийними властивостями. Робочі розчини ново хлору добре змиваються водою з оброблених поверхонь, не залишають нальоту, а також видаляють жири, білкові, механічні забруднення. Новохлор екстра і його розчини не пошкоджують вироби з металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, деревини, кераміки, лакофарбове, гальванічне і полімерне покриття. Даний дезінфікуючий засіб відноситься до III класу небезпеки (помірно небезпечні речовини по ГОСТ 12.1.007-76) [32].

Саніфект. Мийно-дезінфікуючий засіб до складу якого входить комплекс четвертинних амонієвих сполук (не менше 9,0%). Саніфект добре змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Водні розчини саніфекту мають мийними властивостями, легко змиваються з оброблених поверхонь, не залишають слідів. Робочі розчини видаляють білково-жирові забруднення та не викликають корозійної дії на об'єкти, які виготовлені з алюмінію, нержавіючої сталі, покритих нікелем або латунню, різних видів полімерних матеріалів, гуми, скла, бетону, деревини. Саніфект відноситься до IV класу небезпеки (малонебезпечна речовина по ГОСТ 12.1.007-76). Не проявляє мутагенної, канцерогенної, ембріотоксичної дії [33].

Стеріокс. Надоцтова кислота (12,0-15,0 %) є основою даного мийно-дезінфікуючого засобу. Стеріокс добре змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Робочі розчини прозорі, мають помірний запах оцтової кислоти, мають миючі властивості, видаляють механічні, білкові, жирові забруднення. Розчини не впливають на об'єкти, що виготовлені з нержавіючої сталі, алюмінію, скла, гуми (в т.ч. силіконової), кислотостійких пластмас, фторопласту, деревини, кераміки, фарфору, фаянсу і поверхні з лакофарбовим, гальванічним, полімерним покриттям. Робочі розчини стеріоксу відносяться до IV класу небезпеки, не викликають шкірно-подразнюючої та сенсibiliзуючої дії. Приготування робочих розчинів стеріоксу проводять з використанням індивідуальних засобів захисту: клейонковий фартух, гумові рукавички, герметичні окуляри, респіратор з протигазовими патроном [34].

Фан. Активною речовиною дезінфікуючого засобу є дидецилдиметиламоній хлорид (не менше 5%). Даний засіб володіє бактерицидною (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*), вірулоцидною і фунгіцидною (гриби роду *Candida*, а також дерматофіти і цвілеві гриби) діями та відноситься до IV класу небезпеки [35].

Сокрена. Дезінфікуючий засіб до складу якого входить дидецилдиметиламоній хлорид (не менше 7%), ПАР та інші добавки. Сокрена добре змішується з водою, розчиняє жири, змивається та проявляє антибактеріальну (крім мікобактерій туберкульозу), фунгіцидну і вірулоцидну (вірус гепатиту Б, ВІЛ) активність. Відноситься до III класу небезпеки (оскільки у вигляді концентрату викликає помірну місцево-подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки очей) [36].

Санікон. Дезінфікуючий засіб з миючими властивостями на основі комплексу четвертинних амонієвих сполук. Санікон володіє широким спектром антимікробної активності, проявляє бактерицидну активність (включаючи збудників туберкульозу, а також *Campylobacter jejuni*,

Corynebacterium ammoniagenes, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella choleraesuis, Salmonella typhi, Serratia marcescens, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes). Характеризується віруліцидною дією (в тому числі проти збудників гепатитів, ВІЛ, герпесу, грипу, ротавірусів, хантавірусів, вірусу пташиного грипу H5N1). Має фунгіцидну (кандидозів, дерматомікозів та ін. патогенних грибів і цвілі, в тому числі *Aspergillus niger*) та спороцидну дію. Санікон належить до IV класу небезпеки (малонебезпечні речовини за ГОСТ 12.1.007-76). Не містить альдегідів, фосфатів, активного хлору, кисню та інших агресивних, високотоксичних, летких і екологічно небезпечних компонентів, не подразнює органи дихання та очі. Засіб добре змішується з холодною і гарячою водою в будь-якому співвідношенні [37].

Характеристика та вартість миючих та/або дезінфікуючих засобів, які будуть використовуватися на виробництві пектинази, наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Узагальнена характеристика мийних та/або дезінфікуючих засобів, що використовуються на виробництві пектиназ культивуванням

***Bacillus macerans* BS-04**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Назва миючого/ дезінфікуючого засобу	Концентрація робочого розчину	Вартість 1 л (кг) концентрату мийно-дезінфікуючого засобу, грн*	Джерела
Обладнання, інвентар, комунікації	Новохлор-екстра	0,5%	60	1
	Саніфект	0,1%	296,1	2
	Стеріокс	0,1%	135	3
Стіна, підлога, вікна, двері, тара, інвентар	Фан	0,3%	186	4
	Микробак-форте	0,5%	236	5
	Санікон	0,2%	216	6

Примітка: * – ціни наведено, станом на жовтень 2020 р. Джерела: 1. <http://interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>; 2. <http://oazistd.prom.ua/p119830630->

sanifektdezefekt.html; 3. <http://interdez.com.ua/product/sterioks-baltiachemi-kiev>; 4. <http://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-fan-baltiachemi-kiev>; 5. <http://oazistd.prom.ua/p752713-sokrena.html>; 6. <http://oazistd.prom.ua/p80899373-sanikon-dezekon.html>.

Засоби будуть змінюватися кожні 3 місяці для запобігання виникнення резистентності мікроорганізмів до них.

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно патентної інформації для отримання пектинази культуру *Bacillus macerans* BS-04 вирощували на середовищі наступного складу (табл. 4.2.).

Таблиця 4.2

Склад поживного середовища для культивування *Bacillus macerans* BS-04 та біосинтезу пектиназ [1]

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л
Буряковий жом мелений	20,0
Кукурудзяний екстракт	7,4
Кальцій хлористий	0,9
Натрій вуглекислий (сода)	2,0
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	2,6
Натрій фосфорнокислий однозаміщений	2,2

Для забезпечення стерильності поживного середовища для культивування *Bacillus macerans* та уникнення непродуктивних втрат компонентів внаслідок можливого їх реагування між собою під час стерилізації необхідно провести розподіл поживного середовища на композиції, враховуючи термолабільність компонентів та їх здатність вступати у необоротні реакції між собою.

Композиція I: такі компоненти як буряковий жом мелений і кукурудзяний екстракт готуємо і стерилізуємо окремо при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

Дані умови обираємо, аби уникнути карамелізації, оскільки дані компоненти є термолабільними.

Композиція II: солі: кальцій хлористий, натрій вуглекислий стерилізують при температурі 130 °С, тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв.

Композиція III: Для запобігання випадання осаду, що може утворитися при взаємодії фосфорних солей з катіонами магнію, окремо готуємо і стерилізуємо амоній фосфорнокислий двозаміщений і натрій фосфорнокислий однозаміщений при температурі 130 °С, тиску 0,15 МПа протягом 40 хв (**композиція III**) для невеликих об'ємів, в колбах) або разом, попередньо довівши значення рН до 4,5 для попередження випадіння осаду (для великих об'ємів, в апаратах). Для приготування і стерилізації поживного середовища для виробничої ферментації в об'ємі 6000 л доцільно використовувати установку безперервної стерилізації (УБС-5).

Згідно даних щодо термолабільності компонентів, а також їх кількісного вмісту розподіл їх на композиції для приготування і стерилізації виглядатиме таким чином (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Розподіл компонентів поживного середовища на композиції

Об'єм поживного середовища	Композиції	Режим стерилізації	Спосіб стерилізації
0,6 л	Композиція I: Буряковий жом мелений – 20 г/л, Кукурудзяний екстракт – 7,4 г/л	112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 30 хв	В автоклаві
	Композиція II: Кальцій хлористий – 0,9 г/л Натрій вуглекислий (сода) – 2,0 г/л	131 °С (0,15 МПа) впродовж 60 хв	В автоклаві
	Композиція III Амоній фосфорнокислий двозаміщений – 2,6 г/л, Натрій фосфорнокислий однозаміщений – 2,2 г/л	131 °С (0,15 МПа) впродовж 60 хв	В автоклаві

6 л	Композиція I: Буряковий жом мелений – 20 г/л, Кукурудзяний екстракт – 7,4 г / л	112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 30 хв	В автоклаві
	Композиція II: Кальцій хлористий – 0,9 г/л Натрій вуглекислий (сода) – 2,0 г/л	131 °С (0,15 МПа) впродовж 60 хв	В автоклаві
	Композиція III Амоній фосфорнокислий двозаміщений – 2,6 г/л, Натрій фосфорнокислий однозаміщений – 2,2 г/л	131 °С (0,15 МПа) впродовж 60 хв	В автоклаві
60 л	Композиція I: Буряковий жом мелений – 20 г/л, Кукурудзяний екстракт – 7,4 г/л	112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 30 хв	В реакторі-змішувачі
	Композиція II: Кальцій хлористий – 0,9 г/л Натрій вуглекислий (сода) – 2,0 г/л, Амоній фосфорнокислий двозаміщений – 2,6 г/л, Натрій фосфорнокислий однозаміщений – 2,2 г/л (рН=4,5)	131 °С (0,15 МПа) впродовж 60 хв	В інокуляторі
600 л	Композиція I: Буряковий жом мелений – 20 г/л, Кукурудзяний екстракт – 7,4 г/л	112–115 °С і під тиском 0,05 МПа впродовж 30 хв	В реакторі-змішувачі
	Композиція II: Кальцій хлористий – 0,9 г/л Натрій вуглекислий (сода) – 2,0 г/л, Амоній фосфорнокислий двозаміщений – 2,6 г/л, Натрій фосфорнокислий однозаміщений – 2,2 г/л (рН=4,5)	131 °С (0,15 МПа) впродовж 60 хв	В інокуляторі
6000 л	Композиція I: Буряковий жом мелений – 20 г/л, Кукурудзяний екстракт – 7,4 г/л, Кальцій хлористий – 0,9 г/л Натрій вуглекислий (сода) – 2,0 г/л, Амоній фосфорнокислий двозаміщений – 2,6 г/л, Натрій фосфорнокислий однозаміщений – 2,2 г/л	131 °С	В установці безперервної стерилізації (УБС-5)

РОЗДІЛ 5.

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Н-1 Н-2	Насоси відцентрові	2	Відцентрові асептичні насоси моделі 2065 фірми ООО «Авіста» (Росія), продуктивність – 300 л/хв
Н-3	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний TP 4000; продуктивність – до 3 л/хв; двигун виконаний в металевому корпусі і встановлений на кронштейні
Н-4	Насос перистальтичний	1	Насос перистальтичний LG350; продуктивність – до 35 л/хв; двигун виконаний в металевому корпусі і встановлений на кронштейні
ОВ-5 ОВ-6	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Продуктивність – 10...20 кг
ОВ-7 ОВ-8	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Продуктивність – 4...10 кг

					<i>НУХТ БТЕК 03.01.05 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Літовченко О.</i>							
<i>Перевірив</i>	<i>Скороцька О.І.</i>							
<i>Рецензент</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог Т.П</i>				Кафедра БТМ⁴⁵			

ОВ-9	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Продуктивність – 100...150 кг
ОВ-10	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Продуктивність – 40...50 кг
ПЗ-11	Повітрязабірник	1	Матеріал – кислотостійка листовая сталь, ширина – 2,5 м, довжина – 0,5 м, модель – WSQ-K
ФГ-12	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал – хімволокно, продуктивність – 1700 м ³ /год, Е = 90 %, модель – ФВК-36-600-3-G4
К-13	Компресор	1	Матеріал – сталь, продуктивність – 1730 м ³ /год, ширина – 2,5 м, висота – 2,115 м, модель – VEGA 200
Т-14	Теплообмінник-охолоджувач	1	Продуктивність – 1890 м ³ /год, висота – 1,8 м, ширина – 1,96 м, матеріал – мідні труби з алюмінієвими ребрами, модель – AFR-315
РС-15	Ресивер	1	Матеріал – сталь, об'єм – 500 л, робочий тиск – до 1 МПа, ширина – 650 мм, висота – 1800 мм, модель - РВ 500.11.00
Т-16	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач з спуском конденсату Lurgy C-15(Німеччина)
Ф-17	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Циліндричний апарат зі сферичною кришкою і днищем для тонкої очистки повітря. Е=95 %, видалення частин розміром до 1 мкм

P-18	Реактор-змішувач об'ємом 20 л	1	Об'єм – 20 л, матеріал – нержавіюча сталь AISI 304
P-19	Реактор-змішувач об'ємом 35 л	1	Об'єм – 35 л, матеріал – нержавіюча сталь AISI 304
P-20	Реактор-змішувач об'ємом 180 л	1	Об'єм – 180 л, матеріал – нержавіюча сталь AISI 304
P-21	Реактор-змішувач об'ємом 350 л	1	Об'єм – 350 л, матеріал – нержавіюча сталь AISI 304
P-22	Реактор-змішувач об'ємом 5 м ³	1	Об'єм – 5 м ³ , матеріал – нержавіюча сталь AISI 304
Ф-23 Ф-24 Ф-25 Ф-26	Фільтри індивідуальної очистки повітря	4	Фільтр Sartofluor® GA компанії «Sartofluor» (Німеччина)), мембрана – політетрафторетилен. Площа фільтруючої поверхні – 0,05 м ² до 2,25 м ²
ФР-27	Ферментер (інокулятор на 10 л)	1	Ферментер BIORUS®, робочий об'єм 10 л, матеріал нержавіюча сталь; мішалка турбінного типу (20-1000 об/хв), температура, рН, рО ₂ , датчик піни, подача повітря на вентиляцію через ротаметр, автоматичний контроль через витратомір
ФР-28	Ферментер (інокулятор на 100 л)	1	Ферментер BIORUS®, робочий об'єм 100 л, матеріал нержавіюча сталь; мішалка турбінного типу (20-1000 об/хв), температура, рН, рО ₂ , датчик піни, подача повітря на вентиляцію через ротаметр, автоматичний контроль через витратомір

ФР-29	Ферментер (інокулятор на 1000 л)	1	Ферментер BIORUS®, робочий об'єм 1000 л, матеріал нержавіюча сталь; мішалка турбінного типу (20-1000 об/хв), температура, рН, рО ₂ , датчик піни, подача повітря на вентиляцію через ротаметр, автоматичний контроль через витратомір
ФР-30	Ферментер (виробничий ферментер на 10000 л)	1	Ферментер BIORUS®, робочий об'єм 10000 л, матеріал нержавіюча сталь; мішалка турбінного типу (20-1000 об/хв), температура, рН, рО ₂ , датчик піни, подача повітря на вентиляцію через ротаметр, автоматичний контроль через витратомір
У-31	УБС-5	1	Продуктивність – 5 м ³ /год; тиск пари – 0,5 МПа

РОЗДІЛ 6.

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПЕКТИНАЗ *BACILLUS MACERANS BS-04*

Технологічна схема біосинтезу пектиназного комплексу ферментів *Bacillus macerans* BS-04 включає допоміжні роботи (санітарну підготовку виробництва, підготовку і стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (підготовку посівного матеріалу і біосинтез пектиназного комплексу ферментів).

Технологічну та апаратурну схеми виробництва наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Персонал, задіяний у виробництві мікробіологічних препаратів повинен проходити медичний огляд (при влаштуванні на роботу та щорічно), пройти інструктаж на робочому місці, а також навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог та дотримуватися правил особистої гігієни.

Кожен працівник виробничого цеху має бути забезпечений комплектом спецодягу, заміна одягу проводиться у міру забруднення та зношування. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий спецодяг, підібрати волосся під хустинку або ковпак, ретельно вимити руки теплою водою з милом і продезінфікувати їх.

					<i>НУХТ БТЕК 03.01.05 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ПЕКТИНАЗ BACILLUS MACERANS BS-04</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Літовченко О.</i>						
<i>Перевірив</i>		<i>Скροцька О.І.</i>						
<i>Рецензент</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П</i>					<i>Кафедра БТМ 49</i>	

Кожен працівник на підприємстві несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, за стан робочого місця, за виконання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці.

ДР 1.2. Підготовка миючих засобів

Для обробки виробничого обладнання і інвентарю використовують розчини Новохлор-екстра, Саніфект та Стеріокс із заміною їх кожні 3 місяці.

При приготуванні робочих розчинів потрібно дотримуватись наступних правил:

- ✓ приготування розчинів здійснюють в спеціальному одязі, захисних окулярах, респіраторі чи марлевій пов'язці, гумових чоботах;
- ✓ при потраплянні розчинів на шкіру, їх треба змити водою.

Для обробки приміщень, стін, обладнання та інвентарю застосовують такі мийні засоби: Фан Микробак-форте Санікон із заміною їх кожні 3 місяці.

Приготування мийних та мийно-дезінфікуючих засобів проводять згідно інструкції виробника.

ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря

Підготовка стерильного стисненого аераційного повітря проводиться у декілька етапів.

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється через централізований повітрязабірний пристрій на висоті 30 м (ПЗ-11).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря

Попереднє очищення повітря здійснюють у комірковому фільтрі (Ф-12), який представляє собою металеву прямокутну коробку з двома решітками, між якими засипані кільця Рашига, змочені в вісциновій олії. Циклічність заміни вісцинової олії – 1 раз на 2-3 місяці та в залежності від забрудненості повітря. При проходженні повітря крізь кільця змочені у маслі, пил з повітря осідає на них, а очищене повітря надходить у компресор.

ДР 2.3. Компресування повітря

Для стиснення повітря використовують турбокомпресор (К-13). Температура повітря на виході з турбокомпресора – 180-200 °С, тиск повітря 0,26 МПа.

ДР 2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря

Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують. Для охолодження повітря використовують кожухотрубчастий теплообмінник (Т-14) з нерухомими трубними решітками. Повітря проходить всередині трубок, охолоджуюча вода – по міжтрубному простору. Далі повітря подається у ресивер (РС-15) для акумуляції та згладжування пульсації. Ресивер має конденсатовідвідний канал. Після ресивера здійснюють нагрівання повітря в теплообміннику-нагрівачу (Т-16) до 50 °С, $W = 50 \%$.

ДР 2.5. Очищення повітря в головному фільтрі

Охолоджене повітря надходить до головного фільтру (Ф-17). Головний фільтр конструкції “Гіпромедпрому” представляє собою циліндричну ємність з сферичним дном та кришкою. В середині фільтру знаходяться дві решітки, між якими розміщують фільтруючий матеріал – 1 м щільність упаковки від 350 до 400 кг/см³. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. В випадку спікання, забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

Охолоджене повітря, проходячи крізь шар базальтового волокна, очищається від аерозольних часток та мікроорганізмів.

ДР 2.6. Очистка повітря в індивідуальних фільтрах

Фінішна очистка повітря від мікроорганізмів здійснюється в індивідуальних фільтрах.

Для посівних апаратів очистка повітря від мікроорганізмів проводиться в індивідуальних повітряних фільтрах (Ф-23, 24, 25); фільтруючий матеріал – пористі фторопластові диски, товщиною 4 мм, отримані із порошку методом спікання. Фільтр представляє собою сталевий циліндр з кришкою та конічним дном.

Для виробничого ферментера фінішна очистка повітря від мікроорганізмів проводиться в індивідуальному фільтрі (Ф-26) потужністю 1000 м³/год: загальна поверхня фільтрації – 17,5 м², поверхня фільтрації одного циліндра – 0,24 м².

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *Bacillus macerans* BS-04 в колбах на качалці

Розрахунок компонентів для приготування 600 мл середовища представлено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 мл поживного середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Буряковий жом мелений	20	12	I	300
Кукурудзяний екстракт	7,4	4,5		
Вода		300		
Кальцій хлористий	0,9	0,6	II	200
Натрій вуглекислий	2,0	1,2		
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	2,6	1,6	III	100
Натрій фосфорнокислий однозаміщений	2,2	1,3		
Вода		250		
Разом				600

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції I. На технічних вагах у попередньо відтарованій колбі об'ємом 1000 мл зважують 4,5 г кукурудзяного екстракту, окремо зважують 12 г бурякового жому меленого і теж поміщають у колбу з кукурудзяним екстрактом. Додають 300 мл води питної, ретельно перемішують до повного суспендування всіх компонентів

поживного середовища протягом 20 хв. Готову композицію закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 112°C упродовж 30 хвилин.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції II. На технічних вагах зважують 0,6 г кальцію хлористого, 1,2 г натрію вуглекислого. Наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл та додають 200 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 131°C упродовж 40 хвилин.

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції III. На технічних вагах зважують 1,6 г амонію фосфорнокислого двозаміщеного та 1,3 г натрію фосфорнокислого однозаміщеного. Наважки поміщають в колбу об'ємом 200 мл та додають 100 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 131°C упродовж 40 хвилин.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *Bacillus macerans* BS-04 у ферментері об'ємом 10 л

Для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л, як раніше було розраховано, необхідно приготувати 6 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого складає 600 мл, загальна кількість води яку необхідно додати для приготування середовища становить 5,4 л.

Вміст компонентів для приготування 6 л поживного середовища наведено в таблиці 6.2.

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції I. На технічних вагах у попередньо відтарованій колбі об'ємом 5000 мл зважують 45 г кукурудзяного екстракту, окремо зважують 120 г бурякового жому меленого і теж поміщають у колбу з кукурудзяним екстрактом. Додають 3000 мл води

питної, ретельно перемішують до повного суспендування всіх компонентів поживного середовища протягом 20 хв. Готову композицію закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 112°C упродовж 30 хвилин.

Таблиця 6.2

Розрахунок компонентів для приготування 6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6 л поживного середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, л
Буряковий жом мелений	20	120	I	3,0
Кукурудзяний екстракт	7,4	44,4		
Вода		3000		
Кальцій хлористий	0,9	5,4	II	1,4
Натрій вуглекислий	2,0	12		
Вода		1400		
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	2,6	15,6	III	1,0
Натрій фосфорнокислий однозаміщений	2,2	13,2		
Вода		1000		
Разом				5,4

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції II. На технічних вагах зважують 6 г кальцію хлористого, 12 г натрію вуглекислого. Наважки поміщають в колбу об'ємом 3000 мл та додають 1400 мл води питної, ретельно перемішують до повного розчинення. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 131°C упродовж 40 хвилин.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції III. На технічних вагах зважують 16 г амонію фосфорнокислого двозаміщеного та 13 г натрію фосфорнокислого однозаміщеного. Наважки поміщають в колбу об'ємом 2000 мл та додають 1000 мл води питної, ретельно перемішують до повного

розчинення. Готовий розчин закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температур 131°C упродовж 40 хвилин.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *Bacillus macerans* BS-04 у ферментері об'ємом 100 л

Для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л, як раніше було розраховано, необхідно приготувати 60 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого складає 6 л та враховуючи об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища гострою парою, який становить 6 л, загальний об'єм води який необхідно додати для приготування середовища становить $60-6-6=48$ л.

Вміст компонентів для приготування 60 л поживного середовища наведено в таблиці 6.3.

Таблиця 6.3

Розрахунок компонентів для приготування 60 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60 л поживного середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Буряковий жом мелений	20	1200	I	15
Кукурудзяний екстракт	7,4	444		
Вода, л		15		
Кальцій хлористий	0,9	54	II	33
Натрій вуглекислий	2,0	120		
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	2,6	156		
Натрій фосфорнокислий однозаміщений	2,2	132		
Вода, л		33		
Разом				48

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції I. На технічних вагах зважують 1200 г бурякового жому меленого та 444 г кукурудзяного екстракту. Наважки поміщають через завантажувальний люк в реактор-змішувач (Р-18) об'ємом 20 л та додають 15 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та суспендують компоненти упродовж 5-10 хвилин. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С протягом 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск реактора-змішувача з одночасною подачею пари у сорочку апарату.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції II. На технічних вагах зважують 54 г кальцію хлористого, 120 г натрію вуглекислого, 156 г амонію фосфорнокислого двозаміщеного та 132 г натрію фосфорнокислого однозаміщеного. Наважки поміщають в реактор (Р-19) об'ємом 35 л та додають 33 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та проводять розчинення компонентів упродовж 5-10 хвилин. Готовий розчин солей перекачують перистальтичним насосом (Н-3) у попередньо простерилізований ферментер на 100 л (ФР-28), доводять рН розчину до значення 4,5 подачею розчину хлоридної кислоти та стерилізують при температурі 131°С упродовж 40 хвилин з моменту досягнення температури стерилізації подачею гострої пари через барботер з одночасною подачею пари у сорочку апарату.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту *Bacillus macerans* BS-04 у ферментері об'ємом 1000 л

Для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1000 л, як раніше було розраховано, необхідно приготувати 600 л поживного середовища. Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого складає 60 л та враховуючи об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища гострою парою, який становить 60 л,

загальний об'єм води який необхідно додати для приготування середовища становить 480 л.

Вміст компонентів для приготування 600 л поживного середовища наведено в таблиці 6.4.

Таблиця 6.4

Розрахунок компонентів для приготування 600 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 л поживного середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Буряковий жом мелений	20	12	I	150
Кукурудзяний екстракт	7,4	4,5		
Вода, л		150		
Кальцій хлористий	0,9	0,54	II	330
Натрій вуглекислий	2,0	1,2		
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	2,6	1,56		
Натрій фосфорнокислий однозаміщений	2,2	1,32		
Вода, л		330		
Разом				480

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції I. Через об'ємно-ваговий дозатор ОВ-5 12 кг бурякового жому меленого та 4,5 кг кукурудзяного екстракту (ОВ-7) поміщають у реактор-змішувач (Р-20) об'ємом 180 л та додають 150 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та суспендують компоненти упродовж 5-10 хвилин. Стерилізацію проводять при температурі 112 °С протягом 30 хв з моменту досягнення температури стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск реактора-змішувача з одночасною подачею пари у сорочку апарату.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції II. На технічних вагах зважують 540 г кальцію хлористого, 1,2 кг натрію вуглекислого, 1,56 кг амонію фосфорнокислого двозаміщеного та 1,32 кг натрію фосфорнокислого однозаміщеного. Наважки поміщають в реактор (Р-21) об'ємом 350 л та

додають 330 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій та проводять розчинення компонентів упродовж 5-10 хвилин. Готовий розчин солей перекачують перистальтичним насосом (Н-4) у попередньо простерилізований ферментер на 1000 л (ФР-29), доводять рН розчину до значення 4,5 подачею розчину хлоридної кислоти та стерилізують при температурі 131°C упродовж 40 хвилин з моменту досягнення температури стерилізації подачею гострої пари через барботер інокулятора з одночасною подачею пари у сорочку апарату.

ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для основного етапу біосинтезу пектинази у ферментері об'ємом 10000 л

Для основного етапу біосинтезу в ферментері, як раніше було розраховано необхідно приготувати 6,0 м³ поживного середовища. Враховуючи, що для засіву ферментера використовують рідкий посівний матеріал, об'єм якого складає 600 л та враховуючи об'єм конденсату при стерилізації поживного середовища гострою парою, який становить 600 л, загальний об'єм води який необхідно додати для приготування середовища становить 4800 л (4,8 м³). Приготування і стерилізація поживного середовища проводиться з використанням установки безперервної стерилізації.

Вміст компонентів для приготування 6 м³ поживного середовища наведено в таблиці 6.5.

ДР 3.5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища в УБС-5. Через об'ємно-ваговий дозатор (ОВ-9) відважують 120 кг бурякового жому меленого, (ОВ-10) 45 кг кукурудзяного екстракту, (ОВ-8) 5,4 кг кальцію хлористого, (ОВ-6) 12 кг натрію вуглекислого, (ОВ-6) 15,6 кг амонію фосфорнокислого двозаміщеного та (ОВ-6) 13,2 кг натрію фосфорнокислого однозаміщеного на через завантажувальний люк поміщають в реактор (Р-22) об'ємом 5 м³ та додають 4,8 м³ води питної, вмикають перемішуючий пристрій та проводять суспендування компонентів упродовж 5-10 хвилин.

Підготовлене нестерильне поживне середовище відцентровим насосом (Н-1) подається в установку безперервної стерилізації УБС-5 (У-31).

Таблиця 6.5

Розрахунок компонентів для приготування 6 м³ середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6 м ³ поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, м ³
Буряковий жом мелений	20	120	I	4,8
Кукурудзяний екстракт	7,4	45		
Кальцій хлористий	0,9	5,4		
Натрій вуглекислий	2,0	12		
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	2,6	15,6		
Натрій фосфорнокислий однозаміщений	2,2	13,2		
Вода, м ³		4,8		
Разом				4,8

Середовище надходить у колонку швидкісного нагріву, де пара інжектуює об'єм поживного середовища, надає йому обертний рух, що забезпечує гарне перемішування й рівномірне нагрівання до 130-150° С. Час перебування середовища в нагрівачі 1,5 – 2 с. Витримувач являє собою змійовик, що складається з декількох витків труби (9-12 витків, діаметром 89 мм, загальною довжиною 3,4 м). Об'єм витримувача забезпечує тривалість витримання при температурі 140 °С близько 2 хв. Для охолодження стерильного поживного середовища до 30-40 °С застосовують теплообмінник типу «труба в трубі» з діаметрами 76 і 133 мм і загальною поверхнею охолодження 20 м². Процес стерилізації поживного середовища здійснюється автоматично за заданим режимом за допомогою регулюючих приладів, до яких належать прилади контролю рівня середовища в приймачі, швидкості подачі середовища у витримувачі, тиску подачі насосом середовища й тиску

на виході з витримувача, тиск пари на регулюючому клапані установки. Регульованими параметрами є температура середовища в нагрівачі й тиск середовища на виході з витримувача.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Bacillus macerans* BS-04 зберігають у пробірках з скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) в холодильнику при температурі 2-4°C. Пересіви здійснюють кожні 2-3 місяці. Всі роботи з культурою *Bacillus macerans* BS-04 проводять в строго асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру *Bacillus macerans* BS-04, що зберігається у пробірках з скошеним МПА, розсівають петлею до ізольованих колоній *Bacillus macerans* BS-04 на чашки Петрі з МПА і вирощують в термостаті при 40°C упродовж 24 годин.

ТП 4.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії *Bacillus macerans* BS-04 за допомогою петлі (від ТП 4.2.) висівають на пробірки з скошеним МПА (одна ізольована колонія *Bacillus macerans* BS-04 використовується для засіву однієї пробірки) і вирощують в термостаті при 40°C протягом 24 годин.

ТП 4.4. Вирощування інокуляту в колбах з рідким поживним середовищем на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу *Bacillus macerans* BS-04 у колбу об'ємом 1000 мл із 300 мл розчину композиції I (від ДР 3.1.1) в асептичних умовах вносять 200 мл стерильного розчину композиції II (від ДР 3.1.2) та 100 мл стерильного розчину композиції III (від ДР 3.1.3), перемішують. Середовище розливають в полум'ї пальника у чотири стерильні колби на 750 мл (по 150 мл в кожную).

У пробірку з робочою культурою *Bacillus macerans* BS-04, вирощеною на МПА, вносять 3 мл фізіологічного розчину, проводять змив культури

(суспендують клітини), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять по 1 мл у кожен колбу з поживним середовищем.

Після вирощування бактерій у колбах на качалці (280 об/хв), тривалість процесу становить 24 год, при 40°C культуральну рідину переносять в засівну колбу об'ємом 1000 мл.

ТП 4.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10л

В інокулятор об'ємом 10 л (ФР-27) з дотриманням правил асептики вносять 3л композиції I (від ДР 3.2.1), 1,4л композиції II (від ДР 3.2.2) і 1л композиції III (від ДР 3.2.3) і посівний матеріал *Bacillus macerans* BS-04 з засівної колби (від ТП 4.4). Вирощування культури проводять упродовж 24 год при постійній подачі стисненого стерильного повітря (надлишковий тиск в апараті становить 0,02 МПа). Температурний режим – 40±2 °С (температуру підтримують подачею гарячої/холодної води в сорочку інокулятора). Швидкість перемішування становить 220 об/хв.

Кожні 8 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного і технологічного контролю (проводять аналіз на відсутність сторонньої мікробіоти та визначають концентрацію біомаси).

ТП 4.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокулятор об'ємом 100 л (ФР-28) з 33 л композиції II (від ДР 3.3.2) за допомогою насоса перекачують 15 л композиції II (від ДР 3.3.1) і через трубу перетиснення подають посівний матеріал *Bacillus macerans* BS-04 (від ТП 4.5).

Вирощування культури проводять упродовж 24 год при постійній подачі стисненого стерильного повітря (надлишковий тиск в апараті становить 0,02 МПа). Температурний режим – 40±2 °С (температуру підтримують подачею гарячої/холодної води в сорочку інокулятора). Швидкість перемішування становить 220 об/хв.

Кожні 8 годин відбирають проби для проведення мікробіологічного і технологічного контролю (проводять аналіз на відсутність сторонньої мікробіоти та визначають концентрацію біомаси).

ТП 4.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1 м³

В інокулятор об'ємом 1 м³ (ФР-29) з 330 л композиції II (від ДР 3.4.2) за допомогою насоса перекачують 150 л композиції II (від ДР 3.4.1) і через трубу перетиснення подають посівний матеріал *Bacillus macerans* BS-04 (від ТП 4.6).

Вирощування культури проводять упродовж 24 год за постійної подачі стисненого стерильного повітря (надлишковий тиск в апараті становить 0,02 МПа). Температурний режим – 40±2 °С (температуру підтримують подачею гарячої/холодної води в сорочку інокулятора). Швидкість перемішування становить 220 об/хв.

Кожні 8 годин відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного і технологічного контролю (проводять аналіз на відсутність сторонньої мікробіоти та визначають концентрацію біомаси).

ТП 5. Біосинтез у ферментері об'ємом 10 м³

ТП 5.1. Виробниче культивування

Виробниче культивування проводять у ферментері об'ємом 10 м³ (ФР-30). У попередньо простерилізований ферментер насосом перекачують простерилізоване в УБС-5 поживне середовище (від ДР 3.5.1) і через трубу перетиснення подають посівний матеріал *Bacillus macerans* BS-04 (від ТП 4.7). Культивування проводять упродовж 48 год при постійній подачі стисненого стерильного повітря (надлишковий тиск в апараті становить 0,02 МПа). Температурний режим – 40±2 °С (температуру підтримують подачею гарячої/холодної води в сорочку ферментера. Кожні 8 годин відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного і технологічного контролю (проводять аналіз на відсутність сторонньої мікробіоти та визначають концентрацію біомаси, полігалактуранази активність ферменту в культуральній рідині). У процесі виробничого культивування постійно контролюють і підтримують рівень рН (має становити 7,5). Процес проводять при постійному перемішуванні 220 об/хв.

Процес культивування завершують за досягнення в культуральній рідині полігалактураназної активності на рівні 15,1 од/мл. Культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-2) до збірника культуральної рідини для подальших процесів виділення та очистки пектинази.

РОЗДІЛ 7.

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Кожні 8 годин упродовж 48 годин культивування бактерій *Bacillus macerans* BS-04 відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та джерела вуглецю (полігалактуранової кислоти), джерела азоту (органічного та неорганічного) та активності ферменту (полігалактураназну активність).

Карту постадійного контролю біосинтезу пектолітичних ферментів наведено у табл. 7.1.

Відбір проби та пробопідготовка

Кожні 8 годин через пробовідбірник у стерильну колбу відбирають 200 мл культуральної рідини (проби).

3 колби в асептичних умовах відбирають пробу, в якій аналізують мікробіологічні показники шляхом мікроскопіювання та висіву на щільні поживні середовища (МПА – для визначення бактерій, сусло-агар – для визначення грибів, підрозділ 7.2).

10 мл культуральної рідини відбирають для аналізу концентрації біомаси (підрозділ 7.3.1).

100 мл культуральної рідини центрифугують при 5000 об/хв, у супернатанті аналізують активність пектолітичних ферментів (полігалактураназну активність, підрозділ 7.3.2), концентрацію галактуранової кислоти (джерела вуглецю), редукуючих речовин (джерела вуглецю), концентрацію органічних джерел азоту (підрозділ 7.3.3).

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 03.01.05 КР ПЗ			
Розроб.		Літовченко О.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Лім.	Арк.	Акрушів
Перевірив		Скрацька О.І.						
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ 64		

7.1. Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.2. Підготовка миючих засобів	Концентрація розчинів Новохлор-екстра, Саніфект та Стеріокс	Хімічний метод	Після приготування розчину	Згідно паспорта засобу
Кх.1,4,. Приготування 6% розчину HCl	Концентрація Хлоридної кислоти	Хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину	C=6%
Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E=80%
Кт 2.3. Компресування повітря	Стиснене повітря, Температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P=0,5 МПа, t=200 °C
Кт 2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря	Охолоджене повітря, температура повітря після видалення зайвої вологи, нагріте повітря, температура	Термометр технічний Психрометричний метод Термометр технічний	Після охолодження повітря Після видалення зайвої вологи Після нагрівання повітря	t = 25-40 °C W = 60 % t = 50 °C
Кт.2.5 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в головному фільтрі	E = 95%
Кт.2.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,99%

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.1.1., 3.2.1, 3.3.1.,3.4.1, 3.5.1. Приготуван- ня та стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, стерильність, рН	Манометр технічний, годинник, мікробіологічн ий контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, Т= 40 хв, Р = 0,05 МПа Відсутність мікробіоти.
Кт, Км 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2,3.4.2, 3.5.2 Приготуван- ня та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, стерильність рН	Манометр технічний, годинник, мікробіологічн ий контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, Т= 40хв, Р = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти.
Кт, Км 3.5.1. Приготуван- ня та стерилізація поживного середовища в УБС	Поживне середовище температура, час, стерильність	Манометр технічний, годинник, мікробіологічн ий контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 148 °С, Т= 1,5 год, Р = 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1. Підтриман- ня колекційної культури	Колекційна культура <i>Bacillus macerans</i> BS-04, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, мікробіологічн ий контроль	Під час підтримання колекційної культури	t = 2-4 °С Морфологічна однорідність, фізіологічна активність
Кт, Км. 4.2. Одержання робочої культури на агаризова- них середови- щах	Робоча культура <i>Bacillus macerans</i> BS-04, температура, мікробіологічна чистота культури, тривалість	Термометр технічний, годинник, мікробіологіч- ний контроль	Під час одержання робочої культури на агаризованих середовищах	t = 40±2 °С, Т = 24 год
Кт, Км. 4.3. Вирощуван- ня культури на агаризова- них середови- щах	Культура <i>Bacillus macerans</i> BS-04 у пробірках, температура, мікробіологічна чистота культури, тривалість	Термометр технічний, годинник, мікробіологічн ий контроль	Під час одержання культури на агаризованих середовищах у пробірках	t = 40±2 °С, Т = 24 год

1	2	3	4	5
Кт, Км 4.4. Вирощування інокуляту в колбах з рідким поживним середовищем на качалках	Інокулят, тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t = 40±2 °C T = 48 год, 180 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.5 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л	Інокулят, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	t = 40±2 °C T = 48 год, 220 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.6 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л	Інокулят, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	t = 40±2 °C T = 48 год, 220 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.7 Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1м ³	Інокулят, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	t = 40±2 °C T = 48 год, 220 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.1. Виробниче культивування	Культуральна рідина, тривалість культивування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, активність полігалактуранази	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, контроль активності полігалактуранази	Під час вирощування культури у ферментері, відбір проб кожні 8 годин	t = 40±2 °C T = 48 год, 220 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти, ПГа=15,1 од/мл.

7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль здійснюють для перевірки чистоти і фізіологічного стану культури *Bacillus macerans* BS-04, а також для виявлення сторонньої контамінації. Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, потім накривають накривним скельцем і розглядають під мікроскопом з об'єктивом 40х. Також необхідно провести мікроскопіювання препарату з імерсійною системою при збільненні на 90х.

Потім культуральну рідину розсівають петлею (методом виснажуючого штриха) до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій. У пробах, які були взяті на аналіз, повинні бути виявлені виключно клітини штаму *Bacillus macerans* BS-04.

За морфологічними ознаками бактерії *Bacillus macerans* BS-04 – це прямі паличкоподібні клітини, які мають розміри 2,0-5,0×0,9-1,0 мкм. Клітини рухливі, грампозитивні, зустрічаються у довгих чи коротких ланцюжках. Спори еліпсоїдальні, без екзоспориюму 2,0-2,4×1,0-1,2 мкм, розташовані центрально або субтермінально (рис. 7.1) [1].

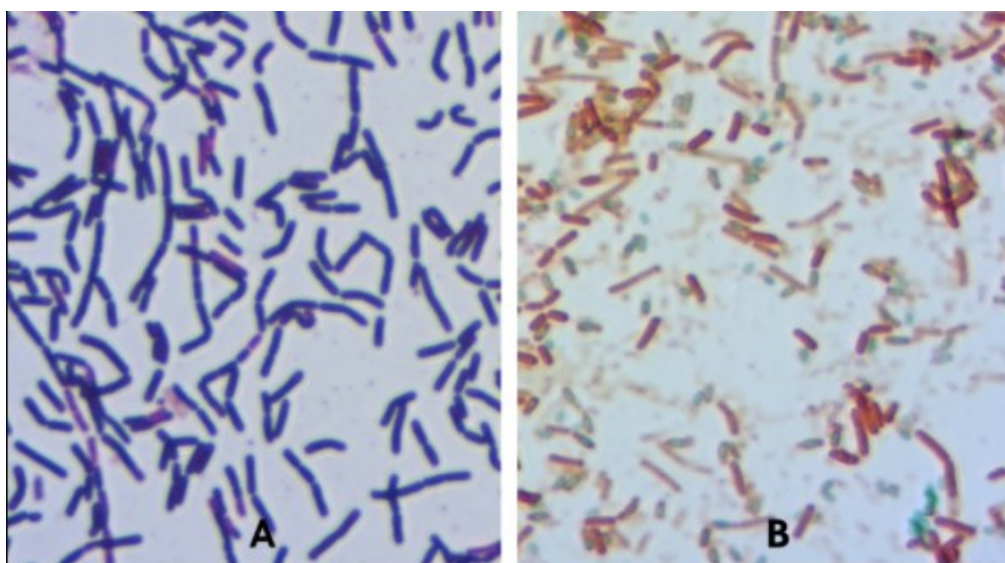


Рис. 7.1 Клітини *Bacillus macerans*:

А – фарбування за Грамом; Б – фарбування спор за методом Пешкова

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси *Bacillus macerans*

Визначення концентрації біомаси здійснюється з використанням датчика BE2100. За допомогою програмного забезпечення можна калібрувати датчик в будь-яких можливих одиницях. Більшість експериментальних методів, що потребують занурення датчика в ємкість і культуральну рідину, обмежені в діапазоні вимірювань росту біомаси. В датчику BE2100 використовується модернізований метод оптичного моніторингу, який лінійно визначає біомасу в широкому діапазоні. У ньому використовуються інфрачервоні промені і детектори. Промінь-детектор в матриці чутливий до різноманітних діапазонів зміни концентрації біомаси.

Вказаний датчик є безконтактним та високоточним. Він має наступні характеристики:

- широкий діапазон вимірювань – від 0,1 до 300 одиниць OD (оптична густина), що дозволяє здійснювати визначення концентрацій клітин будь-якого виду мікроорганізмів;
- постійне безперервне вимірювання в режимі реального часу;
- вимірювання проводиться через прозору стінку апарата чи скляний оглядовий люк, який прикріплюється до зовнішньої стінки апарата;
- за рахунок безконтактного вимірювання виключається ризик контамінації, а також датчик не потребує стерилізації.

Перевагою датчика є комбінування сигналів від кожної пари таким чином, що відповідь на зміну біомаси відбувається в широкому динамічному діапазоні.

Для визначення концентрації біомаси датчик розміщують ззовні на колбі з відібраною пробою. Результати вимірювання у режимі реального часу поступають на монітор [38].

7.3.2. Визначення активності ферменту пектинази

Для визначення екзополігалактуроназної активності використовують *метод йодометричного титрування* [39]. Концентрація ферменту в супернатанті культуральної рідини виражають в стандартних одиницях екзополігалактуроназної активності на 1 мл.

Суть методу

Метод заснований на обліку кількості прогідролізованих зв'язків у пектовій (галактуронової) кислоті, що розраховуються за збільшенням кінцевих альдегідних груп .

За одиницю екзополігалактуроназної активності прийнята така кількість ферменту, яка здатна каталізувати гідроліз 1,0 мкмоль еквіваленту глікозидних зв'язків у молекулі пектової кислоти за 1 хв при температурі 30 °С и значенні рН 4,0.

Підготовка до проведення аналізу

Приготування пектової кислоти (субстрат)

30,0 г бурякового пектину заливають 600 мл дистильованої води й залишають на ніч у холодильнику при температурі 4 °С для набрякання й розчинення. Потім при температурі 20 °С додають 300 мл 0,5 н розчину гідроокису натрію для повного розчинення пектину й зниження в'язкості розчину. Фільтрують на воронці Бюхнера через два шари марлі з прокладеною ватою. Далі додають до фільтрату ще 300 мл 0,5 н розчину гідроокису натрію й залишають для омилення на 1 год у холодильнику при температурі 4 °С. Через 1 год осаджують пектову кислоту 900 мл 0,5 н розчину соляної кислоти. Кислоту, що випала у осад, відразу віджимають через бязь, поміщають у склянку й додають 70%-вий етиловий спирт, ретельно перемішують до розчинення грудок і знову фільтрують на воронці Бюхнера через бязь. Далі продовжують промивати 50 мл 70%-вого етилового спирту, а потім 50 мл 96%-вого етилового спирту. Отриману промиту пектову кислоту сушать на повітрі при температурі 20 °С. Висушену кислоту

знімають із бязі й розтирають у ступці до одержання дрібнодисперсного порошку.

Приготування розчину пектової кислоти з масовою часткою 1,0% (субстрат)

1,0 г пектової кислоти в перерахуванні на абсолютно суху речовину всипають тонким струменем при безперервному перемішуванні в мірну колбу місткістю 100 мл, куди попередньо наливають 25 мл ацетатного буфера кислотністю 5,0 од. рН. Розчин безупинно перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв до повного розчинення. Після закінчення цього часу об'єм розчину доводять до 100 мл ацетатним буфером кислотністю 5,0 од. рН, ретельно перемішують і фільтрують через два шару марлі. Розчин пектової кислоти готують у день проведення аналізу.

Приготування розчину вуглекислого натрію молярної концентрації 1 моль/мл

106,0 г вуглекислого натрію розчиняють у склянці в невеликому об'ємі дистильованої води. Розчинену сіль переносять кількісно в мірну колбу місткістю 1000 мл і об'єм доводять до мітки дистильованою водою при температурі 20 °С.

Строк зберігання розчину вуглекислого натрію при температурі 20 °С – не більше 10 днів.

Приготування розчину сірчаної кислоти молярної концентрації 2 моль/дм

У мірну колбу місткістю 1 л вносять 108,6 мл концентрованої сірчаної кислоти, доливають близько 300 мл дистильованої води, доводять до мітки дистильованою водою при температурі 20 °С и перемішують.

Строк зберігання розчину сірчаної кислоти при температурі 20 °С - не більше 1 мес.

Приготування розчину крохмалю з масовою часткою 1,0%

1,00 г крохмалю в перерахуванні на абсолютно суху речовину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 25 мл дистильованої

води й перемішують. Потім додають у колбу ще 25 мл дистильованої води, поміщають колбу в киплячу водяну баню не менш ніж на 15-20 хв, безупинно перемішуючи вміст до повного розчинення крохмалю, об'єм рідини доводять до мітки дистильованою водою при температурі 20 °С і вміст колби перемішують. Для отриманого розчину крохмалю характерна легка опалесценція. Розчин крохмалю готують у день проведення аналізу.

Приготування розчину йоду молярною концентрацією 0,1 моль/л

25,0 г йодистого калію розчиняють у мірній колбі місткістю 1 л в 100 мл дистильованої води й туди ж вносять 12,70 г йоду. Після повного розчинення йоду об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою. Титр не встановлюють, але перевіряють по розчину гіпосульфиту. Молярна концентрація приготовленого розчину йоду повинна бути від 0,95 до 1,05 моль/л . Строк зберігання розчину в склянці з темного скла із притертою пробкою при температурі 20 °С - не більш 1 мес.

Приготування розчину тіосульфату натрію молярною концентрацією 0,05 моль/л

24,8 г тіосульфату натрію розчиняють у мірній колбі місткістю 1 л у невеликій кількості дистильованої води. Уміст колби перемішують і об'єм рідини доводять до мітки дистильованою водою. Титр установлюють по двухромовоокислому калію після витримання розчину протягом 15 діб. Строк зберігання розчину в склянці з темного скла із сифоном і бюреткою із хлоркальцієвою трубкою, заповненим натронним вапном при температурі 20 °С, - не більш 10 днів.

Проведення аналізу

В мірну колбу об'ємом 100 мл наливають 10 мл 1 %-ого розчину пектової кислоти. Розчин кладуть у термостат (температура 30 °С). Через 10 хв доливають у колбу 5 мл супернатанту культуральної рідини, ретельно перемішують і витримують у термостаті 30 хв (температура 30 °С).

Потім у колбу додають 1,8 мл розчину вуглекислого натрію у молярній концентрації 1,0 моль/л і 10 мл розчину йоду (молярна концентрація 0,1 моль/л). Розчин ретельно перемішують, закривають скляною пробкою і залишають у темному місці на 20 хв. Потім до реакційної суміші доливають 2,0 мл розчину сірчаної кислоти (молярна концентрація 2 моль/л). Отриманий розчин інтенсивно перемішують і відтитровують надлишок йоду розчином тіосульфату натрію (молярна концентрація 0,05 моль/л) з індикатором – 1,0 %м розчином крохмалю.

Як контроль використовують ту саму кількість реактивів, тільки розчин ферментного препарату вводять після додавання 1,8 мл розчину вуглекислого натрію, безпосередньо перед внесенням розчину йоду в молярній концентрації 0,1 моль/л .

Екзополігалактуроазну активність (Екзо-Пгс) в аналізованій пробі, обчислюють за формулою:

$$\text{Екзо} - \text{Пгс} = \frac{51,3 \cdot (\vartheta_1 - \vartheta_2)}{2t \cdot a} \cdot d$$

де: 51,3 – число мікроеквівалентів альдегідних груп, що відповідають 1 мл 0,1 н розчину йоду (або тіосульфату натрію);

ϑ_1, ϑ_2 – об'єм 0,05 н розчину тіосульфату натрію, який пішов на титрування контрольного (ϑ_1) і дослідного (ϑ_2) розчинів, мл ;

2 – коефіцієнт перерахування 0,05 н розчину тіосульфату натрію в 0,1 н розчин;

t – тривалість гідролізу 1,0%-ного розчину пектової кислоти, хв;

a – обсяг ферментного препарату, уведеного в реакційне середовище, мл;

d – густина для рідких концентрованих ферментних препаратів за ГОСТ 18481, г/мл (для супернатанту культуральної рідини можна прийняти за 1).

7.3.3 Визначення концентрації вуглецю і азоту

Оскільки основним джерелом вуглецю у середовищі є буряковий жом, а цільовий ферментний препарат діє на пектинові речовини субстрату і стандартизується за полігалактуринозною активністю, важливо контролювати вміст пектової (галактуринової) кислоти

Визначення концентрації пектової (галактуринової) кислоти

Суть методу: Спектрофотометричний метод заснований на реакціях взаємодії карбоксильних груп галактуринової кислоти з різними реагентами, зокрема, з карбазолом в присутності кислоти сірчаної.

Приготування спеціальних реактивів

Реактив сірчаної кислоти (РСК)

Для проведення колориметричної реакції застосовується сірчана кислота ($\rho = 1,64$) з добавками сечовини та борної кислоти. До 1 мл H_2SO_4 додають 3 мл сечовини і нагрівають у кварцевій колбі на електроплитці ($120\text{ }^\circ\text{C}$) 8 годин. Після охолодження до розчину додають 6 мл H_3BO_3 і нагрівають ще 3 години. Приготовлений таким чином розчин сірчаної кислоти називаємо реактивом сірчаної кислоти (РСК).

Так як перед проведенням реакції з вуглеводнем РСК повинен бути охолоджений до $0\text{ }^\circ\text{C}$, то рекомендується його тримати в холодильнику при даній температурі.

РСК придатний для аналізу, якщо при «холостому» досліді не утворюється забарвлення.

Очищення карбазолу і приготування робочого розчину

Карбазол очищають за допомогою сублімації: 1 мл карбазолу поміщають на дно склянки висотою 15-20 см. Стакан накривають чашкою Петрі і нагрівають на електричній плитці. Білі пластівці карбазолу осідають на верхніх стінках склянки і на дні колби. Очищений сублімацією карбазол розчиняють в етиловому спирті. Концентрація карбазолу в реактиві (розчин в етанолі) має бути 5 мг/мл.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка та розрахунку коефіцієнта пропорційності використовують розчин галактуранової кислоти (ГК). Наважку ГК масою 102 мг (бажано з точністю до 0,01 мг) розчиняють у воді в мірній колбі на 1000 мл і додають 0,5 мл 1н NaOH. Приготовлений розчин залишають на 11-13 годин. Цей розчин містить 100 мкг безводної D-галактуранової кислоти в 1 мл. Із цього вихідного розчину шляхом розведення готують серію розчинів з меншими концентраціями: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08 мг/мл.

Здійснення колориметричне реакції

Пробірку з 0,5 мл досліджуваного розчину поміщають на крижану баню. До неї доливають 0,25 мл спиртового розчину карбазолу, перемішують і повільно при перемішуванні доливають 5,5 мл РСК, який має бути охолоджений до 0°C. Після перемішування розчин має бути безбарвним або світло-жовтим.

Таким же чином готують холостий розчин, де в суміш замість розчину карбазолу доливають 0,25 мл етанолу.

Пробірки з розчинами нагрівають на киплячій водяній бані 20 хв. До кімнатної температури охолоджувати розчини найзручніше в проточній водопровідній воді.

Вимірювання оптичної густини

Оптична густина (I) забарвлених розчинів вимірюється в точках 420 і 490 нм на будь-якому спектрофотометрі. Товщина шару поглинання $L = 1$ см.

Так як вимірюються оптичні густини в точках високочастотного крила (короткохвильового) смуги поглинання, то необхідно контролювати калібрування приладу по довжинах хвиль. Зсув аналітичних точок за шкалою довжин хвиль може привести до суттєвих помилок. Так як для різних приладів можливо розбіжність по цій шкалі, то рекомендується калібрувальну пряму будувати для конкретного приладу, на якому проводяться вимірювання.

Визначення коефіцієнта пропорційності $K_{зк}$

З вихідного розчину ГК розведенням готують 8-10 розчинів з різною масовою часткою ГК (крок – 10 мкг/мл). Отримані забарвлені розчини підкоряються закону Ламберта-Бера, калібрувальна пряма з нахилом ($\text{tg } \alpha = K_{зк}$) і осі абсцис.

Коефіцієнт пропорційності розраховується, виходячи з математичного виразу основного закону світлопоглинання:

$$D = K \cdot C \cdot l,$$

де K – коефіцієнт пропорційності (розмірність в нашому випадку $\text{мг} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

C – концентрація ГК в розчині ($\text{мг} / \text{мл}$);

l – товщина поглинаючого шару (см).

$$K_{зк} = \Delta D / C l, \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{см}^{-1},$$

де ΔD – різниця оптичної густини при 490 і 420 нм.

Формула для визначення вмісту ГК в досліджуваному розчині:

$$X = a_{\text{мкг/мл}} \cdot 100 \text{ мл} / (P_{\text{гр}} \cdot 10^6)_{\text{мкг}} \cdot 100\%,$$

де $a_{\text{мкг/мл}}$ – вміст галактуронової кислоти, що відповідає оптичній густини;

$P_{\text{гр}}$ – (гр) маса наважки [40].

Визначення кількості редукуючих цукрів методом Шомоді-Нельсона

У поживному середовищі наявний також багаті на вуглеводи (редуючі цукри) кукурудзяний екстракт (є джерелом вуглецю і органічного азоту).

2. Приготування розчину Шомоді

2.1. Розчин Шомоді являє собою суміш трьох розчинів: А, Б і В.

2.2. Щоб приготувати розчин А необхідно 10 г сірчанокислої міді розчинити в 90 мл дистильованої води.

2.3. Для приготування розчину Б 24 г натрію вуглекислого безводного і 12 г калію-натрію виннокислого розчиняють в 250 мл дистильованої води, з при перемішуванні послідовно вносять 40 мл розчину А і 16 г кислого вуглекислого натрію.

2.4. Для приготування розчину В 18 г сірчаноокислого безводного натрію розчиняють в 500 мл гарячої дистильованої води і кип'ячать протягом 40 хв на електроплитці. Розчин охолоджують до кімнатної температури.

2.5. Розчини Б і В змішують і доводять об'єм дистильованою водою до 1000 мл в мірному циліндрі. Якщо утворюється осад, його фільтрують. Готовий розчин Шомоді зберігають в ємності з темного скла в захищеному від світла місці.

3. Приготування розчину Нельсона

3.1. Розчин Нельсона є сумішшю двох розчинів: Г і Д.

3.2. Для приготування розчину Г 3 г мишьяковокислий натрію розчиняють в 25 мл дистильованої води.

3.3. Для приготування розчину Д 25 г молібденовокислого амонію розчиняють в 450 мл дистильованої води.

3.4. Перемішуючи, до розчину Д додають 21 мл концентрованої сірчаної кислоти, розчин Г.

Розчин Нельсона витримують в термостаті при температурі 55 °С протягом (25 ± 1) хв.

Готовий розчин Нельсона зберігають в ємності з темного скла в захищеному від світла місці.

4. Визначення цукрів

4.1. Визначення цукрів проводять на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 0,508 м.

4.2. Для визначення цукрів готують дослідний розчин. Для цього відбирають 1 мл фільтрату культуральної рідини. До нього доливають 1 мл розчину Шомоді і кип'ячать 15 хв на водяній бані. Потім суміш швидко охолоджують на крижаній бані. До 2 мл цієї суміші додають 1 мл розчину

Нельсона і доводять об'єм дистильованою водою до 10 мл. Розчин ретельно перемішують.

4.3. Контрольний розчин готують, замінюючи фільтрат дистильованою водою.

4.4. При оптичної густини розчину вище 0,5 визначення повторюють з більшим розведенням.

4.5. Кількість цукрів визначають по калібрувальній кривій, побудованій за розчином глюкози [41].

Визначення концентрації азоту

Як джерела азоту в середовищі культивування *Bacillus macerans* BS-04 використовують кукурудзяний екстракт (білок 11-13 %) та буряковий жом (білок – 8 %).

Визначення концентрації амінного азоту по методу Попа і Стівенса (мідний спосіб)

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні сполуки з міддю. Далі визначають кількість міді, яка вступила у реакцію за допомогою йодометричного титрування.

Хід визначення. В мірну колбу об'ємом 50 мл піпеткою вносять 5 мл супернатанту культуральної рідини, додають 3-4 краплини індикатору тимолфталейну і по краплям розчин гідроксиду натрію у концентрації 0,1 моль/дм³ до появи світло-блакитного забарвлення. До слаболужного розчину при перемішуванні порціями обережно доливають 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, добавляють 0,5 мл 80%-ої оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію

(концентрація 0,01 моль/дм³). 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 визначають шляхом множення на 0,28 маси тіосульфату натрію, що пішов на титрування. З урахуванням розчинення це відповідає 1 мл культуральної рідини. Вміст амінного азоту розраховують за наступною формулою:

$$X=(a \cdot 0,28 \cdot b \cdot 10 \cdot 100) / 50 \text{ мг в } 100 \text{ мл культуральної рідини,}$$

де а – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/дм³, витраченого на титрування, мл;

б – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, мл [42].

ЛІТЕРАТУРА

1. Патент RU (11) 2 272 838(13) С1. Бравова Г.Б. и др. Штамм бактерий *Bacillus macerans* BS-04 – продуцент пектиназ, протеазы, ксиланазы и амилазы. – 2004.
2. Бравова Г.Б. та ін. АС СССР №1349250. *Bacillus circulans* шт.31 ЦМПМ В-1741 – продуцент мацерируючих ферментов, 1985 г.
3. Ларіна Л.Н., Патент РФ №2072691 Штамм бактерий *Bacillus circulans* – продуцент комплекса пектолитических ферментов и ксиланазы. – 1994 г.
4. АС СССР №1162224 Штамм *Bacillus macerans* ЦМПМ В-2692 – продуцент пектолитических ферментов, 1984 г.
5. Гусаков А.В., Марков А.В., Гришутин С.Г., Семенова М.В., Кондратьев Е.Г., Синицын А.П. Бискозиметрический метод определения общей эндополимеразной активности пектиназ // Москва, Биохимия, 2002 т. 67 № 6 с. 815-822.
6. Дадашев М.Н., Вагидов Я.А., Шихнебиев Д.А., Балиева Ж.С. Перспективы производства и применения пектиновых веществ. // Хранение и переработка с/х сырья, №9,2000,с.46-50.
7. KEGG PATHWAY Database [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
8. Харчова хімія: тексти лекцій для студ. напр. підготовки 6.051701 "Харчові технології та інженерія" / уклад.: О. Л. Гуменюк. – Чернігів : ЧДТУ, 2013. – 244 с.
9. Біотехнологічні прийоми при виробництві вина [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://dspace.pdaa.edu.ua:8080/bitstream/123456789/3781/1/Біотехнологічі%20прийоми%20при%20виробництві%20вина.pdf>

10. Успішні українські винороби. Куди їхати по червоне, біле і рожеве? [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.epravda.com.ua/projects/wine/2018/10/30/642093/>

11. Виноробство: ферменти [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://basic-ingredients.com.ua/winemaking-enzymes.html>

12. Кайнаш А.П. Біотехнологічні прийоми при виробництві вина. 2. Перспективи розвитку біотехнології [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://dspace.pdaa.edu.ua:8080/bitstream/123456789/3781/1/%D0%91%D1%96%D0%BE%D1%82%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%87%D1%96%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%D0%B9%D0%BE%D0%BC%D0%B8%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%20%D0%B2%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%BD%D0%B8%D1%86%D1%82%D0%B2%D1%96%20%D0%B2%D0%B8%D0%BD%D0%B0.pdf>

13. Офіційний сайт заводу препаратів мікробного синтезу «Ензим». Сторінка із даними по пектолітичному ферментному препарату Пектолад [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://enzim.biz/index.php?lng=ua&page=pectinase>

14. Пектолитические ферменты Enartis 1000S для увеличения выхода сока и ускорения осветления (1-2гр/100л), 2грамма [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://garden-ua.com/shop/goods-for-wine/enzyme-preparations/pectolytic-enzyme-1000s/>

15. Ферментный препарат для осветления методом флотации Enartis Zym QUICK [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://garden-ua.com/shop/goods-for-wine/enzyme-preparations/enartis-zym-quick/>

16. Фермент Lallzyme HC (1г.) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.shop-vine.com/product/ferment-lallzyme-hc/>

17. Фермент "Lallzyme Cuvee Blanc" 10 гр [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://dobrovar-shop.ru/oborudovanie-dlya-vinodeliya/ingredienty/ferment-lallzyme-cuvee-blanc-10-gr/>

-
18. Ферментные препараты Novozymes для соковой промышленности/амилаза, пектиназа [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://basic-ingredients.all.biz/fermentnye-preparaty-novozymes-dlya-sokovoj-g17882526>
19. Виноробство: Ферменты [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://basic-ingredients.com.ua/winemaking-enzymes.html>
20. Укрінформ [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.ukrinform.ua/rubric-economy/2857065-v-ukraini-pererobka-vinogradu-zmensilas-udvici.html>
21. https://www.lamothe-abiet.com/images/stories/telechargement/Fiches-techniques/FT-Anglais/FT_EN_VINOZYM_VINTAGE_FCE.pdf
22. Промышленные ферментеры [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://bio-rus.ru/oborudovanie/fermenteryi-i-bioreaktoryi/promyishlennyye-fermenteryi-i-bioreaktoryi-biorus%C2%AE/promyishlennyye-fermenteryi.html>
23. Настенные кислотостойкие воздуховыпускные устройства WSQ-K [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.vozduhovod-alnor.ru/assets/files/produkty-pliki-do-pobrania/RU/WSQ-K-RU-Steinless-steel-wall-exhaust-grille.pdf>
24. KRAFTMANN VEGA [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://www.ks-ekb.ru/vintovye_kompressory/kraftmann_vega/
25. Охладитель сжатого воздуха AFR 11 [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://tgko.ru/spravka/krio/?mark=12110>
26. Воздушный вертикальный ресивер РВ 500.11.00 [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://letiss.com.ua/aircast-remeza-resiveri/vozdushniy_vertikalniy_resiver_rv_500_1100
27. ВЕКОТЕХ Фильтры воздушные [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://vecotech.com.ua/component/content/article/11-proizvodstvo/251-air-filtri.html>

28. Оснос С.П. Фильтры на основе базальтовых волокон. Применение базальтовых волокон для фильтров промышленных и городских отходов [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://basaltfm.com/ru/articles/article04.html>

29. Требования к организации производственной лаборатории. // Свириденко Г.М., Захарова М.Б., Матевосян. – ВНИИ. – [Электронный ресурс] / Режим доступа до сайту: http://dairynews.ru/news/trebovanija_k_organizacii_proizvodstvennoj_laborat.html

30. Горжеєв В.М. порівняльна характеристика дезінфікуючих засобів // Ветеринарна медицина. – 2013. – Вип. 97. – С. 180-181.

31. Види миючих засобів [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://medbib.in.ua/vidyi-moyuschih-sredstv.html>

32. Новохлор-екстра [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://uk.interdez.com.ua/product/novohlor-ekstra>

33. Саніфект [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://uk.interdez.com.ua/product/dezinficiruyushee-sredstvo-saniffekt-interdez-kyev>

34. Стеріокс [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://biosan.kiev.ua/ua/preparati_dlja_dezinfekcii/sterioks.html

35. Фан – універсальний багатофункціональний дезінфекційний засіб [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://uk.interdez.com.ua/press/fan-universalnij-bagatofunktsionalnij-dezinfektsijnij-zasib.html>

36. Миющий дезінфікуючий засіб сокрена [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/ua/catalog_item?attr_id=1410

37. Санікон дезінфекційний засіб для поверхонь [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.propecs.ua/product/sanikon-dezinfekcijnyj-zasib-dlya-poverhon/>

38. BE2100-датчик определения оптической плотности биомассы [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.abtek.ru/products/sensors/328-datchik-opredeleniya-opticheskoy-plotnosti-biomassy-be2100-4>

39. ГОСТ Р 55298-2012 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения пектолитической активности [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200100980>

40. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах / Ю.С. Оводов // Биоорган. химия. – 2009.– Т.5, № 3. – С. 293–310.

41. Харчова мікробіологія: Лабор. практикум для студ / Г.В. Козловська. – К.: НУБіП, 2010. – 48 с.

42. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства»/ Укладачі: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К.: НУХТ, 2011. – 53 с.