

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра промислової біотехнології**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

**Дипломний проєкт**

**на здобуття ступеня бакалавра**

**за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»**

**спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**на тему: «Технологія виробництва кормового ферментного препарату.  
Дільниця біосинтезу продукту»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-71

Нагорна Олена Сергіївна \_\_\_\_\_

Керівник:

Завідувач кафедри промислової біотехнології, д.т.н., доц.

Тодосійчук Тетяна Сергіївна \_\_\_\_\_

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення  
технологічного процесу:

Доцент кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н., доц.

Шибецький Владислав Юрійович \_\_\_\_\_

Рецензент:

Професор кафедри екобіотехнології та біоенергетики, д.т.н., проф.

Саблій Лариса Андріївна \_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цьому дипломному  
проєкті немає запозичень з праць інших  
авторів без відповідних посилань.

Студентка \_\_\_\_\_

Київ – 2021 року



**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«1» березня 2021 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на дипломний проєкт студенту**

**Нагорній Олені Сергіївні**

1. Тема проєкту «Технологія виробництва кормового ферментного препарату. Дільниця біосинтезу продукту», керівник проєкту Тодосійчук Тетяна Сергіївна, д.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2021 р. № 1243- с
2. Термін подання студентом проєкту 10.06.2021 р.
3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Streptomyces albus* 2435/M; ферментер для промислового культивування – об'єм 3 м<sup>3</sup>; параметри культивування:  $t = 28 \pm 1$  °C, аерація,  $\tau = 72$  год; кінцевий продукт – кормовий ферментний препарат в поліетиленових пакетах по 1 кг.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва кормового ферментного препарату; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибецький В.Ю., доцент каф. біотехніки та інженерії.		

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.03.21-10.03.21	
2.	Біохімічні основи виробництва	11.03.21-25.03.21	
3.	Технологічна схема(проект на А4 – принциповий перелік стадій)	26.03.21-11.04.21	
4.	Апаратурна схема(проект на А4 – схематичний перелік обладнання)	12.04.21-20.04.21	
5.	Методи отримання промислових продуцентів	20.04.21-30.04.21	
6.	Технологічна частина	30.04.21-20.05.21	
7.	Технологічна схема(креслення)	30.04.21-20.05.21	
8.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	21.05.21-25.05.21	
9.	Апаратурна схема(креслення)	21.05.21-25.05.21	
10.	Оформлення пояснювальної записки	26.05.21-30.05.21	
11.	Подання дипломного проекту на рецензування	31.05.21-05.06.21	
12.	Подання готової роботи та рецензії до екзаменаційної комісії	До 10.06.21	

Студент

Олена НАГОРНА

Керівник

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

**Пояснювальна записка**  
**до дипломного проєкту**  
**на тему: «Технологія виробництва кормового**  
**ферментного препарату. Дільниця біосинтезу**  
**продукту»**

## РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить 82 ст., 12 рисунків, 9 таблиць, 3 креслення та 52 посилання.

Метою роботи є розробка технології виробництва кормового ферментного препарату, що містить комплекс гідролітичних ферментів та призначений для додавання у корми сільськогосподарських тварин для підвищення їх поживної цінності. З метою підвищення біосинтетичної активності продуцента *Streptomyces albus* запропоновано використання комбінації хімічного та фізичного мутагену.

На основі аналізу літератури щодо досліджень продуцента ферментного препарату *Streptomyces albus* було підібрано поживне середовища для процесу біосинтезу, а також умови, в яких відбувається максимальний синтез продукту.

Було проаналізовано фізіолого-біохімічні характеристики продуцента та визначено, що для синтезу продукту важливими аспектами є аерація та перемішування культуральної рідини. Було розроблено технологічну та апаратурну схему отримання продукту, які включають основні стадії виробничого процесу, а також наведено креслення загального виду ферментеру, який був розрахований та обраний у проєкті.

Запропоновані рішення дозволили спроектувати виробництво кормового ферментного препарату у вигляді нестерильного порошку, запакованого у поліетиленові пакети по 1 кг.

ФЕРМЕНТИ, STREPTOMYCES ALBUS, КОРМОВИЙ ПРЕПАРАТ, БІОСИНТЕЗ, ГІДРОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ, ПОЖИВНА ЦІННІСТЬ.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Нагорна О.С.			<i>РЕФЕРАТ</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.							6	82
Керівник		Тодосійчук Т.С.				НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ		
Затвер.								

## ABSTRACT

Diploma project contains: 82 articles, 12 figures, 9 tables, 3 drawings, 52 references.

The main goal of this project is the development of technology for the production of animal feed enzyme preparation, which contains hydrolytic enzyme complex and intended for addition to feed of farm animals. *Streptomyces albus* is a microorganism that it was selected for enzyme biosynthesis. The activity of biosynthesis was increased by chemical and physics mutagenesis.

Based on the research of the enzyme preparation producer, the literature was analyzed and the nutrient medium for the biosynthesis process was selected, as well as the conditions in which *Streptomyces albus* grows and synthesizes enzymes. Since the final product is not sterile, it was chosen to filtrate it with a filter press.

All physiological and biochemical characteristics of the producer were analyzed and it was determined that aeration and mixing of the culture fluid are important aspects for its growth and product synthesis. Analyzing all the data, an apparatus was chosen - a fermenter for the biosynthesis process, which contains a mixing device and a gas bubbler. A technological and hardware scheme for obtaining the product was developed, which includes the main stages of the production process, as well as a drawing of a general view of the fermenter, the dimensions of which were previously calculated.

Using all the above methods, a feed enzyme preparation was obtained in the form of a non-sterile powder packed in 1 kg, which can be used as a feed additive to increase its nutritional value.

ENZYMES, STREPTOMYCES ALBUS, FEED PREPARATION, BIOSYNTHESIS, HYDROLYTIC ENZYMES, NUTRITIONAL VALUE.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Нагорна О.С.				<i>ABSTRACT</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.							7	82
Керівник	Тодосійчук Т.С.					НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ		
Затвер.								

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ .....	10
ВСТУП .....	11
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА .....	13
1.1 Основні промислові продуценти .....	13
1.2 Систематичне положення .....	15
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки .....	16
1.4 Культуральні ознаки .....	17
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки .....	19
1.6 Поширення в природі .....	20
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА .....	21
2.1 Характеристика кінцевого продукту .....	21
2.2 Схема хімічних перетворень .....	23
2.3 Характеристика компонентного складу .....	26
2.4 Методи очистки цільового продукту .....	26
2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси .....	31
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ .....	34
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту .....	34
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового штаму .....	37
3.3 Схема отримання продуцента що використовується в роботі .....	39

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Нагорна О.С.				<i>ЗМІСТ</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.							8	82
Керівник	Тодосійчук Т.С.				НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ			
Затвер.								

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	41
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	41
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	42
4.3 Опис технологічного процесу.....	47
4.4 Матеріальний баланс.....	54
4.5 Контроль виробництва.....	55
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	60
5.1 Обґрунтування обраної конструкції.....	60
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	65
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання.....	73
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	75
ВИСНОВКИ.....	77
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	78

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

ПМ – посівний матеріал;

ПС – поживне середовище;

КР – культуральна рідина;

МНС – N-метил-N-нітрозометилсечовина;

ФБ – фосфатний буфер.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Нагорна О.С.						10	82
Конс.						<b>НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ</b>		
Керівник	Тодосійчук Т.С.							
Затвер.								

## ВСТУП

Якісну продукцію тваринництва забезпечують такі фактори, як високопродуктивні породи, збалансоване харчування та умови утримання тварин. Останнім часом, все більше значення надають підвищенню ефективності годування з використанням ферментів мікробного походження.

Мікробні ферментні препарати характеризуються найширшим спектром використання. Це спричинено тим, що вони можуть бути продуковані у великих кількостях, а їх виробництво є контрольованим та екологічно безпечним. Генетична різноманітність мікроорганізмів дозволяє отримувати ферментні препарати з широким діапазоном специфічності. На даний час мікробні ферментні препарати все частіше заміняють хімічні речовини в різних галузях, в тому числі й у тваринництві [1].

Кормові ферментні препарати як правило є багатокомпонентними і здатні розщеплювати рідкі складні сполуки, підвищуючи поживну цінність корму. Вони використовуються в усіх країнах, в яких поширене сільське господарство, в тому числі й в Україні. Згідно з дослідженням Abercade Consulting, глобальний ринок кормових ферментних препаратів щорічно збільшується на 10%, а європейський – на 3,5%. Найбільш широко ферментні препарати використовують у Великобританії, де до 90% комбікормів додають ферментні препарати. Також їх застосовують у Швеції, Іспанії, Норвегії, Фінляндії [2].

Найбільшими виробниками ферментних препаратів для тваринництва в Україні є «ENZIM BIOTECH Feeds» та Компанія “БТУ-Центр”, але вони забезпечують продукцією лише на 10%, усі інші препарати імпортують з інших країн. Продукування кормових ферментних препаратів у нашій державі є одним з пріоритетних напрямків згідно стратегії модернізації промисловості для забезпечення усіх потреб господарств [3,4].

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Нагорна О.С.						11	60
Конс.								
Керівник	Тодосійчук Т.С.					НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ		
Затвер.								

Метою даного проєкту є розробка технології виробництва кормового ферментного препарату з вмістом гідролітичних ензимів, що будуть мати високу активність та розщеплювати складні сполуки кормів, підвищуючи його поживну цінність.

Для досягнення поставленої мети необхідно виконати такі завдання:

- На основі аналізу літератури обрати мікробний продуцент гідролітичних ферментів, який буде оптимальним для біосинтезу цільового продукту та дослідити його характеристику
- Встановити біохімічні основи виробництва, компонентний склад та методи очистки цільового продукту.
- Проаналізувати методи підвищення продуктивності мікробних продуцентів та запропонувати схему селекції штаму-продуценту.
- Розробити апаратурну та технологічну схему виробництва кормового ферментного препарату
- Обґрунтувати вибір обладнання, що буде використовуватись на стадії біосинтезу цільового продукту та розрахувати його параметри,

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

### 1.1 Основні промислові продуценти

Серед продуктів біотехнології одними із важливих є ферментні препарати. Вони використовуються у багатьох галузях, таких як: харчова, фармацевтична, текстильна та інші промисловості, а також у сільському господарстві. Не так давно, почали використовувати кормові ферментні препарати, які містять в своєму складі гідролітичні ферменти, які здатні розщеплювати високомолекулярні сполуки до низькомолекулярних, що краще засвоюються.

Існує багато мікроорганізмів, які здатні продукувати гідролітичні ферменти, такі як протеази (розщеплюють білки), амілази (розщеплюють вуглеводи), ліпази (розщеплюють жири). Серед них представники роду *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Fusarium* та ін.

Через здатність розщеплення рослинних субстратів, ензимні препарати почали використовувати у тваринництві для покращення травлення у тварин, а також підвищення поживної цінності корму. У таблиці 1.1 наведено основні роди мікроорганізмів, що використовуються для виробництва гідролітичних ферментів, які використовують у тваринництві.

В Україні також виробляють кормові ферментні препарати, отримані шляхом мікробного синтезу. «ENZIM BIOTECH Feeds» випускає ферментний препарат фітази “Ладозим Прокси”, що здатен розщеплювати фітати з вивільненням фосфору. Продуцентами препарату є *Aspergillus niger* та *Escherichia coli*. Інший моноензимний ендоксилазний препарат цього ж виробника “Ксилолад”, синтезований *A. niger*, *Aspergillus oryzae* гідролізує арабіноксилани у зернових культурах та підвищує засвоюваність кормів вівса, ячменю тощо. Комплексний препарат кислих, нейтральних та лужних протеїназ

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Нагорна О.С.						13	82
Конс.								
Керівник	Тодосійчук Т.С.					НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ		
Затвер.								

“Проторизин” дозволяє використовувати його в широкому діапазоні рН та забезпечує високий ступінь гідролізу та перетравлювання протеїнів кормів [2]. Компанія “БТУ-Центр” виробляє препарат “Мацеразу” – кормову добавку на основі пектинліази, β-глюканази, ксиланази, що гідролізують рослинні некрохмальні полісахариди.

Таблиця 1.1 – Мікроорганізми-продуценти ферментів гідролітичної дії, які використовуються у тваринництві [1].

Фермент(ы)	Продуцент(ы)
Целлюлаза	<i>Aspergillus aculeatus</i>
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	<i>T. reesei</i>
Ксиланаза	<i>A. oryzae</i>
	<i>T. longibrachiatum</i>
	<i>T. longibrachiatum</i>
	<i>T. reesei</i>
β-глюканаза	<i>T. longibrachiatum</i>
Целлюлаза	<i>A. niger</i>
Ксиланаза	<i>A. niger</i>
	<i>P. funiculosum</i>
	<i>T. longibrachiatum</i>
Целлюлаза	<i>T. longibrachiatum</i>
β-глюканаза	<i>T. longibrachiatum</i>
Ксиланаза	<i>T. reesei</i> и <i>A. niger</i>
	<i>T. reesei</i> и <i>A. niger</i>
	<i>T. viride</i>
Целлюлаза	<i>T. longibrachiatum</i>
Протеаза	

Також існують зарубіжні ферментні препарати, які є мультиензимними за своїм складом. Ферментний препарат «Натузим®» (BIOPROTON) містить у своєму складі комплекс ензимів (пектиназа, целлюлаза, ксиланаза, β-глюконаза, α-амілаза, протеаза, фітаза та інші), які продукуються *Trichoderma longibrachiatum*, *Bacillus subtilis*, *A.niger* та значно покращує засвоюваність кормів та травлення. «Roxazyme» (DSM, Parsippany, NJ.) – кормова добавка, що здатна вивільняти некрохмалисті поживні речовини в результаті дії ензимів з *T.reesei* [1].

Перспективними продуцентами багатьох гідролітичних ферментів є два нові штами бактерій *B. subtilis* *ТНП-3* та *ТНП-5*, що використовуються для

					ДП 7115. 00.000 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

отримання препарату Бактисубтіл, а на основі двох інших штамів *B. subtilis* розроблений препарат Ендоспорін. Обидва застосовуються у ветеринарній галузі.

Стрептоміцети також є активними продуцентами комплексу гідролітичних ферментів. Серед мікроорганізмів-продуцентів гідролітичних ензимів відомі такі види *Streptomyces* – *S. bradia*, *S. griseus*, *S. fradiospiralis*. Не так давно були виділені нові культури стрептоміцетів, які здатні синтезувати лужні протеази. Серед них такі види *Streptomyces*: *S. ambofaciens*, *S. albolongus*, *S. aburaviensis* та *S. pulverescens* [5].

Однією із мікробних культур, що відома як продуцент лізоензимного комплексу, є актиноміцет *Streptomyces albus*. Достатньо вивчені властивості ферментного комплексу та вмісту у ньому великої кількості протеолітичних ензимів, а також визначені потенційні сфери застосування показали, що даний біологічний агент може використовуватись як продуцент кормового ферментного препарату [5, 6].

## 1.2. Систематичне положення продуценту

Царство: Bacteria ;

Тип: Actinobacteria ;

Клас: Actinobacteria ;

Порядок: Actinobacteridae ;

Ряд: Actinomycetales ;

Родина : Streptomycetaceae ;

Рід: Streptomyces ;

Вид: Streptomyces albus .

Згідно класифікації по Берджі *Streptomyces albus* відноситься до 25 групи: “Стрептоміцети та близькі роди”. Категорія – грам-позитивні еубактерії [7].

					ДП 7115. 00.000 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### 1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Стрептоміцети є грам-позитивними бактеріями, що здатні утворювати міцелій, який наведений на рис.1.1. При рості на щільних середовищах утворюють 2 види міцелію: повітряний та субстратний. Розмножуються спорами, які утворюються на вершинах гіф. В різних ділянках спори виростає від 1 до 4 гіф. Вони подовжуються та розростаються в міцелій, з якого утворюються компактні щільні колонії. Такий міцелій називається субстратним або первинним. На поверхні колонії утворюється повітряний, пухкий вторинний міцелій. Його гіфи покриті гідрофобним чохлам. Спори утворюються тільки на повітряному міцелії шляхом фрагментації. Спочатку відбувається реплікація нуклеоїдів і вони рівномірно розподіляються вздовж гіфів, після чого цитоплазма відокремлюється, а кожен фрагмент покривається цитоплазматичною мембраною. Так утворюються проспори, які покриваються вторинною оболонкою, перетворюючись на зрілі спори [8,9].



Рисунок 1.1 – Міцелій *Streptomyces albus*.

Спори утворюються на поверхні гіфа за допомогою апікальних клітин. Вони також називаються спорогенними клітинами. Розмежування верхівкової клітини від субапікального стебла відбувається за допомогою базальної перегородки. Формування даної перегородки є ключовим у процесі розвитку, що

					ДП 7115. 00.000 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

дозволяє експресувати гени розвитку в апікальній клітині або в субапікальному відділі стовбура (рис.1.2).

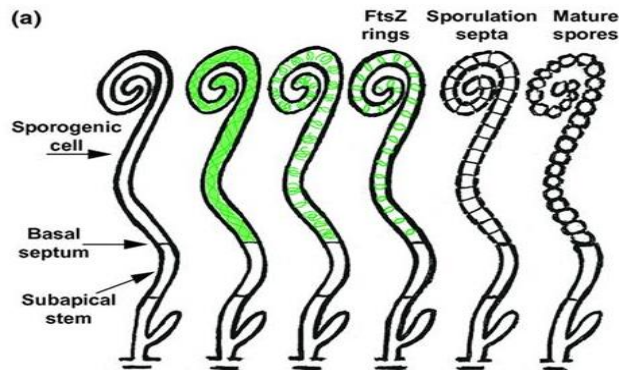


Рисунок 1.2 – Утворення спор у *Streptomyces albus* [10].

Базальна перегородка відмежовує спорогенну клітину від основної клітини. В результаті утворюються кільця, після чого відбувається синхронний поділ нитки, що призводить до відокремлення спор [10].

#### 1.4. Культуральні ознаки

*S. albus* утворюють колонії круглої форми (рис.1.3). Їх поверхня не є гладкою, а зморшкувата. Стрептоміцети поділяються на дві групи. Перші, при рості на поживному середовищі, не утворюють пігменти. Актиноміцети другої групи містять пігменти різних кольорів. Рід *Streptomyces* відноситься до другої групи та утворює на середовищі гліцерин-нітратний агар субстратний міцелій темно-бурого кольору, а повітряний міцелій – сірий з різними відтінками. Меланоїдні пігменти не утворює [11].

В залежності від віку, колонії можуть змінюватись. Молоді колонії мають гладеньке покриття. Коли у стрептоміцетів починається процес утворення спор, колонії набувають зморшкуватого вигляду [12].

Зі зміною складу поживного середовища, колонії можуть синтезувати різні пігменти, тому колір може змінюватись. Зміна кольору та міцелію за середовищем культивування наведена у таблиці 1.2.

					ДП 7115. 00.000 ПЗ	Арк.
						17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



Рисунок 1.3 – Колонії *Streptomyces albus* [13].

Таблиця 1.2 – Залежність кольору повітряного та субстратного міцелію від середовища культивування [14].

Середовище культивування	Характер росту	Повітряний міцелій	Субстратний міцелій	Розчинний пігмент
Агар Чапека	задовільний	блідо-білий	безбарвний	немає
Вівсяний агар	дуже добрий	білий	безбарвний	немає
Мінеральний агар Гаузе	добрий	білий	безбарвний	немає
Органічний агар Гаузе	дуже добрий	білий до кремового	безбарвний	немає
Глюкозо-аспарагіновий агар	задовільний	світло-сірий з жовтуватим	безбарвний	немає
Сусло-агар	добрий	світло-кавовий	безбарвний	немає

Стрептоміцети мають характерний запах “вологого ґрунту”, який утворюється завдяки органічній сполуці, яку вони продукують – 1,10-диметил-9-декалол або геосмін [14].

### 1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

*S. albus* є облигатний анаероб. Він росте на простих поживних середовищах та не потребує факторів росту. Діапазон джерел вуглеводів та енергії є досить широким та крім простих органічних сполук, також включає ряд біополімерів, які гідролізуються позаклітинними ферментами [15].

*S. albus* – гетеротроф (хемоорганотроф), для якого характерна олігокарбофілія. Розмножується вегетативно або за допомогою спор. *S. albus* утворює гіфи діаметром 0,5 – 2 мкм, які розпадаються на фрагменти. Він не є стійким до кислот чи спиртів. Оптимальна температура, що необхідна для росту і розвитку 25-35°C, середовище з рН 6,5-8. Спори стрептоміцетів не є термостійкими, але витримують висушування [16]. Тип енергетичного метаболізму окислювальний [17].

Важливою характеристикою для росту мікроорганізмів є забезпечення культури джерелами вуглеводів. *S. albus* гарно росте на середовищах, що містять моно- та дисахариди, а також цукрові спирти, здатні утилізувати гліцерин та етиловий спирт. Для росту *S. albus* здатен використовувати глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, арабінозу, мальтозу, маніт. Слабко використовує: лактозу, дульцит, інозит, сахарозу, рамнозу. Не зброджує: сорбіт. Важливим елементом для росту культури є азот. Найкращими джерелами Нітрогену для актиноміцетів є протеїни, пептони та амінокислоти. Серед неорганічних сполук – це солі амонію, а також нітратів [18]. *S. albus* росте на таких середовищах як: агар Чапека, вівсяний агар, мінеральний агар Гаузе, органічний агар Гаузе, глюкозо-аспарагіновий агар, сусло-агар [19]. Характер росту штаму на різних середовищах та морфологія органів плодоношення показані у таблиці 1.2.

У процесі біосинтезу штаму *S. albus* вирощують при температурі 28±1°C та при перемішуванні до 220 об/хв впродовж 48-72 год на рідкому середовищі Чапека (або Гаузе 2). Оптимальне рН середовища 6,5±1.

Основні поживні середовища, що були обрані для розробки проєкту [20]:

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- для вирощування посівного матеріалу *S. albus*, г/дм<sup>3</sup>: глюкоза - 6,0; соєве борошно дезодороване – 8,0; NaCl – 14,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O – 2,0; CaCl<sub>2</sub> – 4,5; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 5,8; MnCl<sub>2</sub>×4 H<sub>2</sub>O – 0,04; пропінол Б-400 – 0,014 дм<sup>3</sup>; рН 7,8–8,2;

- для виробничого біосинтезу *S. albus*, г/дм<sup>3</sup>: соєве борошно – 8,0; крохмаль картопляний гідролізований – 10,0; NaCl – 14,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O – 2,0; MgCl<sub>2</sub> – 2,2; CaCl<sub>2</sub> – 2,0; MnCl<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O – 0,04; пропінол Б-400; рН 7,8–8,2.

### 1.6 Поширення в природі

*S. albus* широко поширений в ґрунті, у водному середовищі, як у прісних, так і в солоних водоймах, а також в повітрі. Він існує в усіх видах ґрунтів і як правило, їх кількість збільшується в мікробіоценозі з півночі на південь. У більш теплих куточках Землі збільшується різноманітність даних мікроорганізмів [21].

Виявлено природні локуси, де кількість міцеліальних прокариот зростає. До них відносяться місця первинного ґрунтоутворення на карбонатних породах в гірських районах. Також вони можуть існувати в кишечнику тварин, тому що на відміну від інших бактерій, здатні розщеплювати складні органічні сполуки [22].

Стрептоміцети можуть існувати у воді. Вони є морськими аборигенними мікроорганізмами, які здатні адаптовуватись до комплексу екстремальних умов перебування. Актиноміцети складають біля 10% загальної кількості мікроорганізмів, що є у воді.

Стрептоміцети здатні утворювати біоплівку на поверхнях древніх кам'яних монументів, на стінах печер з доісторичними малюнками, а також на поверхнях будинків [23].

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

### 2.1 Характеристика кінцевого продукту

Кінцевим продуктом виробництва є ферментний препарат, що синтезується *S. albus* та містить комплекс гідролітичних ферментів (протеїнази, амілази, ліпази). Препарат призначений для додавання його у корми сільськогосподарських тварин, для підвищення їх поживної цінності.

Згідно з дослідженням, *S. albus* має комплекс гідролітичних ферментів, що містить у своєму складі амілази, проатези, глікозидази. Так майже 90% ензимами усього комплексу є ендопептидази та гексозамінідази, які характеризуються своєю протеолітичною активністю [24].

Протеолітичні ферменти відносяться до групи гідролітичних ферментів, які каталізують реакцію розщеплення ковалентного зв'язку та приєднання молекули води по місцю розриву [25]. Основний принцип класифікації ензимів, який був прийнятий Комітетом по номенклатурі Міжнародного союзу біохіміків та молекулярних біотехнологів – за типом реакції, що каталізується. За класифікацією ферментів, виділений клас гідролаз КФ 3, до підкласу КФ 3.4 якого відносяться усі протеолітичні ферменти або протеази. Протеази – ферменти гідролітичної дії, які каталізують гідроліз білків та пептидів за рахунок розщеплення пептидних зв'язків. Протеази поділяються на 14 субпідкласів за типом каталізуючої реакції, які об'єднані у дві великі групи: екзопептидази – розщеплюють пептидний зв'язок на кінцевих областях поліпептиду (КФ 3.4.11-19), ендопептидази – діють на зв'язки всередині поліпептидного ланцюга (КФ 3.4.21-24 і 3.4.99). Згідно з Всесвітньою інформаційною базою ферментів (<https://www.brenda-enzymes.org>), ензими-протеази, що продукуються *S. albus* наведені у Таблиці 2.1.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ док.ум.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА</b>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Нагорна О.С.						21	60
Конс.								
Керівник	Тодосійчук Т.С.					<b>НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ</b>		
Затвер.								

Таблиця 2.1 – Ензими-протеази , що продукуються *S. albus*

Індекс КФ	Назва ферменту	Механізм дії
3.4.17.14	Zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	Діє на С-кінець поліпептидного ланцюга. Протеаза, що містить в активному центрі Цинк.
3.4.16.4	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	Діє на С-кінець поліпептидного ланцюга. Протеаза, що містить в активному центрі серин.
3.4.17.8	muramoylpentapeptide carboxypeptidase	Діє на С-кінець поліпептидного ланцюга. Протеаза, що містить в активному центрі Цинк.

Естерази – гідролази підкласу 3.1, які гідролізують складноетерні зв'язки. *S. albus* продукує ендодоксирибонуклеази, які каталізують реакцію розщеплення ДНК для отримання 5'-кінців специфічних дволанцюгових фрагментів. Також мікроорганізми здатні продукувати карбоксилестерази, які здатні розщеплювати хлорофіл на фітол та хлорофілід.

Розглянемо механізм дії гідролаз на основі карбоксипептидази (рис.2.1). Фермент діє на низькомолекулярні сполуки та білки. В поліпептидах карбоксиоксидаза гідролізує С-кінець. Дуже легко гідролізуються поліпептиди, що мають вкінці ароматичні або аліфатичні бокові ланцюги. Зв'язування з субстратом змінює структуру ферменту. В активному центрі міститься атом цинку або інші групи, які індукують перерозподіл електронів в субстраті та

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						22
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

покрощують процес гiдролiзу [26].

Усi ферменти-гiдролaзи допомагають прискорювати процеси травлення у тварин завдяки своїм властивостям та покращувати засвоєння поживних речовин.

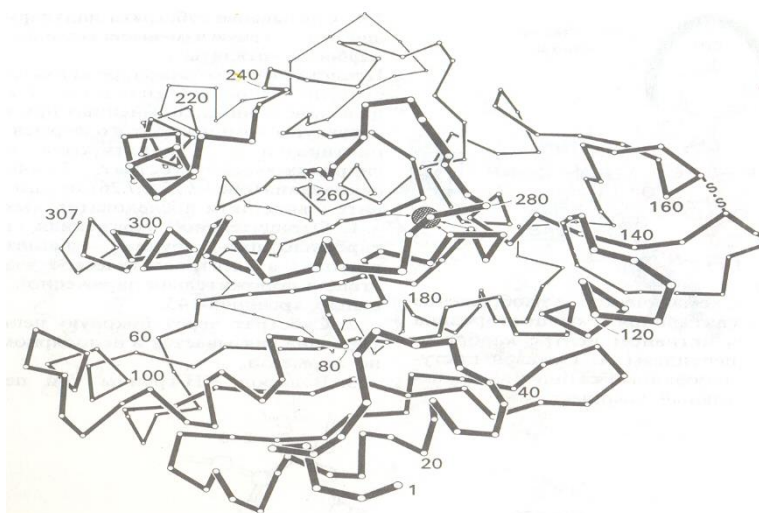


Рисунок 2.1 – Тривимiрна структура карбоксипептидази [26].

Оскiльки цiльовим продуктом проєктованого виробництва є ферментний препарат, схема хiмiчних перетворень в процесi бiосинтезу аналогiчна стандартному шляху синтезу бiлкiв.

## 2.2 Схема хiмiчних перетворень

Синтез цiльового продукту *S. albus* вiдбувається при вирощуваннi на поживному середовищi у якому основними компонентами виступають крохмаль, як джерело вуглеводiв та соєве борошно, як джерело нiтрогену.

Початковим етапом метаболiзму мiкроорганiзмiв є вуглеводний обмiн. При культивуваннi *S. albus* використовується гiдролiзований крохмаль, який в подальшому процесi гiдролiзу розщеплюється на глюкозу (рис.2.2).

Глюкоза в свою чергу перетворюється на пiруват шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз) (рис.2.3).

					ДП 7115. 00.000 ПЗ	Арк.
						23
Зм.		№ докум.	Пiдпис	Дата		

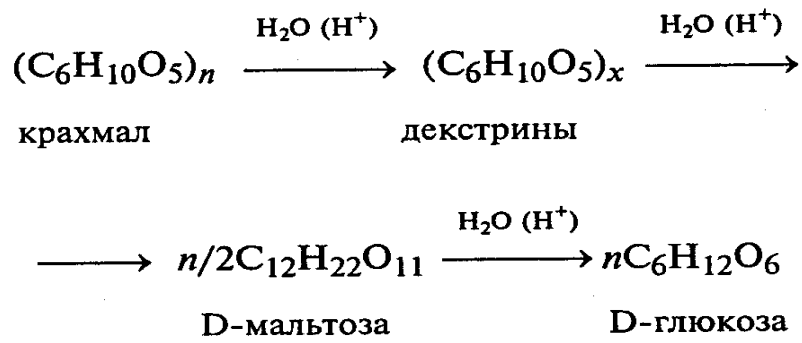


Рисунок 2.2 – Схема гідролізу крохмалю [27].

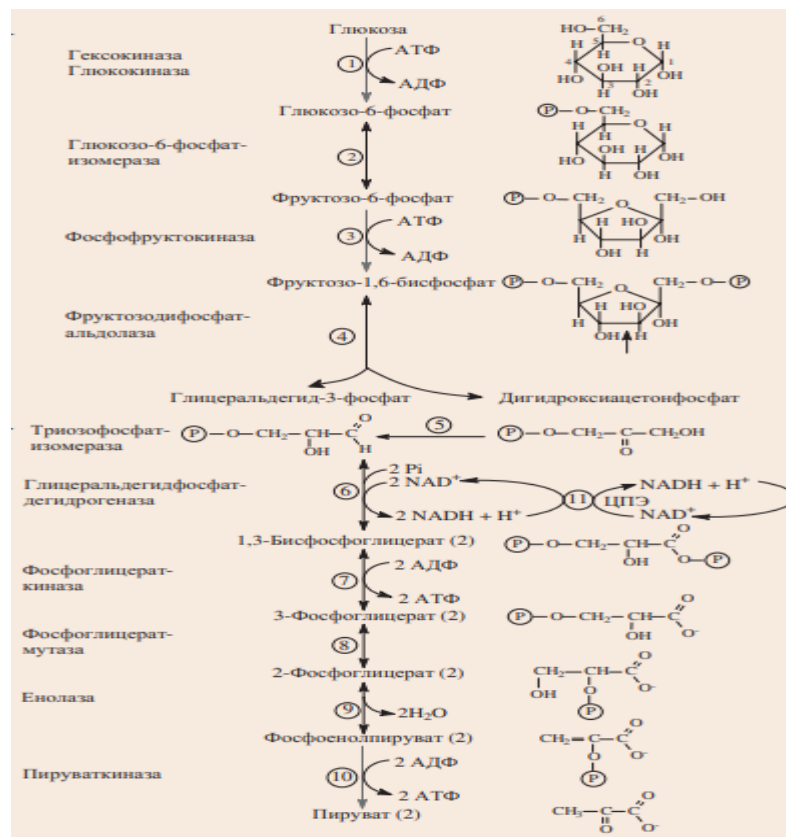


Рисунок 2.3 – Катаболізм глюкози в процесі культивування *S. albus* [27].

З утвореного пірувату в процесі циклу Кребса синтезуються органічні кислоти з яких утворюються амінокислоти (рис.2.4) [27].

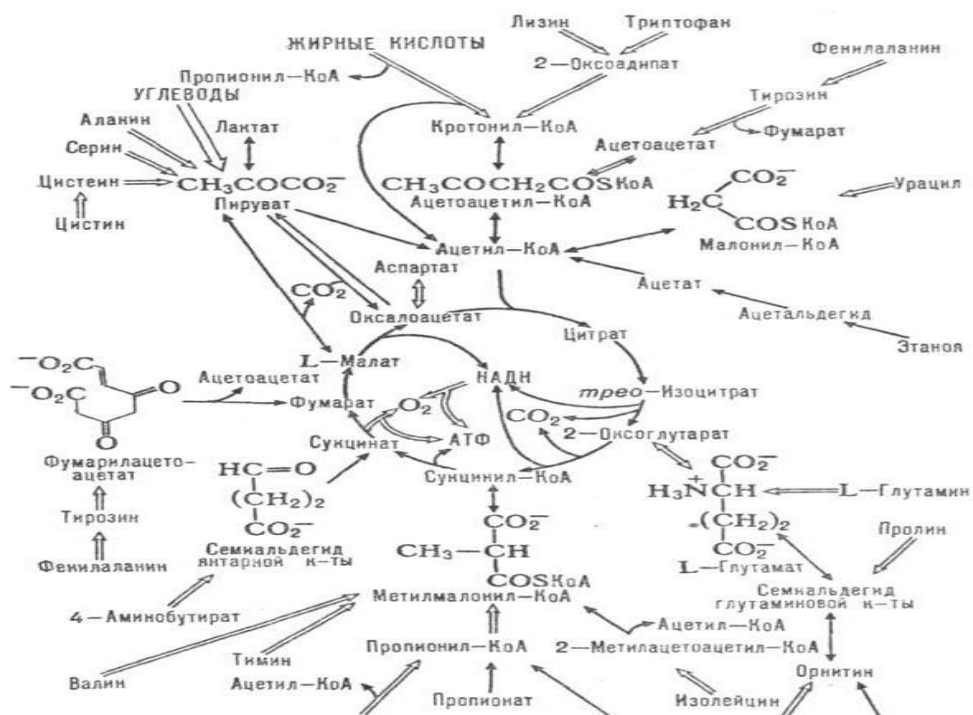


Рисунок 2.4 – Біосинтез азотистих сполук, що утворились в ході культивування *S. albus* та катаболізм амінокислот, що входять до складу білкових молекул [27].

Наступним етапом в процесі метаболізму *S. albus* є утворення цільового продукту – ферментів. Біосинтез ензимів включає в себе 5 етапів:

1. Впізнавання та активація амінокислот.
2. Ініціація
3. Елонгація
4. Термінація
5. Фолдинг і посттрансляційна модифікація

Активація та впізнавання амінокислот відбувається за допомогою аміноацил-тРНК, яка також пов'язана з гідролізом АТФ до АМФ.

2,3 та 4 етапи називаються трансляцією. Біосинтез білка відбувається на рибосомах. На етапі ініціації відбувається утворення функціонально активної рибосоми. З'єднуються мала та велика субодиниці та мРНК. Для цього необхідна енергія ГТФ та білкові фактори ініціації. В рибосомі, що утворилась

виділяють 2 центри – А-центр (аміноацильний) та П-центр (пептидильний). На етапі елонгації в А-центр приєднується aa-тРНК антикодон якої комплементарний кодону мРНК, яка міститься в А-центрі. Потім амінокислота з П-центру переноситься в А-центр. Після транслокації тРНК із П-центра вивільняється, а пептид переміщується в П-центр.

Останній етап трансляції – термінація, відбувається тоді, коли в А-центрі опиниться один із термінуючих кодонів. Після трансляції здійснюється фолдинг за участю шаперонів та посттрансляційна модифікація. Вона включає протеоліз (перетворення проферментів у ферменти) та різні хімічні модифікації [28].

### **2.3 Характеристика біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології**

Ферментний препарат, який використовується як додаток до корму тварин, повинен бути у вигляді порошку. Даний препарат не є стерильним, тому кількість колонієутворюючих одиниць у ньому має не перевищувати  $10^3$  в грамі, а також відсутність *Escherichia coli* в 1 грамі продукту. Критерії прийнятності ґрунтуються на результатах одного випробування або на середньому результаті декількох повторних випробуваннях [29].

Склад препарату:

- Основні речовини: гідролітичні ферменти(протеїнази, пептидази, амілази) – 60%;
- Домішки: вуглеводи, білки, мінеральні солі – 36-39%;
- Супутні біологічно активні речовини: антибіотики – 1-3%.

### **2.4 Методи очистки цільового продукту**

Етапи отримання ферментного препарату після процесу біосинтезу включають:

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						26
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

- 1) Відділення біомаси;
- 2) Концентрування та очистка ферментного розчину;
- 3) Сушіння концентрату.

При отриманні ферментних препаратів нерозчинну частину середовища разом із біомасою продуцента відділяють на фільтрах, центрифугах або сепараторах.

Процес сепарації виконується як на різного типу центрифугах, так і на сепараторах. Якщо бактеріальні культури фільтруються дуже повільно, в таких випадках використовується процес сепарації. Перед самим процесом культуральну рідину піддають хімічній обробці та сепарують зі швидкістю 800-1000 л/год.

У багатьох дослідженнях наукових інститутів доведено, що в більшості випадків найбільш раціонально відділяти біомасу від культуральної рідини фільтрацією. Даний процес дозволяє значно зменшити втрати ферментів та отримати ферментний розчин кращої якості.

Відділення міцелію проводиться шляхом фільтрації на фільтрі ФПАКМ. Міцелій, що відділився висушується, упаковується та використовується як корм для худоби, а культуральна рідина переходить до наступного етапу [29].

Основними способами концентрування та очистки ферментних препаратів є: концентрування у вакуум-випарних установках, осадження ферментів органічними розчинниками або солями.

Осадження ферментів характеризується процесом осідання ензимів із водних розчинів за допомогою органічних розчинників або нейтральних солей. В результаті отримується очищений препарат, який може використовуватись у харчовій промисловості.

Солі лужних та лужно-земельних металів викликають зворотне осадження білків, але після їх видалення знову здатні розчинятись, зберігаючи при цьому свої властивості. Найчастіше для розділення білків методом висолювання використовують різні концентрації солей сульфату амонію –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						27
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

Чим вища розчинність білку, тим вища концентрація солі необхідна для його висолювання.

Сульфат амонію має ряд переваг в очистці білків порівняно з іншими солями:

- Він є полівалентною сполукою, яка є набагато ефективніша, ніж моновалентні через кращу іонну силу;
- Згідно ряду Гофмейстера: Цитрат > Сульфат > Фосфат > Хлорид > Нітрат > Тіоціонат, найкраща ефективність висолювання у цитрату та сульфату, але сульфат краще розчиняється, дешевший та має стабілізуючий вплив, тому частіше використовується;
- Сульфат амонію преципітує білки за двома механізмами:

1. Сульфат амонію робить молекулу білка більш компактною, а через те менш розчинною, через взаємодію з позитивно зарядженими амінокислотами;

2. Зневоднення. Сульфат-іон зв'язує молекули води.

В Інституті Тваринництва в Індонезії були проведені дослідження задля оптимізації очищення ферментів-протеаз шляхом висолювання за допомогою сульфату амонію. У рамках проведення досліду було взято такі концентрації солі  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 50%, 60%, 70% та 80%. Згідно з результатами, найвищу літичну активність та найбільшу кількість протеїнів отримали при очистці 70% розчином сульфату амонію.

Після відділення ферментів, необхідно очистити високомолекулярні сполуки від низькомолекулярних шляхом діалізу. Даний метод заснований на можливості низькомолекулярних речовин проникати через напівпроникні мембрани, а макромолекул – залишатись у розчині [30].

Оскільки цільовий продукт даної роботи – технічний, тому він не потребує такої очистки. Для ферментного препарату, який призначений для додавання у корм, краще використовувати вакуум-концентрування.

Концентрування ферментних розчинів проводять у вакуум-випарних установках. Оскільки культуральна рідина навіть при вирощуванні активного

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						28
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

продуценту, містить відносно незначні концентрації ферментів, тому її необхідно концентрувати. Основною перевагою є те, що вакуум-випарний апарат здатний проводити процес за нижчих температур, що важливо у випадку концентрування розчинів речовин, схильних до розкладання за підвищених температур. Перед процесом вакуум-випарювання, необхідно стабілізувати ферменти. Відомо, що двовалентні метали здатні стабілізувати ензими. Найбільш ефективну дію на розчин з протеазою надає кальцій. Він взаємодіє з молекулою ферменту, з результаті нативна структура якого захищає від конформаційних змін. Також як стабілізатор у фільтрат додають білок молока – казеїн, а також гліцерин. Після даного процесу ми отримуємо концентрат, який далі направляють на сушіння.

Для зневоднення ферментних концентратів використовують різні види сушок: сушка у вакуумних апаратах, сублімаційна та розпилювальна.

В процесі сушіння теплопровідність матеріалу зменшується, внаслідок чого в пори замість води потрапляє повітря, теплопровідність якого значно менша, аніж води. Перед сушінням препаратів для стабілізації ферментів перед дією високих температур додають NaCl [31].

Вакуум-сушіння починається із створення різниці тиску пари над поверхнею продукту, що висушується та навколишнього середовища. Після нагріву вологого матеріалу та створення певної температури, вона залишається постійною до тих пір, поки не закінчиться випарювання вологи з поверхні. Швидкість видалення вологи в цей період залежить від умов підводу тепла до матеріалу та відводу парів вологи з поверхні. Перший період сушки, виключаючи період нагрівання ферментного осаду, характеризується незмінною швидкістю та температурою матеріалу, що висушується та може бути інтенсифікована підведенням тепла.

Другий період сушки характеризується зменшенням інтенсивності міграції вологи, так як зона випарювання з поверхні матеріалу переміщується в його середній шар.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						29
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

Осад, розкладають в кювети шаром в 5 мкм, які подають в сушильну камеру в якій створюється надлишковий тиск. В процесі сушіння температура осаду не повинна перевищувати 30°C.

Сублімаційна сушка поділяється на декілька періодів:

- Заморожування вологи;
- Видалення замороженої частини шляхом переходу її з твердого стану в пару, в результаті чого створюється додаткове зниження температури матеріалу, що висушується та вологість випаровується найбільш інтенсивно;
- Часткове видалення іммобілізованої вологи.

Режим та швидкість сублімації залежить від температури замороженого матеріалу, величини надлишкового тиску в сушильній камері, температури теплоагента в різні періоди сушіння та способи підготовки матеріалу.

Процес сублімаційної сушки починається з того, що ферментний осад, відділений від розчину з органічними розчинниками, подають в змішувач, де попередньо обробляють етиловим спиртом 96%, в результаті чого вологість зменшується. Осад заморожують при температурі -70°C, розкладають на кювети, шаром 10 мм та направляють в сушильну камеру. Температура теплоагенту спочатку досягає 80°C, потім знижується до 20°C.

Препарати, які отримують висушуванням культуральної рідини або її концентратів на розпилювальній сушарці, мають низьку ступінь очистки і можуть використовуватись тільки у технічних цілях.

Тим не менш використання способу сушіння на розпилювальній сушарці значно спрощує технологічну схему отримання препарату, а також їхню собівартість. При отримання технічних препаратів, даний спосіб є найбільш оптимальним.

Основною перешкодою використання розпилювальної сушарки є те, що вона працює під дією високих температур, а ферменти є термочутливими сполуками. Для забезпечення стабільності ферментів, до концентрату додають

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						30
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

стабілізатори. Зазвичай це сульфатні солі або інші неорганічні речовини. Для кормового ферментного препарату можна використовувати NaCl, що не є шкідливим для організму та здатний змінювати конформацію ферменту, захищаючи його від дії високих температур.

Сушіння ферментного осаду проводиться при температурі теплоагенту на вході 160°C, а на виході – 60°C. Сушку зупиняють, якщо вологість досягла показника 8%.

Вакуум-сушіння доцільно використовувати на невеликих підприємствах, а процес сублімаційної сушки є досить складним, тому для кормового ферментного препарату використовують сушку на розпилювальній сушарці [32].

## 2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Цільовим продуктом запропонованої технології є препарат, що містить комплекс гідролітичних ферментів та використовується як додаток до корму для покращення травлення у тварин.

Як відомо, ферменти є білковими каталізаторами, які контролюють в живому організмі усі біохімічні процеси, в тому числі і процеси травлення. В шлунково-кишковому тракті тварин містяться високоефективні гідролітичні ферменти, що здатні розщеплювати різні поживні речовини – крохмаль, цукри, жири та білки, але відсутні ферменти, що здатні розщеплювати клітковину. Крім того, клітковина утворює клітинну стінку рослин, які не завжди руйнуються при подрібненні корму. Також для зернових характерні фітати, а для бобових – глікозиди, алкалоїди, таніни, які є інгібіторами травлення [33].

Якщо до корму додати ферменти, що здатні гідролізувати клітинну стінку, вони починають працювати разом із ферментами, які вже є в органах травлення, відкриваючи доступ до багатьох поживних речовин, які без них просто виводяться із організму неперетравленими. Крім того, зерно злаків – пшениці, ячменю, вівса, жита – містять в своєму складі некрохмалисті полісахариди, такі як геміцелюлози та пектинові речовини, які утворюють в кишківнику гель, що є

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						31
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

досить в'язким, внаслідок чого знижується активність власних ферментів організму, сповільнюються процеси всмоктування та підвищується ризик розвитку хвороботворної мікрофлори [34,35].

Таблиця 2.2 – Вміст некрохмалистих полісахаридів у зерновій сировині [1].

Зернова сировина	Всього НПС	Целюлоза	Арабіноксилани	
			Загальні	Розчинні, % від загальних
Кукурудза	5.0-9.0	1.9-3.0	4.0-4.7	10.6
Пшениця	7.0-11.4	2.0-3.0	5.5-9.5	24.6
Жито	11.0-14.7	1.6-2.7	7.5-9.5	33.6
Овес	15.0-26.0	8.0-12.3	5.5-9.7	5.1
Ячмінь	13.0-18.6	4.2-9.3	5.7-8.4	14.2
Пшеничні висівки	22.0-36.4	9.0-13.6	15.0-25.0	7.3
Шрот соняшника	21.0-30.0	3.4-9.9	3.0-4.5	21.1
Горох	17.4	15.0-21.0	-	-
Люпин	46.1	5.3	-	-
Кормові боби	19.0	8.1	-	-

На ранніх стадіях розвитку тварин, а також при стресі нормальна секреція травних ферментів погіршується, тому необхідно додавати ферменти для покращення травлення.

Таким чином, основна біологічна дія ферментного препарату:

- Покращує засвоєння білків та вуглеводів через розщеплення клітинної стінки рослин;
- Підвищує активність власних ферментів і процесів всмоктування, покращує мікробіологічне середовище шлунково-кишкового тракту, а також зменшує в'язкість;
- Відновлює дефіцит травних ферментів на ранніх стадіях розвитку та при стресі.

Дані біологічні ефекти призводять до покращення різних показників підприємства:

- Краще засвоюються поживні речовини, тому збільшується енергетична цінність корму;
- Зменшуються витрати корму на одиницю продукції;
- Збільшується продуктивність, хоча раціон є незмінним;
- Можлива заміна дорогих компонентів корму на дешевші;
- Зменшується рівень інфекційних захворювань і потреба в антибіотиках [2].

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						33
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

## РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

### 3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Геном *S. albus* є найменшим серед усіх представників роду *Streptomyces*. Детальний аналіз геному пояснює їх здатність продукувати велику кількість різноманітних сполук. Крім того, в геномі даного мікроорганізму знайдено 30 потенційних кластерів, що відповідають за синтез вторинних метаболітів та можуть використовуватись для біосинтезу різних продуктів, в тому числі і ферментів.

Геном *S. albus* містить близько 7 млн. пар нуклеотидів. Глибокий аналіз хромосом показав, що *S. albus* має тенденцію зменшувати кількість ортологічних груп генів. Він також має найбільший відсоток гуанін-цитозин пар нуклеотидів (73,3%). На відміну від інших стрептоміцетів, геном даного мікроорганізму включає одну хромосому з сімома рРНК оперонами та 66 генів тРНК. Через велику кількість рРНК оперонів можна пояснити швидкий ріст та універсальність даного штаму. Основні ознаки одичної послідовності хромосоми наведено у таблиці 3.1 [36].

Генетична карта *S. albus*, що наведена на рис. 3.2 складається з таких компонентів : кодуючі та некодуючі хромосомні регіони (синє коло), пряма та зворотня ділянка хромосом (зелене та фіолетове коло), некодуючі ділянки (блакитні прямі), гени, що відповідають за антимікробну стійкість (червоні прямі), гени, що відповідають за варіаційні особливості (оранжеві прямі), білки-транспортери (сині прямі) та ін. [26].

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>РОЗДІЛ 3.МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Нагорна О.С.						34	82
Конс.								
Керівник	Тодосійчук Т.С.					НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ		
Затвер.								

Таблиця 3.1 – Загальні особливості хромосоми *S. albus* [36].

Характеристика	Значення
Структура	Лінійна
Загальна кількість пар нуклеотидів	6 841 649
Термінальні повтори	2 * 30 000 bp
Вміст гуанін-цитозин пар нуклеотидів	73,3%
Кодуючі послідовності	5832
Середня довжина гену	1011 bp
Кількість рРНК	7*(16S-23S-5S)
Кількість тРНК	66 (41 вид)

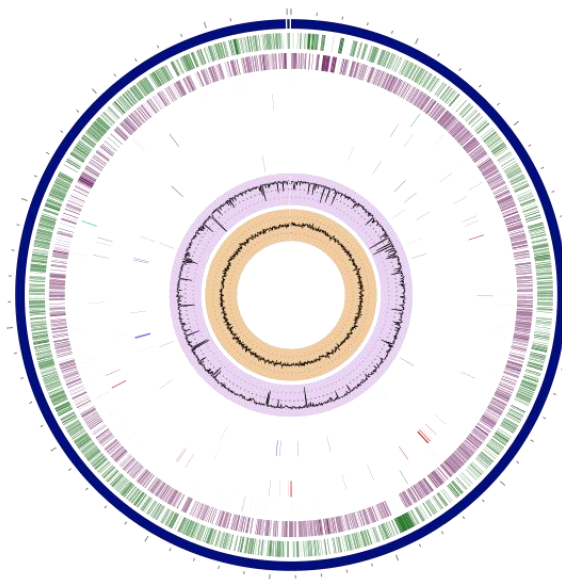


Рисунок 3.2 – Генетична карта *S. albus* [36].

Штам *S. albus* містить у своєму геномі велику кількість кластерів (близько 10%), які відповідають за функції біосинтезу вторинних метаболітів.

виконувати цього через невідповідні умови навколишнього середовища. Існують спеціальні регуляторні мережі, які включають безліч харчових та екологічних сигналів, які надходять до плейотропних або кластерних регуляторів транскрипції (CSRs). Для отримання вторинних метаболітів краще використовувати такі плейотропні регулятори, що діють на багато біосинтетичних шляхів [38].

Даний штам є ідеальний для оптимізації можливостей експресії генів шляхом генетичної інженерії. Багато регуляторів використовуються для генетичних досліджень. Наприклад, фосфофруктокіназа пов'язує первинні та вторинні метаболізми. Плейотропні регулятори зв'язування ДНК, такі як білок рецептора цАМФ, можуть розпізнавати споріднені ділянки зв'язування у декількох кластерах. Багато основних регуляторів, які виявлені в модельному штамі, наведено у таблиці 3.3 [39].

Таблиця 3.3 – Регулятори, що впливають на метаболізм стрептоміцетів [38].

Позитивний вплив	Негативний вплив
<i>AdpA</i> —регулятор, що діє на процеси транскрипції;	<i>DasR</i> —регулятор експресії генів, що діє на фосфорильовані аміноцукри;
<i>AtrA</i> —регулятор, що є активатором актинородину;	<i>Pfk</i> —фосфофруктокіназа, основний ензим гліколізу;
<i>KbpA-AfsKRS</i> —регулятор, що з'єднує фосфати та продукти вторинного металобізму;	<i>PhoR-PhoP</i> —регулятор, що діє на засвоєння фосфатів.
<i>CRP</i> —регулятор, що активізує транскрипцію біосинтетичних генів та контролює утворення попередників;	

### 3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Високопродуктивні промислові штами можна отримати шляхом природного, штучного добору або шляхом індукованого мутагенезу.

Природним добором називають процес виживання найбільш пристосованих до умов навколишнього середовища живих організмів. Для отримання промислового штаму шляхом природного добору спочатку необхідно відібрати потрібний мікроорганізм із навколишнього середовища. Після відбору проб, їх висівають на спеціальні селективні середовища, де культура росте. Потім, з усіх колоній вибирають ту, яка найкраще росте та є чистою. Завдяки природному добору було виділено перші штами стрептоміцетів.

Штучним називають добір в процесі якого створюються нові штами або удосконалюються деякі властивості штаму шляхом збереження особин з певними спадковими ознаками. Для проведення штучного добору зазвичай використовують індукований мутагенез [40].

Для підвищення продуктивності *S. albus* одним із найкращих шляхів є використання індукованого мутагенезу або фенотипової селекції. Хімічний та фізичний мутагенез є найбільш надійними методами створення високопродуктивних штамів для виробництва продукту. Мутагенез може поєднуватись з рекомбінацією шляхом злиття протопластів або молекулярно-генетичні підходи, включаючи генну інженерію [41]. Хімічний мутагенез та рекомбінація не потребують загального розуміння усіх процесів, незліченних факторів, що сприяють синтезу продукту. Одними із найефективніших хімічних мутагенів є МНС та ЕМС, які здатні генерувати мутації переходу ГЦ на АТ, що може подвоїти різноманітність амінокислотних залишків [42].

Для проведення індукованого мутагенезу як хімічний мутаген можна використовувати безліч сполук, таких як мітоміцин Ц, гідроксиламін, етилметансульфонат(ЕМС), азотиста кислота та N-метил-N-

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						37
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

нітрозометилсечовину (МНС) [43]. Для проведення дослідження використовують МНС. Інкубацію проводять на 5-денній суспензії спор, яка була промита фосфатним буфером протягом двох годин. Після цього, спори центрифугують зі швидкістю 12000 об./хв. протягом 10 хв. та промивали фосфатним буфером 2 рази. Далі суспензію висівають на чашки Петрі та розраховують кількість живих клітин. Для визначення літичної активності окремі колонії пересіюють на чашки Петрі з середовищем наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): NaCl – 6,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 3H<sub>2</sub>O – 0,5; FeSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> – кожен по 0,01; агар-агар–25, рН=7,0 яке містило як єдине джерело вуглецю суспензію тест-культури (*S.aureus* або *E. coli*) та вирощували при 28°C впродовж 7 діб. Бактеріолітичну активність окремих клонів оцінювали за здатністю лізувати тест-культуру і характеризували ІЛА.

Для визначення здатності отриманого продуцента синтезувати бактеріолітичний ферментний комплекс *S. albus* 2435/М культивували при 28±1°C протягом 5 днів при перемішуванні 220 хв<sup>-1</sup> в рідкому поживному середовищі наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): глюкоза – 6,0; соєве борошно – 8,0; NaCl – 14,0; CaCl<sub>2</sub> – 4,5; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 5,8; MnCl<sub>2</sub> – 0,04; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,5; H<sub>2</sub>O – до 1 л. Літичну активність вимірювали турбідиметричним методом. Результатом дослідження був отриманий мутантний штам, у якого літична активність була більша у 1,5 рази, ніж у попередника.

Як фізичний мутаген може використовуватись УФ-випромінювання. Для дослідження даного чинника разом з МНС було використано 10 мл суспензії спор з концентрацією 10<sup>8</sup> клітин на мл. Суспензію переливали на чашку Петрі та піддавали УФ-випромінюванню з постійним перемішуванням. Обладнанням, що використовувалось, була УФ-лампа з довжиною хвилі 254-255 нм і випромінюванням 240 Дж/м<sup>2</sup>. Усі маніпуляції проводились у темній кімнаті, щоб запобігти фотореактивації. При визначенні літичної активності, результат був вищий, аніж при застосуванні тільки хімічного мутагену [30].

					ДП 7115. 00.000 ПЗ	Арк.
						38
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

При використанні двох або більше мутагенних чинників можна досягти підвищення синтезу протеолітичних ферментів від 1,5 до 10 разів.

### 3.3 Схема отримання продуцента, який використовується в роботі.

В результаті огляду літератури та її аналізуванні було зроблено висновки, що індукований мутагенез є найкращим методом створення високопродуктивного промислового продуценту. Був підібраний комплекс фізичних та хімічних мутагенів, які впливають на геном мікроорганізму. В якості фізичного мутагену виступає УФ-випромінювання, а хімічного – N-метил-N-нітрозометилсечовина.

Процес отримання промислового продуценту починається з того, що з батьківського штаму *S. albus* 2435 та фізіологічного розчину роблять спорову суспензію концентрацією  $10^8$  кл./мл. Суспензію попереднього відцентрифугують та переливають у чашки Петрі. Опромінення проводять УФ-лампю з довжиною хвилі 254-255 нм і випромінюванням  $240 \text{ Дж/м}^2$  протягом 40 с на відстані 30 см. Після цього дію фізичного мутагену припиняють.

Для проведення хімічного індукованого мутагенезу використовують МНС з концентрацією 30 мкг/мл. Мутаген додають до суспензії спор та інкубують протягом двох годин, перемішуючи на термоміксері. Після процесу інкубації, дію мутагену припиняють. Припинення дії мутагену здійснюють відмиванням за допомогою фосфатного буферу, використовуючи центрифугу зі швидкістю 12000 об./хв. Процес промивання проводять тричі.

Для дослідження клонів продуцента з найкращими синтетичними властивостями, суспензію спор, що піддавалась дії фізичним та хімічним мутагенним чинникам, висівають на поживне агаризоване середовище Гаузе 2 та вирощують при температурі  $28^\circ\text{C}$  протягом 5-7 діб. Окремі колонії висівають на середовище з тест-субстратом, щоб визначити, які з них мають найвищу протеолітичну активність.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						39
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		

Ті, навколо яких розщепилось найбільше субстрату пересівають на поживне середовище Гаузе та аналізують колонії щодо стабільності синтезу ферментів та стійкості мутацій.

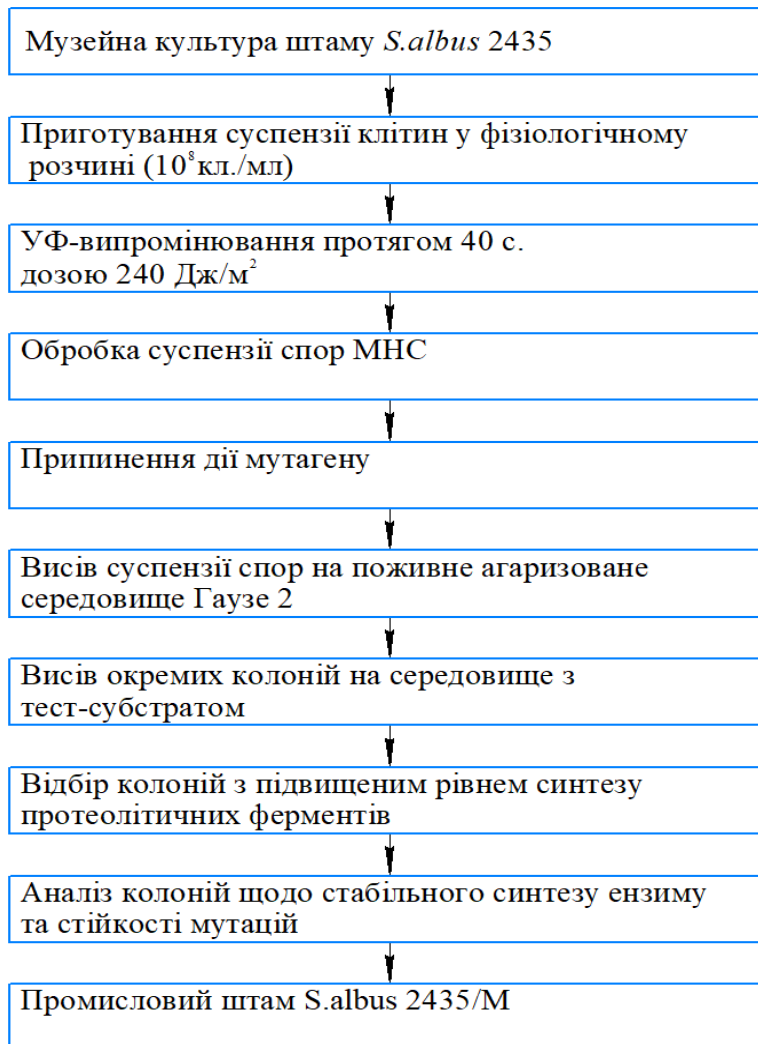


Рисунок 2.5 – Блок-схема отримання промислового штаму-продуценту *S. albus* 2435/М

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.		№ докум.	Підпис	Дата		40

## РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевим продуктом виробництва, що розробляється, є ферментний препарат для використання у тваринництві, основною діючою речовиною якого є комплекс ензимів протеолітичної, амілолітичної, ліполітичної дії, який отриманий шляхом біосинтезу штамом-продуцентом *S. albus*.

Даний препарат здатний вироблятися за прототипом регламенту діючого ферментного препарату “ФЕКОРД 2015-Б”, що містить комплекс ферментів бактеріального та грибного походження, який використовується у тваринництві – ТУ ВУ 017-2015 «Добавки сухие ферментные кормовые «Фекорд-2015-Б».

Основним призначенням цільового продукту є використання комплексу ферментів для покращення засвоєння основних компонентів корму, а також підвищення активності власних ферментів та процесів всмоктування у тварин.

За зовнішнім виглядом, кінцевий продукт виробництва являє собою нестерильний порошок, запакований у поліетиленові пакети по 1 кг, які вкладаються в крафт-мішки згідно з ГОСТ Р 57249-2016. Поліетиленові пакети повинні бути нетоксичні та не мати шкідливого впливу на людину при використанні їх при нормальних умовах згідно ГОСТ 32521-2013. Для транспортування використовуються мішки паперові зшиті або склеєні із комбінованих матеріалів згідно ГОСТ 2226-2013.

Маркування наносять на кожен одиницю споживчої продукції або на ярлик із зазначеними характеристиками:

- Найменування підприємства-виробника та/або його товарний знак;
- Найменування препарату;
- Номер партії;

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата	<i>РОЗДІЛ 4.ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Нагорна О.С.						41	82
Конс.								
Керівник	Тодосійчук Т.С.					<b>НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ</b>		
Затвер.								

- Маса нетто;
- Дата виготовлення;
- Ферментативна активність;
- Термін придатності.

Спосіб нанесення маркування, що характеризує продукцію – згідно ГОСТ 14192.

Ферментні препарати транспортують в критичних транспортних засобах. Процес транспортування має відбуватись у транспортних упаковках або універсальних контейнерах. Не допускається транспортувати ферментні препарати з:

- Мінеральними добривами;
- Отрутохімікатами;
- Кислотами та лугами;
- Хімічними та синтетичними миючими засобами;
- З ферментними препаратами, які призначені для потреб побутової хімії.

Зберігання повинно бути окремо, по партіях, в закритих приміщеннях, що запобігають потраплянню прямих сонячних променів, на дерев'яних стелажах або піддонах, при температурі не вище 25°С та не нижче -25°С. Не допускається зберігати препарати з речовинами з якими не можна їх транспортувати, що зазначені вище. Термін зберігання ферментного препарату – 12 місяців.

#### **4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів**

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються в даній роботі, наведена у таблиці 4.1

Таблиця 4.1 – Характеристика матеріалів, що використовуються для отримання ферментного препарату.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
<b>1. Основна сировина</b>			
1.1 Агар	ГОСТ 17206-84 Агар мікробіологічний. Технічні умови.	Зовнішній вигляд: пористі пластини, товщиною не більше 20мм. Колір: білий чи світло-кремовий. Запах: характерний. Прозорість розчину з масовою часткою агару 0,85%: не менше 50.	Для використання в якості компонента ПС для відновлення музейної культури.
1.2 Глюкоза	ДСТУ4464:2005. Глюкоза кристалічна гідратна.	Кольоровість розчину, одиниць оптичної густини, не більше: 0,02; Масова частка вологи, %, не більше ніж: 9;	Компонент ПС для вирощування посівного матеріалу.
1.3 Соеве борошно дезодороване	ДСТУ4543:2006. Борошно соєве харчове.	Масова частка вологи та летких речовин, %, не більше: 9,0; Масова частка жиру, %, на сухі речовини не більше: 15,0; Масова частка сирого протеїну, %, на сухі речовини не менше: 40,0; Масова частка загальної золи, %, не більше: 7,0.	Компонент ПС для вирощування посівного матеріалу та біосинтезу.
1.4 Крохмаль картопляний	ДСТУ 4286:2004	Зовнішній вигляд: однорідний порошок.	Компонент ПС для

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

гідролізований		Колір: білий. Запах: властивий крохмалю,	процесу біосинтезу.
		без сторонніх запахів. Масова частка золи: 0,30. Кислотність: 7,5. Кількість вкраплень на 1 дм <sup>2</sup> : не більше ніж 60.	
1.5 Гідроорто фосфат калію	ГОСТ 2493-75. Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный .	Масова частка 3-водного двозаміщеного фосфорнокислого калію (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O), %, не менше ніж: 99; Масова частка нерозчинних у воді речовин, %, не більше ніж: 0,005.	Компонент ПС для вирощування посівного матеріалу та біосинтезу.
1.6 Хлорид кальцію	ГОСТ 450-77 Кальций хлористый технический. Технические условия .	Зовнішній вигляд: порошок або гранули білого кольору; Масова доля хлористого кальцію, в перерахунку на %, не більше: 96,5.	Компонент ПС для вирощування посівного матеріалу та біосинтезу.
1.7 Сульфат магнію	ГОСТ 4523-77 Магний сернокислый 7-водный. Технические условия .	Масова частка 7-водного сірчанокислого магнію (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O), %, не менше: 99,5; Кислотність (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), %, не більше: 0,002; Лужність (MgO), %, не більше 0,001.	Компонент ПС для вирощування посівного матеріалу та біосинтезу.
1.8 Хлорид марганцю	ГОСТ 612-75 Реактивы. Марганец (II)	Масова частка 7-водного сірчанокислого магнію (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O), %, не	Компонент ПС для вирощування

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

	хлористий 4-водний. Технические условия .	менше: 99,0; Масова частка нерозчинних у воді речовин, %, не більше: 0,003.	посівного матеріалу та біосинтезу.
1.9 Пропінол Б-400	ТУ У 24.1-32257423-122:2006 "Пропинол Б - 400"	Згідно вимогам ТУ.	Піногасник
1.10 Натрій хлорид	ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия.	Масова частка хлористого натрію (NaCl) в прожареному препараті, %, не менше: 99,9; Масова частка нерозчинних у воді речовин, %, не більше: 0,003.	Компонент ПС для вирощування посівного матеріалу та біосинтезу.

1. Допоміжна сировина

2.1 Вода питна	ДСТУ 7525:2014 Вода питьевая. Требования и методы контролирования качества.	Вміст хімічних домішок, біологічні показники, рН згідно ДСТУ.	Для приготування ПС, для миття приміщень та обробки обладнання, для подання в сорочку ферментера.
2.2 Засіб для дезінфекції «Віросан Макс»	Інструкція по застосуванню засобу рідкого миючого «Віросан Макс»	Зовнішній вигляд: прозора рідина від прозорого до темно-коричневого кольору з характерним запахом.	Для миття поверхонь, стін, підлоги лабораторних і виробничих приміщень, а також для миття ємкісного обладнання

2.3 Натрій гідроксид	ГОСТ 4328-77. Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия.	Масова частка NaOH, %, не менше: 99; Масова частка Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , %, не більше: 0,8;	Для миття поверхонь, стін, підлоги лабораторних і виробничих приміщень, а також для миття ємкісного обладнання.		
2.4 Перекис водню	ГОСТ 177-88 Водорода перекись. Технические условия.	Зовнішній вигляд: прозора рідина; Масова частка перекису водню: 30 – 40%.	Для миття поверхонь, стін, підлоги лабораторних і виробничих приміщень, а також для миття ємкісного обладнання.		
2.5 Кислота соляна	ГОСТ 3118-77 Кислота соляная. Технические условия.	Зовнішній вигляд: повинен витримувати випробування. Масова частка соляної кислоти: не менше 35-38%.	Для регулювання кислотності в процесі біосинтезу.		
1. Матеріали					
3.1 Поліетиленові пакети	ГОСТ 32521-2013. Мешки из полимерных пленок.	Має відповідати маркуванню та бути цілісним.	Для пакування цільового продукту.		
3.2 Мішки паперові зшиті	ГОСТ 2226-2013. Мешки из бумаги и комбинированных материалов	Має відповідати маркуванню та бути цілісним.	Для пакування цільового продукту.		
<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>					
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Арк. 46

### 4.3 Опис технологічного процесу

#### ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

##### ДР 1.1 Підготовка персоналу

##### ДР 1.1.1 Навчання персоналу

В процесі роботи з персоналом проводяться два види навчання:

- Внутрішньовиробниче (виробничий інструктаж стандартних операційних процедур посадових обов'язків та загальних правил роботи на підприємстві, після чого перевірка знань за допомогою атестації та висновок щодо компетентності робочого персоналу)
- Навчання поза робочим місцем (конференції, тренінги, семінари, які покращують знання та навички у певній сфері. Наприклад, тренінг від компанії Sartorius, як користуватись модернізованими дозаторами)

##### ДР 1.1.2 Медичний огляд персоналу

При влаштуванні на роботу персонал повинен пройти медичний огляд згідно з наказом Міністерства охорони здоров'я України №45 (з0136-94) від 31.03.94 року "Про затвердження Положення про порядок проведення медичних оглядів працівників певних категорій", після того огляд у лікарів кожного року. Працівники не допускаються до роботи, якщо у них є інфекційні захворювання, з відкритими ранами на шкірі або поганим самопочуттям поки їх стан не нормалізується.

##### ДР 1.2 Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

##### ДР 1.2.1 Приготування миючих розчинів

Для біотехнологічного виробництва використовується універсальний миючий засіб для миття усіх видів поверхонь "Бланідас". Для очистки цехів та лабораторних приміщень готується 0,5% розчин миючого засобу у теплій воді кімнатної температури. Для миття обладнання готують 1% розчин.

##### ДР 1.2.2 Приготування дезінфікуючих розчинів

На виробництві здійснюють щоденне та генеральне прибирання. Для щоденного прибирання готується 3% розчин їдкого натру, а для генерального – 6% розчин

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

їдкого натру. Кожного кварталу дезінфікуючий розчин змінюють на альтернативний, наприклад пероксид водню, який готується в концентраціях 3% і 6%. Для знезараження матеріалів, що несуть біологічну небезпеку, використовують ємність, яка на 1/3 заповнена 3% розчином їдкого натру. Також використовується дезінфікуючий розчин “Віросан Макс”(діючі речовини: глутаровий альдегід, бензалконія хлорид), який призначений для використання у ветеринарній промисловості. Готують 0,25% розчин для знезараження гладких та шорстких поверхонь, час експозиції не менше ніж 60 хв. Для стерилізації обладнання готують 5% розчин їдкого натру.

### ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

#### ДР 1.3.1 Підготовка цехів

Підготовку цехів необхідно проводити кожен день миючими та дезінфікуючими засобами, що наведені у пункті ДР 1.2. Прибирання починають з очищення стін, усіх робочих поверхонь, а також підлоги. Генеральне прибирання проводять раз на рік, змінюючи концентрацію дезінфектанта та додатково миючи малодоступні місця. Інвентар використовується так, щоб він не став джерелом контамінації.

#### ДР 1.3.2 Підготовка лабораторій

Підготовка лабораторій проводиться кожен день миючими та дезінфікуючими засобами, що наведені у пункті ДР 1.2. Прибирання починають з очищення стін, усіх робочих поверхонь, а також підлоги. Генеральне прибирання проводять раз на рік, змінюючи концентрацію дезінфектанта та додатково протирають малодоступні місця. Інвентар використовується так, щоб він не став джерелом контамінації. 1 раз на день проводиться прибирання миючо-дезінфікуючим розчином “Віросан Макс. Також раз на тиждень проводять фумігацію. Для профілактичної або вимушеної дезінфекції при інфекційних захворюваннях бактеріальної та вірусної етіології методом туманоутворення (аерозольного розпилення) використовують водний розчин препарату “Віросан Макс” (до 1 л

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

препарату додають 4 л води на 1000 м3 об'єму приміщення). Робочий розчин розпилюють при вимкнутій вентиляції з часом експозиції – 3 години. Туманоутворення можна проводити як холодним, так і термічним способом з використанням туманогенераторів.

#### ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

##### ДР 1.4.1 Миття обладнання та комунікацій

Миття устаткування проводять наступним чином. Спочатку миють водою (холодною/гарячою), упродовж двох хвилин з передачею води у «збірник нейтралізації», перед скидом рідини у систему каналізування рідких викидів.

Миття продовжують розчином лугу 5%, упродовж 10 хвилин при 40°C, з поверненням (рецикл) розчину в збірник нейтралізації. Проводиться ополіскування «очищеною» - демінералізованою або пом'якшеною водою, з передачею води в збірник нейтралізації.

##### ДР 1.4.2 Перевірка на герметичність

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,5 – 0,6 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (за манометром) не знижується, обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,5 до 0,6 МПа.

##### ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання

Стерилізацію ферментеру проводять шляхом подання гострої пари при  $t = 140$  °C і тиску 0,2 МПа, впродовж 30 хв. Після стерилізації конденсат, що утворився, подається до знешкодження відходів.

#### ДР 2. Підготовка повітря

##### ДР 2.1 Забір повітря з атмосфери

Залежно від пори року, місця забору, повітря міститиме різну кількість аерозольного забруднення, тому забір атмосферного повітря здійснюють через повітря забірний пристрій у найвищій точці на висоті 10 м.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## ДР 2.2 Очищення повітря від пилу та механічних часток

Очистку повітря здійснюють за допомогою ситових фільтрів Рекка. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор. Ступінь очистки становить  $E = 60 \%$ .

## ДР 2.3 Очистка повітря на головному фільтрі

Основне навантаження по видалення контамінантів мікробного походження та механічних часток з діаметром менше 5 мкм припадає на головний фільтр об'ємом 5 м<sup>3</sup>. В якості фільтруючого матеріалу використовують скловолокно з діаметром 21 мкм.

## ДР 2.4 Очистка повітря на індивідуальному фільтрі

Фільтри тонкої очистки необхідні для уловлювання основної маса біологічних забруднень діаметром менше 0,3 мкм пропущених іншими фільтрами, а також всіх інших можливих забруднень, що потрапили в систему випадково. Очищення проводиться у глибинному фільтрі із застосуванням патронних систем з тканиною Петрянова.

## ДР 3. Приготування поживного середовища

### ДР 3.1 Приготування ПС для вирощування посівного матеріалу

#### ДР 3.1.1 Приготування композиції поживного середовища

Усі сольові компоненти середовища та соєве борошно подаються дозатором у реактор-змішувач. Глюкоза додається окремо. Перемішування проводять лопатевою мішалкою протягом 20 хв при 30-40 об/хв після внесення всіх компонентів середовища. рН середовища необхідне бути в межах 6,8-7,2, а температура  $t = 80^{\circ}\text{C}$ .

#### ДР 3.1.2 Стерилізація поживного середовища

Стерилізація ПС з ДР3.1.1 здійснюється в реакторі-змішувачі термічним способом з використанням гострої пари. Параметри стерилізації:  $t = 125^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 0,1 \text{ МПа}$ ,  $\tau = 15 \text{ хв}$ . Стерилізація розчину глюкози відбувається окремо, у більш м'якому режимі:  $t = 110^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 0,08 \text{ МПа}$ ,  $\tau = 8 \text{ хв}$ .

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### ДР 3.2 Приготування ПС для процесу біосинтезу

#### ДР 3.2.1 Приготування композиції поживного середовища

Усі сольові компоненти середовища, а також крохмаль та соєве борошно подаються дозатором у реактор-змішувач. Перемішування проводять лопатевою мішалкою протягом 20 хв при 30-40 об/хв після внесення всіх компонентів середовища. рН середовища необхідне бути в межах 6,8-7,2, а температура  $t = 80^{\circ}\text{C}$ .

#### ДР 3.2.2 Стерилізація поживного середовища

Стерилізація ПС з ДР3.2.1 здійснюється в реакторі-змішувачі термічним способом з використанням гострої пари. Параметри стерилізації:  $t = 125^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 0,1\text{ МПа}$ ,  $\tau = 15\text{ хв}$ .

### ДР 4. Підготовка посівного матеріалу

#### ДР 4.1 Відновлення музейної культури

Якщо штам *S. albus 2435/M* зберігали в ліофілізованому вигляді у запаяних ампулах, то його стерильно висівають на середовище Гаузе та інкубують в термостаті при температурі  $28^{\circ}\text{C}$  протягом 120 годин. Після цього візуально оцінюють культуральні властивості (розмір, форму, краї, поверхню, колір, прозорість колоній), мікроскопічні та морфологічні ознаки продуценту, перевіряючи мікробіологічну чистоту.

Якщо культура зберігалась на середовищі Гаузе при  $t=4^{\circ}\text{C}$ , то штам пересівають стерильно у пробірки зі свіжим агаризованим середовищем та інкубують протягом 7 діб при температурі  $28^{\circ}\text{C}$ .

#### ДР 4.2 Вирощування посівного матеріалу в колбах

З вирощеної культури з ДР 4.1 готують суспензію, яку стерильно переносять у качалочні колби зі стерильним поживним середовищем приготованим для вирощування посівного матеріалу з ДР 3.1. Колби переносять у термостат з температурою  $28^{\circ}\text{C}$  та ставлять їх на качалки із частотою обертання 220–290 об/хв. Культура росте протягом 2 діб.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

#### ДР 4.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Після 48 годин інкубування, посівний матеріал з ДР 4.2 переносять в інокулятор в якому вже є стерильне поживне середовище з ДР 3.1.2. Культивування проводиться при температурі 28°C протягом 2 діб, з перемішуванням за допомогою турбінної мішалки із частотою обертання 220 об./хв. та аерацією очищеним повітрям, яка забезпечується барботером.

На даному етапі проводять контроль мікробіологічної чистоти отриманого посівного матеріалу.

#### ТП 5. Виробничий біосинтез

Стадія процесу біосинтезу починається із заповнення ферментера стерильним поживним середовищем із ДР 3.1.2. Заповнення виконується на 60% від об'єму апарату.

Внесення посівного матеріалу є також не менш важливим етапом. Його об'єм має бути не менше 10% від об'єму поживного середовища.

Процес біосинтезу відбувається при температурі 28°C протягом 3 діб та при значенні рН в межах 6,8-7,2. Аерація повинна забезпечувати об'єм повітря на 40% від об'єму культуральної рідини. Перемішування забезпечується за допомогою турбінної мішалки, а аерація – подачею стерильного повітря.

В процесі біосинтезу відбираються проби для визначення мікробіологічної чистоти культуральної рідини. Результатом виробничого біосинтезу є отримання культуральної рідини з концентрацією продукту не менше 3000 од/мл.

#### ТП 6. Відділення біомаси фільтруванням

Відділення біомаси відбувається шляхом фільтрування на фільтрі ФПАКМ. Міцелій, відділений від культуральної рідини направляється на знешкодження, а фільтрат переміщується на процес концентрування. Втрати ферментів = 2%

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

#### ТП 7. Концентрування фільтрату вакуум-випарюванням

Концентрування ферментного препарату виконують на допомогу вакуум-випарної установки  $t_{\text{кип}} \sim 28-30^\circ\text{C}$  під вакуумом при короткотривалому контакті рідини з нагрівачем. Перед вакуум-випарюванням необхідно стабілізувати продукт (0,1-0,3%  $\text{CaCl}_2$ ). Кратність концентрування 2-3 рази.

#### ТП 8. Внесення наповнювача

Перед сушінням препарату, необхідно підвищити термостійкість концентрату. Для цього використовують речовини-стабілізатори, які зв'язуються з ферментами, змінюючи їх структуру, в результаті чого вони стають стійкішими до дії високих температур. В якості наповнювача та стабілізатора перед процесом сушіння використовують розчин  $\text{NaCl}$  з концентрацією 3%.

#### ТП 9. Сушіння препарату

Процес сушіння препарату відбувається у розпилювальній сушарці. Концентрат подається у апарат, після чого контактує з гарячим повітрям. Продукт опускається на дно, звідки виводиться. В результаті отримується висушений ферментний препарат. Параметри сушіння:  $t_{\text{вх.}} = 130^\circ\text{C}$ ,  $t_{\text{вих.}} = 70^\circ\text{C}$ ,  $w = 8\%$ .

#### ТП 10. Фасування, пакування, маркування

Фасування порошку кормового препарату відбувається на автоматичній лінії за допомогою пакувальної машини. Порошок фасується у поліетиленові пакети по 1 кг згідно з ГОСТ Р 57249-2016.

#### ПВ 11. Переробка відходів

Деякі матеріали здатні очищуватись та повторно використовуватись у процесі виробництва: фільтри для очистки повітря, воду та повітря необхідно очищати та повторно використовувати. На виробництві сортують папір, скло, пластик, органічні відходи, які передають на заводи по переробці сміття.

#### ЗВ 12. Знешкодження відходів

Для того, щоб запобігти епідемії, епізоотії необхідно знезаражувати усі біологічно заражені патогенними мікроорганізмами матеріали. Для цього їх

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						53
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

автоклавують при високих температурах. Для знешкодження хімічних сполук використовують солі, що нейтралізують небезпечні речовини або утилізують з сильним потоком води.

#### 4.4 Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва розрахований на серію кормового ферментного препарату, що фасується у поліетиленові пакети по 1 кг.

Таблиця 4.2 – Матеріальний баланс виробництва кормового ферментного препарату (стадії основного технологічного процесу).

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ТП5	Посівний матеріал			180	ТП5	Культуральна рідина			1710
	Поживне середовище			1620		Втрати(5%)			90
	Всього:			1800		Всього:			1800
ТП6	Культуральна рідина			1710	ТП6	Біомаса			420
						Фугат			1205
						Втрати(5%)			85
	Всього:			1710		Всього:			1710
ТП7	Фугат			1205	ТП7	Концентрат			400
						Вода			780
						Втрати(2%)			25
	Всього:			1205		Всього:			1205

ТП8	Концентра т			400	ТП8	Суспензія препарату			404
	Наповнюв ач	12				Втрати(2%)			8
	Всього:	12		400		Всього:			412
ТП9	Суспензія препарату			404	ТП9	Сухий препарат	41		
						Конденсат води			343
						Втрати(5%)			20
	Всього:			404		Всього:	41		363
ПМВ 10	Сухий препарат	41			ПМВ 10	Запаковани й препарат	40		
	Поліетиле нові пакети		40			Поліетиле нові пакети		40	
						Втрати(2%)	1		
	Всього:	41	40				41	40	

#### 4.5 Контроль виробництва

Номер стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.2 Приготування миючих розчинів Кх 1.2.1	Водний розчин препарату "Віросан Макс"	За допомогою дозатору	Кожну операцію	0,1 г/дм <sup>3</sup>
ДР 1.2 Приготування дезінфікуючих розчинів Кх 1.2.2	Розчин їдкового натру	За допомогою дозатору	Кожну операцію	3 г/дм <sup>3</sup> 5 г/дм <sup>3</sup>
	Розчин перексиду водню	За допомогою дозатору	Кожну операцію	6 г/дм <sup>3</sup>

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Км 1.3.1	Кількість мікроргані змів в повітрі	Висів на чашку Петрі	1 раз на місяць	<500 КУО/м <sup>3</sup>
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Км 1.3.2	Кількість МО в повітрі	Висів на чашку Петрі	1 раз в тиждень	<500 КУО/м <sup>3</sup>
ДР 1.4 Підготовка комунікацій та обладнання Кт 1.4.2	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,5-0,6 МПа
ДР 1.4 Підготовка комунікацій та обладнання Кт 1.4.3	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
	Час	Годинник	Кожну операцію	30 хв.
	Температура	Термометр	Кожну операцію	140°С
ДР 2 Підготовка стерильного повітря Кт 2	Надлишковий тиск у системі	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 3.1 Підготовка ПС для вирощування ПМ Кх 3.1.1	Концентрація компонентів ПС	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
ДР 3.1 Підготовка ПС для вирощування ПМ Кт 3.1.1	рН	рН-метр	Кожну операцію	6,8-7,2
	Час	Годинник	Кожну операцію	20 хв.
	Температура	Термометр	Кожну операцію	80°С

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

ДР 3.1 Підготовка ПС для виращування ПМ Км 3.1.2	Стерильність	Висів на чашку Петрі	Кожну операцію	Відсутність росту мікрофлори
ДР 3.2 Підготовка ПС для процесу біосинтезу Кх 3.2.1	Концентрація компонентів ПС	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
ДР 3.2 Підготовка ПС для процесу біосинтезу Кх 3.2.1	рН	рН-метр	Кожну операцію	6,8-7,2
	Час	Годинник	Кожну операцію	20 хв.
	Температура	Термометр	Кожну операцію	80°С
ДР 3.2 Підготовка ПС для процесу біосинтезу Кх 3.2.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,08 МПа
	Час	Годинник	Кожну операцію	8 хв.
	Температура	Термометр	Кожну операцію	110°С
ДР 3.2 Підготовка ПС для процесу біосинтезу Кх 3.2.1	Стерильність	Висів на чашку Петрі	Кожну операцію	Відсутність росту мікрофлори
ДР 4 Підготовка посівного матеріалу Км 4.1	Мікробіоло гічна чистота	Висів на чашку Петрі	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4 Підготовка посівного матеріалу Кт 4.1	Час	Годинник	Кожну операцію	48 год
	Температура	Термометр	Кожну операцію	28°С

ДР 4 Підготовка посівного матеріалу Км 4.2	Мікробіоло гічна чистота	Висів на чашку Петрі	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4 Підготовка посівного матеріалу Кт 4.2	Час	Годинник	Кожну операцію	48 год
	Температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
ДР 4 Підготовка посівного матеріалу Км 4.3	Мікробіоло гічна чистота	Висів на чашку Петрі	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4 Підготовка посівного матеріалу Кт 4.3	Час	Годинник	Кожну операцію	48 год
	Температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
ТП 5 Виробничий біосинтез Кх 5	Аерація	Ротаметр	Кожну операцію	40% від КР
ТП 5 Виробничий біосинтез Км 5	Мікробіоло гічна чистота	Висів на чашку Петрі	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 5 Виробничий біосинтез Кт 5	рН	рН-метр	Кожну операцію	6,8-7,2
	Час	Годинник	Кожну операцію	72 год
	Температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
	Концентрація продукту	Турбідн метричний метод	Кожну операцію	3000 од./мл

ТП 6 Відділення біомаси фільтрацією Кт 6	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,8-1,5 МПа
ТП 7 Концентрування фільтрату вакуум- випарюванням Кт 7	Температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
	Тиск	Манометр	Кожну операцію	4 кПа
ТП 8 Внесення наповнювача Кх 8	Розчин хлористого натрію	За допомогою дозатору	Кожну операцію	3 г/дм <sup>3</sup>
ТП 9 Розпилювальне сушіння препарату Кт 9	Температура вхідна	Термометр	Кожну операцію	130°C
	Температура вихідна	Термометр	Кожну операцію	70°C
	Вологість	Вологомір	Кожну операцію	8%
ПМВ10 Фасування, пакування, маркування	Маса продукту	Ваговий дозатор	Кожну операцію	1 кг

## РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

### 5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Основною метою процесу біосинтезу, є отримання максимальної кількості кормового ферментного препарату з високим вмістом гідролітичних ензимів. Для досягнення даної цілі необхідно забезпечити усі умови для покращення синтетичних властивостей біологічного агента *S. albus*, основними з яких є: достатня кількість вуглецевого та азотного субстратів, аерація, фізичні параметри, перемішування, частка макро- та мікроелементів.

Для вирощування аеробних мікроорганізмів глибинним методом культивування, необхідно забезпечити інтенсивну масопередачу кисню із газової фази до клітин, що можна досягнути при активному перемішуванні та аерації культуральної рідини. Перемішування необхідне для:

- Інтенсифікації масопередачі газ-рідина та рідина-клітина;
- Інтенсифікації теплопередачі;
- Вирівнювання температури в об'ємі середовища;
- Вирівнювання концентрації поживних речовин в об'ємі середовища [44].

Перемішування буває гідравлічне, пневматичне та механічне. Механічне перемішування здійснюється за допомогою мішалок, поточне – потоком рідини, а пневматичне – газом або водяною парою [45].

Ферментери з пневматичним перемішуванням прості за конструкцією. Вони не мають мішалок, але оскільки рух має вертикальний напрямок, повітря виходить із рідини, що збільшує затрати стерильного повітря. Вони застосовуються, якщо треба досягати високого коефіцієнту масообміну з киснем,

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Нагорна О.С.				<i>РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ</i>	Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.							60	82
Керівник	Тодосійчук Т.С.					<b>НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ</b>		
Затвер.								

а рідина не є в'язкою. Перевагами є: простота конструкції, надійність. У даного апарату є багато недоліків: велика затрата повітря, нерівномірне розподілення поживних речовин. Тому перемішування середовища тільки за допомогою барботеру можливе, якщо не потрібна висока активність росту культури.

Струменеві ферментери не є досить поширеними. Їх суть роботи заключається в тому, що за допомогою циркуляційного насосу рідина засмоктується з нижньої частини корпусу та через трубопровід підводиться до аеруючого пристрою. За його допомогою засмоктується повітря, кількість якого залежить від будови приладу. Збагачена киснем рідина у вигляді струменю доходить до дна верхньої реакційної камери та утворює в культуральній рідині інтенсивні турбулентні поля.

Ферментери з механічним перемішуванням різняться різними конструкціями мішалок, а також типом потоку рідини, що створюється. При тангенціальній течії рідина в апараті рухається паралельно площині обертання мішалки. Радіальним є рух, що утворюється від мішалки до стінки апарату. Осьовим є рух паралельно осі обертання мішалки.

При високих швидкостях утворюється воронка навколо валу. Для запобігання даного явища використовують спеціальні перегородки, що відбивають потік рідини, тим самим зменшуючи вихру [46].

Існують різні типи мішалок (рис.5.1):

- лопатеві
- пропелерні
- турбінні
- спеціальні (якірні, рамні, гвинтові та ін.)

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

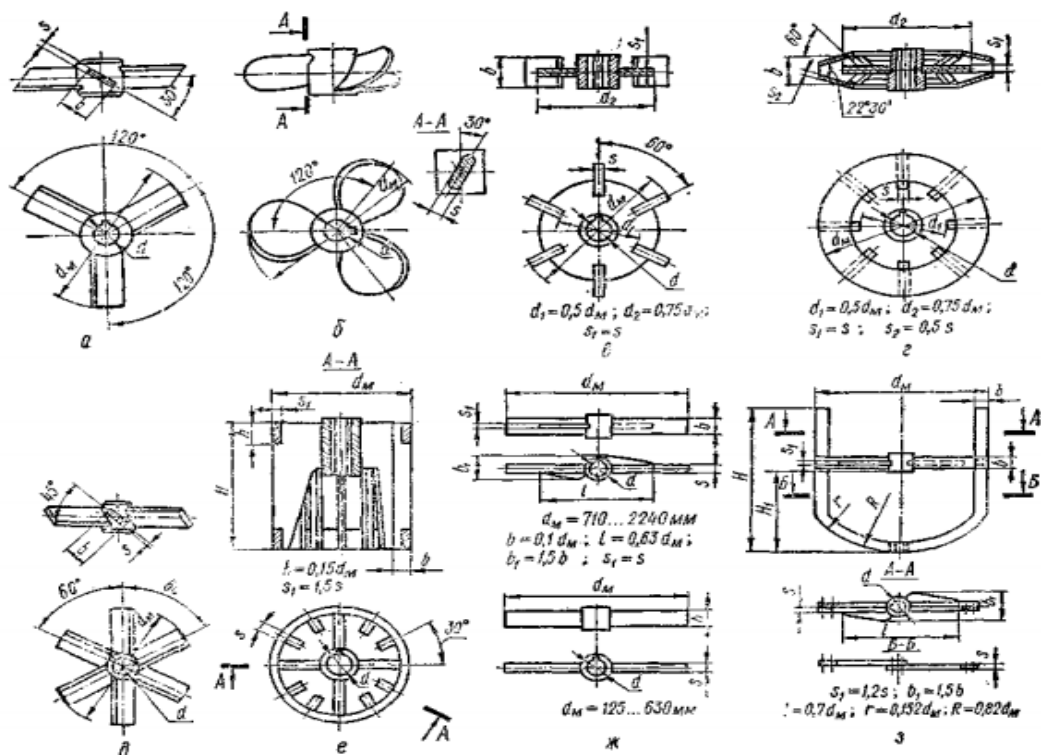


Рисунок 5.1 – Типи мішалок( а,д,ж – лопатева, б – гвинтова, в,г – турбінна, з – рамна) [45].

Конструкція перемішуючого пристрою складається мішалки, приводу та валу, який передає обертання від приводу до мішалки. Вона повинна забезпечувати створення турбулентних пульсації за допомогою енергії. Чим вища швидкість мішалки та чим менша її довжина, тим більша частина енергії перетворюється в турбулентний потік. Щоб забезпечити перемішування по всьому об'єму ферментеру, використовують багатоярусні мішалки. Потужність електродвигуна та частота обертання повинна забезпечувати усі цілі перемішування та відповідати нормативним документам.

Лопатеві мішалки створюють в апаратах тангенціальні та радіальні потоки, застосовуються для перемішування взаєморозчинних малов'язких рідин ( $\mu < 0,05$  Па·с), розчинення кристалічних речовин. Її перевагами є простота конструкції, надійність в роботі та енергоємність.

						ДП 7115. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			62

Пропелерні мішалки створюють в апараті переважно осьові потоки і застосовуються для інтенсивного перемішування малов'язких рідин, приготування суспензій на емульсії ( $\mu < 1$  Па·с для відкритих та  $\mu < 5$  Па·с для закритих мішалок).

Турбінні мішалки бувають закритого та відкритого типу. Вони створюють в апараті переважно радіальні потоки, а при розміщенні лопастей під кутом— також осьові, застосовуються для інтенсивного перемішування в'язких рідин. Для турбінних мішалок характерне інтенсивне та ефективне перемішування, придатність для організації безперервних потоків. Недоліками є складність виготовлення, висока енергоємність, висока вартість.

До спеціальних відносяться мішалки, які не є досить поширеними або використовуються для реалізації конкретних процесів [47].

Найбільш підходящою конструкцією для вирощування *S. albus* є ферментер з барботером та механічною мішалкою (рис 5.2). Турбінна мішалка забезпечить ефективне диспергування повітря при найвищому ступені турбулізації.

Апарат має такі штуцери: для входу поживного середовища, для барботеру, для виходу готового продукту, для входу теплоносія, резервний штуцер у сорочці, технологічний штуцер, для виходу теплоносія, для входу посівного матеріалу, для труби передавлювання. Апарати виготовляють із сальниковими ущільненнями, які не є токсичними. Для підтримання постійної температури, ферментер оснащений сорочкою суцільного типу. Труба передавлювання необхідна щоб створити перепад тисків, для вивантаження посівного матеріалу.

Для виготовлення ферментеру використовується два різних види сталі. Нержавіюча сталь марки 08X16H11M3 застосовується для частин, які безпосередньо контактують із продуктом. Містить у своєму складі низький вміст Карбону та високий вміст Хрому.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

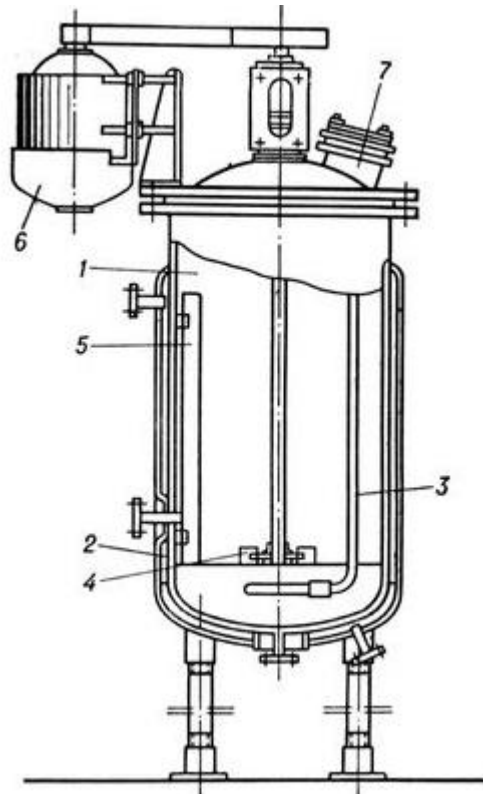


Рисунок 5.2 – Конструкція з барботером та механічним перемішуючим пристроєм(1– корпус, 2 – парова сорочка, 3 – барботер, 4 – мішалка, 5 – відбійник, 6 – електропривід, 7 – завантажувальний люк) [48].

Витримує високі температури та тиск 115-234 МПа. Завдяки Молібдену у своєму складі (2,5%) характеризується корозійною стійкістю та стійкістю до агресивних середовищ.

Для частинок, що не контактують безпосередньо з продуктом, використовують сталь марки 08X18N10. Вона є нержавіючою, містить низький вміст Карбону, та високий вміст Хрому та Нікелю. Вона є стійкою до кислот та до короткочасного підвищення високих температур до 900°C. Завдяки високому вмісту Хрому, на поверхні сталі утворюється оксидний шар, що забезпечує стійкість до різних хімічних речовин. Дане співвідношення металів забезпечує антиферомагнітні властивості.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

## 5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Для проведення процесу біосинтезу біологічного агенту *S. albus* було обрано ферментний апарат об'ємом 3000 м<sup>3</sup>. До конструкції входить турбінна мішалка та барботер.

### Конструктивний розрахунок ферментера

Номінальний об'єм:  $V_n = 3000 \text{ л} = 3 \text{ м}^3$ ;

Коефіцієнт заповнення:  $K_z = 0,6$ ;

1. Робочий об'єм за формулою становить:

$$V_p = V_n \cdot K_z = 3 \cdot 0,6 = 1,8 \text{ м}^3.$$

Згідно з нормативним документом ГОСТ 20680-75 для вертикальних апаратів з механічними перемішуючими пристроями:

$$D_{\text{вн}} = 1,6 \text{ м} = 1600 \text{ мм}.$$

2. Висота корпусу апарата за ГОСТ 20680-75 становить:

$$H = 1,85 \text{ м} = 1850 \text{ мм}.$$

Еліптичні днища за ГОСТ 6533-78 для апарата вказаного діаметра мають наступні характеристики:

- внутрішній діаметр:  $D_v = 1,6 \text{ м}$ ;
- висота еліптичної частини:  $h_v = 0,4 \text{ м}$ ;
- висота відбортованої частини:  $h_1 = 0,025 \text{ м}$ ;
- товщина стінки:  $s = 0,01 \text{ м}$ ;
- об'єм днища:  $V_{\text{дн}} = 0,587 \text{ м}^3$ ;
- маса днища:  $m_{\text{дн}} = 138 \text{ кг}$ .

3. Висота еліптичної частини днища становить:

$$H_{\text{ел.}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн.}} = 0,25 \cdot 1,6 = 0,4 \text{ м}.$$

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4. Повна висота днища становить:

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_b = 0,025 + 0,4 = 0,425 \text{ м.}$$

5. Об'єм циліндричної частини ферментера становить:

$$V_{\text{ц}} = V - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 3 - 2 \cdot 0,587 = 1,832 \text{ м}^3.$$

6. Висота циліндричної частини становить:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{ВН}}^2} = \frac{1,832 \cdot 4}{3,14 \cdot 1,6^2} = 0,916 \text{ м.}$$

7. Висота рідини в циліндричній частині становить:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4 \cdot K_3 \cdot V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D_{\text{ВН}}^2} = \frac{4 \cdot 0,6 \cdot 1,832}{3,14 \cdot 1,6^2} = 0,547 \text{ м.}$$

8. Висота рівня рідини в реакторі становить:

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot (V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_{\text{ВН}}^2} + H_{\text{осн}} + h_b = \frac{4 \cdot (1,6 - 0,587)}{3,14 \cdot 1,6^2} + 0,025 + 0,4 = 0,931 \text{ м.}$$

9. Загальна висота апарата становить:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot H = 0,916 + 2 \cdot 0,425 = 1,766 \text{ м.}$$

Розрахунок перемішуючого пристрою:

10. Визначаємо діаметр мішалки:

$$d_{\text{м}} = \frac{D}{4} = \frac{1,6}{4} = 0,4 \text{ м.}$$

Відповідно до вищезазначених вимог визначаємо геометричні розміри обраного перемішуючого пристрою:

- Висота:

$$h_{\text{м}} = 0,2 \cdot d_{\text{м}} = 0,2 \cdot 0,4 = 0,08 \text{ м;}$$

- Висота прикріплення:

$$h_{\text{м}} = 0,6 \cdot d_{\text{м}} = 0,6 \cdot 0,4 = 0,24 \text{ м;}$$

- Ширина лопасті:

$$l = 0,25 \cdot d_{\text{м}} = 0,25 \cdot 0,4 = 0,1 \text{ м;}$$

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки:  $\xi_M = 8,4$ ;

11. Визначаємо центробіжний критерій Рейнольдса:

$$Re_{ц} = \frac{\rho_c \cdot n \cdot D_M^2}{\mu_c} = \frac{1056 \cdot 5 \cdot 0,4^2}{0,00134} = 630448 = 6,3 \cdot 10^5 .$$

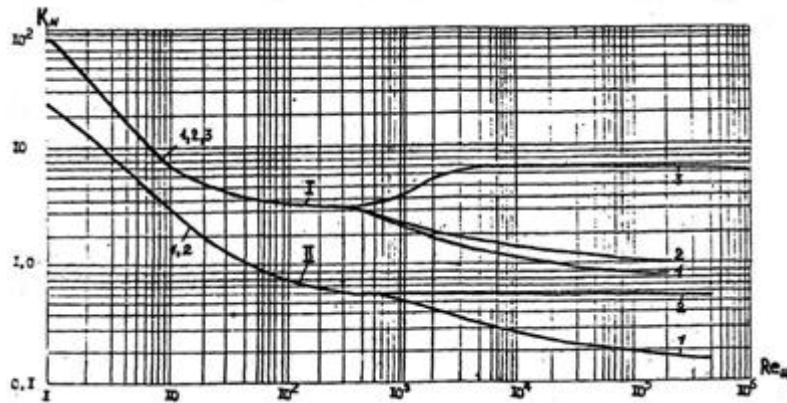


Рисунок 5.3 – Число  $K_N = f(Re)$  [49].

12. Потужність, що витрачається на перемішування визначається:

$$N = K_N \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 1 \cdot 1056 \cdot 5^3 \cdot 0,4^5 = 1352 \text{ Вт} = 1,4 \text{ кВт}.$$

За даним рисунком 5.3  $K_N = 1$ .

Розрахунок барботеру

- Висота барботажного пристрою:

$$h_b = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,4 = 0,1 \text{ м};$$

- Діаметр, на якому розміщені отвори в барботері:

$$D_0 = 0,5 \cdot d_m = 0,5 \cdot 0,4 = 0,2 \text{ м};$$

- Діаметр отвору барботера:  $d_0 = 2-5 \text{ мм}$ .

- Відстань від мішалки до барботеру:

$$h_c = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,4 = 0,1 \text{ м}.$$

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 7115. 00.000 ПЗ

Арк.

67

## Тепловий розрахунок ферментера

Вихідні дані:

- Густина поживного середовища:  $\rho_{\text{пс}} = 1056 \text{ кг/м}^3$ ;
- Температура поживного середовища:  $t_{\text{пс}} = t_{\text{пм}} = t_{\text{кр}} = 28^\circ\text{C}$ ;
- Тривалість культивування  $\tau = 72 \text{ год} = 259200 \text{ с}$ ;
- Теплоємність повітря:  $C_{\text{пов}} = 1000 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{К)}$ ;
- Теплоємність води:  $C_{\text{т}} = 4200 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{К)}$ ;

13. Розрахунок об'ємів поживного середовища і посівного матеріалу:

$$V_p = V_{\text{пм}} + V_{\text{пс}};$$

$$V_{\text{пс}} = 0,9 \cdot V_p = 0,9 \cdot 1,8 = 1,62 \text{ м}^3;$$

$$V_{\text{пм}} = 0,1 \cdot V_p = 0,1 \cdot 1,8 = 0,18 \text{ м}^3;$$

$$\rho_{\text{пм}} = \rho_{\text{пс}} = \rho_{\text{кр}};$$

$$c_{\text{пм}} = c_{\text{пс}} = c_{\text{кр}} = 3820 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{К)}.$$

14. Розрахунок маси поживного середовища, посівного матеріалу, культуральної рідини

$$M_{\text{кр}} = \rho_{\text{кр}} \cdot V_{\text{кр}} = 1056 \cdot 1,8 = 1901 \text{ кг};$$

$$M_{\text{пм}} = 0,1 \cdot M_{\text{кр}} = 0,1 \cdot 1901 = 190,1 \text{ кг};$$

$$M_{\text{пс}} = M_{\text{кр}} - M_{\text{пм}} = 1901 - 190,1 = 1710,9 \text{ кг}.$$

Розрахунок теплового балансу:

1. Енергія у ферментері утворюється завдяки надходженню поживного середовища, посівного матеріалу та повітря:

$$E = M \cdot C \cdot t;$$

$$E_{\text{пс}} = 1711 \cdot 3820 \cdot 28 = 183 \text{ МДж};$$

$$E_{\text{пм}} = 21 \cdot 3820 \cdot 28 = 20 \text{ МДж};$$

$$E_{\text{пов}} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}} = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}};$$

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

де

$\rho_{пов} = 1,17 \text{ кг/м}^3$  – густина повітря при температурі  $28^\circ\text{C}$ ,

$C_{пов} = 1000 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$  – питома теплоємність повітря,

$t_{пов} = 28^\circ\text{C}$  – початкова температура повітря,

$\tau_{пр} = 72 \text{ год} = 259200 \text{ с}$  – тривалість процесу культивування,

$V_{\Gamma} = 0,06 \text{ м}^3/\text{с}$  – витрати повітря,

$$E_{пов_1} = 1,17 \cdot 0,06 \cdot 259200 \cdot 1000 \cdot 28 = 51,5 \text{ МДж.}$$

15. Також енергія утворюється теплотою, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від повітря та перемішуючих пристроїв:

$$\begin{aligned} E_{дис_2} &= V_{\Gamma} \cdot \Delta p \cdot \tau_{пр} = V_{\Gamma} \cdot \rho_c \cdot g \cdot H_p \cdot \tau_{пр} = \\ &= 0,06 \cdot 1056 \cdot 9,81 \cdot 0,931 \cdot 259200 = 149,9 \text{ МДж}; \end{aligned}$$

$$E_{дис_1} = N \cdot \tau = 1400 \cdot 259200 = 362,8 \text{ МДж.}$$

16. Сумарна кількість надходження теплоти ферментера за формулою:

$$\begin{aligned} \sum E_{надх} &= E_{пс} + E_{пм} + E_{пов_1} + E_{дис_1} + E_{дис_2} = \\ &183 + 20 + 51,5 + 149,9 + 362,8 = 767,2 \text{ МДж.} \end{aligned}$$

17. Витрати теплової енергії здійснюються:

- З культуральною рідиною:

$$E_{к} = M_{пм} \cdot C_{к} \cdot t_{к} = 1901 \cdot 3820 \cdot 28 = 203 \text{ МДж};$$

- З повітрям:

$$\begin{aligned} E_{пов_2} &= M_{пов} \cdot C_{пов} \cdot t_c = \rho_{пов} \cdot V_{\Gamma} \cdot \tau_{пр} \cdot C_{пов} \cdot t_c = 1,17 \cdot 0,06 \cdot 259200 \cdot 1000 \cdot \\ &28 = 509,5 \text{ МДж}; \end{aligned}$$

- Втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{втр} = 0,02 \cdot (E_{к} + E_{пов_2}) = 0,02 \cdot (203 + 509,5) = 14,25 \text{ МДж.}$$

18. Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{витрат} = E_{к} + E_{пов_2} + E_{втр} = 203 + 509,5 + 14,25 = 726,75 \text{ МДж.}$$

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

19.Рівняння теплового балансу:

$$E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов1}} + E_{\text{дис1}} + E_{\text{дис2}} + E_{\text{р}} + E_{\text{Т1}} = E_{\text{к}} + E_{\text{пари}} + E_{\text{пов2}} + E_{\text{втр}} + E_{\text{Т2}};$$

$$E_{\text{Т1}} - E_{\text{Т2}} = M_{\text{Т}} \cdot C_{\text{Т}} \cdot (t_{\text{Т1}} - t_{\text{Т2}}) = E_{\text{втр}} - E_{\text{надх}};$$

$E_{\text{втр}} < E_{\text{надх}}$ , відповідно середовища в апараті необхідно охолоджувати.

Визначаємо початкову та кінцеву температуру теплоносія. Оскільки у ферментері відбувається процес нагрівання, то:

$$t_{\text{кр}} - \Delta t_{\text{ср}} = t_{\text{Т}};$$

$$t_{\text{Т}} = t_{\text{кр}} - 10 \text{ }^{\circ}\text{C} = 28 - 10 = 18 \text{ }^{\circ}\text{C};$$

$$t_{\text{Т1}} = t_{\text{ср}} + 1 \text{ }^{\circ}\text{C} = 18 + 1 = 19 \text{ }^{\circ}\text{C};$$

$$t_{\text{Т2}} = t_{\text{ср}} - 1 \text{ }^{\circ}\text{C} = 18 - 1 = 17 \text{ }^{\circ}\text{C};$$

Тоді:

$$M_{\text{Т}} \cdot C_{\text{Т}} \cdot (19 - 17) = 726,75 \text{ МДж};$$

$$M_{\text{Т}} \cdot C_{\text{Т}} = 363,37 \text{ МДж};$$

$$M_{\text{Т}} = \frac{M_{\text{Т}} \cdot C_{\text{Т}}}{C_{\text{Т}}} = \frac{363\,370\,000}{4200} = 86517,9 \text{ кг.}$$

20.Масові витрати теплоносія за формулою :

$$G_{\text{Т}} = \frac{M_{\text{Т}}}{\tau \cdot 3600} = \frac{86517,9}{216000} = 0,4 \text{ кг/с};$$

$$W_{\text{Т}} = \frac{G_{\text{Т}}}{1000} = \frac{0,4}{1000} = 0,4 \cdot 10^{-3} \frac{\text{кг}}{\text{с}};$$

Розрахунок параметрів тепловіддачі та теплопередачі

21.Для визначення поверхні теплообміну знаходимо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у ферментері та коефіцієнт теплопередачі:

$$a = \frac{D_{\text{с}} - 2 \cdot \delta_{\text{ст}} - D}{2} = \frac{1,7 - 2 \cdot 0,01 - 1,6}{2} = 0,04 \text{ м};$$

де  $\delta_{\text{ст}} = 0,01 \text{ м}$  – товщина стінки,  $D_{\text{с}} = 1,7 \text{ м}$  – діаметр сорочки ферментер.

$$b = 0,15 - a = 0,15 - 0,04 = 0,11 \text{ м};$$

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$d_{\text{екв.}} = \frac{2ab}{a+b} = \frac{2 \cdot 0,04 \cdot 0,11}{0,04 + 0,11} = 0,059 \text{ м.}$$

22. Середній діаметр ферментера:

$$D_{\text{ср}} = D_c - a = 1,7 - 0,04 = 1,66 \text{ м;}$$

23. Критерій Рейнольдса становить:

$$W_{\Gamma} = \frac{4V_{\Gamma}}{\pi D^2} = \frac{4 \cdot 0,06}{3,14 \cdot 1,6^2} = 0,03 \frac{\text{м}}{\text{с}};$$

$$Re_c = \frac{d_m}{\nu_c} (n \cdot d_m + 4 \cdot W_{\Gamma}) = \frac{0,4}{1,27 \cdot 10^{-6}} (0,67 \cdot 0,4 + 4 \cdot 0,03) = 1,03 \cdot 10^5.$$

24. Критерій Прандтля становить:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c} = \frac{1,34 \cdot 10^{-3} \cdot 3821}{0,52} = 9,9.$$

25. Критерій Нуссельта за формулою становить:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \left( \frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14} = 1,35 \cdot (1,03 \cdot 10^5)^{0,59} \cdot 9,9^{0,38} = 2993,67.$$

26. Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить за формулою:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \cdot \lambda_c}{D} = \frac{2993,67 \cdot 0,52}{1,6} = 972,94 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}.$$

Визначаємо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія

27. Об'ємні витрати теплоносія за формулою:

$$V_{\Gamma} = \frac{G_{\Gamma}}{\rho_{\Gamma}} = \frac{0,4}{998} = 0,0004 \frac{\text{м}^3}{\text{с}}.$$

де  $\rho_{\Gamma} = 998 \text{ кг/м}^3$  – густина теплоносія.

28. Швидкість руху теплоносія за формулою становить:

$$W_{\Gamma} = \frac{V_{\Gamma}}{a \cdot b} = \frac{0,0004}{0,04 \cdot 0,11} = 0,091 \text{ м/с.}$$

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

29. Критерій Рейнольдса за формулою становить:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{\text{екв.}}}{\nu_T} = \frac{0,091 \cdot 0,059}{1,01 \cdot 10^{-6}} = 5315,8.$$

де  $\nu_T = 1,01 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$  – кінематична в'язкість теплоносія;

Так як  $Re_T < 10000$ , то критерій Нуссельта визначаємо за критеріальним рівнянням.

30. Критерій Прандтля за формулою становить:

$$Pr_T = \frac{\mu_T \cdot c_T}{\lambda_T} = \frac{1,000 \cdot 10^{-3} \cdot 4190}{0,599} = 6,99;$$

де  $\mu_T = 1,000 \cdot 10^{-3} \text{ Па}\cdot\text{с}$  – коефіцієнт динамічної в'язкості теплоносія;

$c_T = 4190 \text{ Дж/кг}\cdot\text{К}$  – питома теплоємність теплоносія;

$\lambda_T = 0,599 \frac{\text{Вт}}{\text{м}\cdot\text{К}}$  – питома теплопровідність теплоносія;

Тоді за формулою:

$$Nu_T = 0,037 \cdot Re_T^{0,8} \cdot Pr_T^{0,43} = 0,037 \cdot 5315,8^{0,8} \cdot 6,99^{0,43} = 81,7.$$

31. Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці за формулою становить:

$$\alpha_T = \frac{Nu_T \cdot \lambda_T}{d_{\text{екв.}}} = \frac{81,7 \cdot 0,599}{0,059} = 829,55 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \cdot \text{К}.$$

32. Коефіцієнт теплопередачі становить за формулою:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}} = \frac{1}{\frac{1}{972,94} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{829,55}} = 349,90 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \cdot \text{К}.$$

де  $\lambda_{\text{ст}} = 16 \text{ Вт/м}\cdot\text{К}$  – теплопровідність стінки.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

33. Розрахункова поверхня теплообміну за формулою становить:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{\text{сер}} \cdot \tau_{\text{пр}}} = \frac{363,37 \cdot 10^6}{349,90 \cdot 10 \cdot 259200} = \frac{363\,370\,000}{906940800} = 0,4 \text{ м}^2.$$

34. Визначаємо дійсну поверхню теплообміну за формулою:

$$H_c = H_p - h_{\text{дн.}} = 0,931 - 0,425 = 0,51 \text{ м};$$

$$F_d = \pi \cdot D \cdot H_c = 3,14 \cdot 1,6 \cdot 0,506 = 2,54 \text{ м}^2.$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$F_p < F_d;$$

$$0,4 \text{ м}^2 < 2,54 \text{ м}^2;$$

Можна зробити висновок, що поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи [50].

### 5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Перед початком процесу ферментації, біореактор необхідно заповнити усіма компонентами, що використовуються при біосинтезі, а після закінчення – перемістити на наступні стадії виробництва. Так, за допомогою насосу у ферментер надходить поживне середовище, посівний матеріал, вода для контролю теплообміну, потім культуральна рідина переміщується до стадії фільтрування також із застосуванням даного апарату.

Для переміщення усіх рідин з одного апарату в інший було вибрано конструкцію відцентрового насоса. Відцентровий насос є найбільш динамічною конструкцією серед усіх насосів (рис.5.4).

Основним робочим органом відцентрового насоса є колесо 2, що вільно обертається навколо корпусу 1 та прикріплене до валу 9. Між дисками колеса знаходяться лопаті 3, що з'єднують їх в єдину конструкцію.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

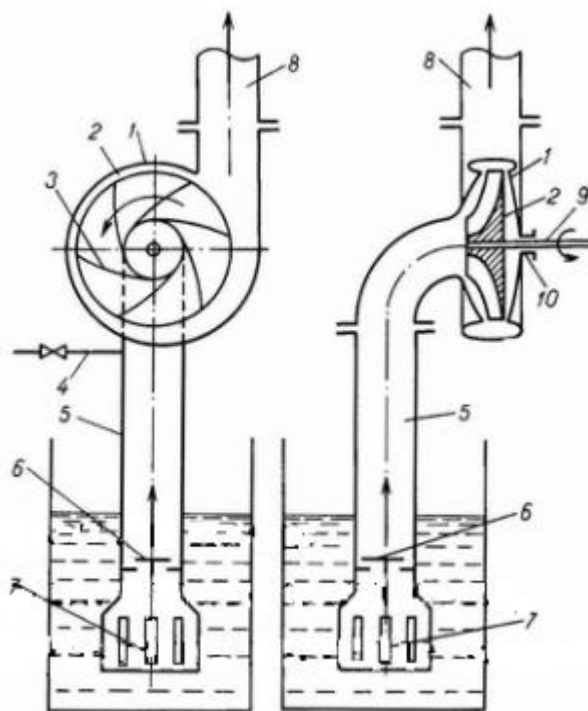


Рисунок 5.4 – Відцентровий насос [51].

Лопаті вигнуті у протилежну сторону напрямку обертання колеса. Поверхні дисків та лопатей утворюють міжлопатеві канали колеса, які при роботі заповнюються рідиною, що перекачується. Всмоктування та нагнітання рідини відбувається безперервно та рівномірно, під дією відцентрових сил, що виникають в процесі обертання колеса.

Для процесу подачі поживного середовища був обраний відцентровий насос “Раско” серії FP, що використовується у харчовій та фармацевтичній промисловості та є стійким до агресивних речовин [51].

Характеристики насосу:

- розміри – 50мм×100мм×150мм
- максимальна продуктивність – 700 м<sup>3</sup>/год
- максимальний натиск – 120 м
- максимальна температура – 130°С

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

Перевагами даної марки відцентрового насосу є те, що він містить певні особливості для застосування у біотехнологічному виробництві:

- для зменшення адгезії, робочі поверхні апарату оброблені за допомогою електрохімічної поліровки
- всередині насосу немає щілин та застійних зон, в яких могли б накопичуватись залишки різних речовин, створюючи місце контамінації
- конструкція агрегату забезпечує турбулентний рух потоку рідини в області ущільнення, необхідне для самоочищення під час роботи насосу
- дизайн насосу є зручним для очистки та дезінфекції робочих поверхонь.

#### **5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища**

При роботі з апаратами, що працюють під надлишковим тиском, необхідно дотримуватись особливих запобіжних заходів. Апарати, що працюють під тиском нижче 67 Па підлягають випробуванням на герметичність під тиском, перевищуючи робочий не менш ніж на 29 кПа. Ферментер повинен бути виготовлений згідно з вимогами технадзору України. Забороняється експлуатація обладнання, у якого прострочений термін періодичного огляду.

До експлуатації обладнання допускаються особи, які пройшли навчання та інструктаж за правилами техніки безпеки.

В зв'язку з тим, що повітря, яке виходить із ферментерів та інокулятора, містить велику кількість спор мікроорганізмів (близько 1000 клітин мікроорганізмів та спор в 1 м<sup>3</sup>), воно повинно бути очищене за допомогою фільтра перед тим, як потрапити в атмосферу [29]. Також недоліком відпрацьованого повітря є те, що воно є достатньо вологим. Для очистки повітря використовують масляні фільтри типу ФТО-1000 або ФТО-750. Вони складаються з 73 циліндрів в які вмонтовуються елементи із гофрованої тканини Петрянова. Якщо відпрацьоване повітря є просто запилене, його очищають на звичайних масляних фільтрах, циклонах, рукавних фільтрах.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Викид стічних вод в каналізацію може проводитись тільки у відповідності з санітарними нормами промислових підприємств. Спуск води із промислових корпусів повинен здійснюватися по трьох каналізаційних окремих системах: для відпрацьованих чистих промислових вод, для забруднених промислових стоків, для фекально-господарських вод. Відносно чисті промислові води повинні бути регенеровані з ціллю їх повторного використання у виробництві. Стічні води, що містять у своєму складі луки та кислоти, мають бути нейтралізовані, після чого можуть переміщатись до фекально-господарських вод.

Промислові стічні води із цехів перед викидом в каналізацію необхідно попередньо очищати, з ціллю вилучення, регенерації та утилізації цінних продуктів, максимального зниження концентрації органічних речовин та мінеральних солей. Необхідно вилучати вибухові речовини, такі як гази, смоли, токсичні речовини, які не можуть бути видалені за допомогою біологічної очистки води.

Біомаса продуцента при глибинному культивуванні, якщо її концентрація не перевищує допустимі норми, може після стерилізації переміщатись до промислових каналізаційних стоків. Інфекційну культуральну рідину перед викидом знезаражують стерилізацією протягом 1 години.

Біля ферментних заводів, що не мають загальної каналізації і де скидання йде безпосередньо у водойми, передбачається будівництво очисних споруд для промислових та господарських стоків. Умови та місце викиду стічних вод, методи та ступінь очистки визначається безпосередньо Державною санітарною інспекцією [52].

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## ВИСНОВКИ

1. В дипломному проєкті для виробництва ферментного препарату, що використовується як додаток до корму було обрано продуцент *Streptomyces albus 2435/M*.
2. Було проаналізовано різні методи селекції для отримання промислового штаму-продуценту та запропоновано використання індукованого мутагенезу двома чинниками: фізичним (УФ-випромінювання) та хімічним (МНС) для отримання штаму-надсинтетика.
3. Відповідно до фізіолого-біохімічних властивостей обраного продуценту *Streptomyces albus 2435/M* використано склад поживного середовища для процесу біосинтезу на основі крохмалю як джерела вуглецю. Також були визначені раціональні параметри культивування: температура  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , аерація 220 об./хв., тривалість процесу біосинтезу – 4 доби.
4. Для виділення ферментного препарату запропоновано використання фільтр-пресу, а для концентрування продукту – вакуум-випарювання. Висушування продукту спроектовано на розпилювальній сушарці.
5. Згідно з фізіолого-біохімічними характеристиками продуценту та умовами біосинтезу продукту для культивування було обрано ферментер об'ємом 3000 л, оснащений перемішуючим пристроєм – мішалкою, а також барботером.
6. У відповідності до вимог готової форми та якості продукту було розроблено апаратурну та технологічну схему отримання кормового ферментного препарату, який фасується в поліетиленові пакети по 1 кг.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>					
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата	<i>ВИСНОВКИ</i>					
Розроб.	Нагорна О.С.							Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.									77	82
Керівник	Тодосійчук Т.С.							НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ		
Затвер.										

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Козак Е. Б. Характеристика современных ферментных препаратов для производства комбикормов. *Зернові продукти і комбикорми*. 2017. Вип. 3. С.42–47.
2. Феоктистова Н. В. Биопрепараты микробного происхождения в птицеводстве. Казанский (Приволжский) федеральный университет. 2018. №3. С.395–414.
3. Дехтяренко Н.В. Виробництво ферментних препаратів в Україні. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2013. №3. С.48 – 58.
4. Толкачева А.А., Черенков Д.А. Ферменты промышленного назначения – обзор рынка ферментных препаратов и перспективы его развития. *Вестник ВГУИТ*. 2017. №4. С.197 – 203.
5. Тодосійчук Т. С. Поліваріантна біотехнологія препаратів-антисептиків на основі мікробних бактеріолізинів: дис. докт. біол. наук: 03.00.20 / КПІ, 2016. – 370с.
6. Singh R., Kumar M. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *Biotech*. 2016. №6. С.174–180.
7. Holt J. G. *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*. М. : Мир, 1997. 370 с.
8. Колешко О. И. *Микробиология з основами вирусологии*. Иркутск: Из-ство Ирк. уни-та, 1999. 452с.
9. Pridham T. G. *Streptomyces albus (Rossi-Doria) Waksman et Henrici: Taxonomic study of strains labeled Streptomyces albus*. Fermentation Laboratory, Northern Utilization Research and Development Division. 1990. №3. С.431– 441.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>					
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</i>					
Розроб.	Нагорна О.С.							Стадія	Аркуш	Аркушів
Конс.									78	82
Керівник	Тодосійчук Т.С.							<b>НТУУ «КПІ ім. І.Сікорського» ФБТ</b>		
Затвер.										

10. McCormick J. R. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. Department of Biological Sciences. 2011. №36. P.206–231.
11. Бержанова Р. Ж. Сообщества актиномицетов рода *Streptomyces*. КНУ ім. аль-Фараби. 2013. №3. С.82–85.
12. Yagüe P., López-García T.P., Rioseras B., Sánchez J., Manteca A. Presporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. FEMS Microbiology Letters. 2013. №2. P.79–88.
13. Лисак В.В. Микробиология. Минск: БГУ, 2007. 430с.
14. Штам *streptomyces recifensis* var. *lyticus* – продуцент гідролітичного ферментного препарату : пат. 34119 Україна : МПК С12R 1/465, С12N 1/20, С12P 1/04. № 99063082 ; заявл. 04.06.1999 ; опубл. 15.02.2001, Бюл. №1.
15. Стейнер Р. Мир микробов. Москва : Мир, 1979. 432с.
16. Шлегель Г. Общая микробиология. Москва : Мир, 1987. 567с.
17. Березюк Ю.В. Биосинтетические свойства *Streptomyces fradiae* и физиологические эффекты биомассы на организм теплокровных животных : дис. докт. біол. наук : 163.04. Кишинев, 2019. 144с.
18. Todosiichuk T.S., Klochko V.V., Zelena L. Taxonomic analysis of the *Streptomyces* sp. 2435 strain, a producer of antimicrobial substances. Mikrobiologicheskii zhurnal. 2014. №1. P.3–8.
19. Гайдашева И. И. Культивирование штамма *Streptomyces Lateritius* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.01.06. Москва, 2011. 21с.
20. Тодосійчук Т.С., Гордєєв Д.А., Іздебська Т.І., Яремчук С.М. Альтернативні компоненти поживних середовищ для актиноміцетів – продуцентів біологічно активних речовин. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2012. №3. С.74–79.
21. Звягинцев Д. Г. Экология актиномицетов. Москва : ГЕОС, 2001. 256с.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

22. Виноградова К. А. О биопленках стрептомицетов. МГУ. 2016. Вип.1, №36. С.221–225.
23. Годосійчук Т.С., Шинкаренко Л.М. Дослідження компонентного складу та специфічності літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis var. lyticus*. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2004. №4. С.138 – 143.
24. Северин Е.С. Биохимия : Учебник. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 784с.
25. Остапченко Л.І. Біохімія : Підручник для студентів ВНЗ. К.: Київський університет, 2016. 798с.
26. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология: Учебник. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 480с.
27. Страйер Л. Биохимия: В 3-х т. Т.2 . М.: Мир, 1985. 312с.
28. Биохимия. Часть II. : учебное пособие для студентов / Егоров И. Э., Суслов А. И., Бахтаиров В. И., Ковалев Р.Ч. Иркутск : ИГМУ, 2014. – 83с.
29. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. 3-е изд., перераб. и доп. М. : Изд-во “Элевар”, 2000. 512с.
30. Новиков Д.А. Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие. Минск : БГУ, 2014. 256с.
31. Мартинек К.В., Березин И.В. Стабилизация ферментов—ключевой фактор при внедрении биокатализа в практику. Усп. химии. 1980. Вип.3, №49. С. 737—770.
32. Калунянц К. А., Голгер Л. И. Микробные ферментные препараты (технология и оборудование). М. : Изд-во “Пищевая промышленность”, 1979. 304с.
33. Moura G., Lanna E. Enzymes in animal diets: benefits and advances of the last 25 years. Microbiology. 2014. Vol. 2, №1. P.25 – 35.
34. Imran M., Mubashir N. Role of Enzymes in Animal Nutrition: A Review // Microbiology. 2016. №2. P.38 – 45.
35. Walsh G., Power N. Enzymes in the animal-feed industry. Microbiology. 1993. №11. С.424– 430.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

36. Zaburannyi N., Rabyk M. Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. *Biotechnology*. 2014. №1. P.3 – 11.
37. Zhang X., Chenyang L. Mechanism of salinomycin overproduction in *Streptomyces albus* as revealed by comparative functional genomics. *Microbiology*. 2017. Vol.3, №101. P.57 – 61.
38. Kallifidas D., Jiang G. Rational engineering of *Streptomyces albus* J1074 for the overexpression of secondary metabolite gene clusters. *Biotechnology*. 2018. №1. P.1 – 14.
39. Baltz R. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Biotechnology*. 2016. №43. P.344 – 361.
40. Егоров Н.С. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Кн 2. М. : Высш. шк., 1988. 208с.
41. Stonesifer J., Baltz R. Mutagenic DNA repair in *Streptomyces*. *Biotechnology*. 1985. №82. P.1180 – 1183.
42. Mraček M., Blumauerová M., Palečková F., Hošťálková Z. Regulation of biosynthesis of secondary metabolites XI. Induction of variants in *Streptomyces aureofaciens* and the specificity of mutagens. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1969. №1. P.19–24.
43. Todosiichuk T. S., Zelena L. B., Klochko V. V. Multistage selection of soil actinomycete *Streptomyces albus* as a producer of antimicrobial substances. *Biotechnology*. 2015. №27. P.253 – 257.
44. Винаров А.Ю., Гордеев Л.С. Процессы и аппараты биотехнологии: ферментационные аппараты : учебное пособие для вузов / под редакцией В. А. Быкова. 2-е изд., перераб. и доп. Москва : Издательство Юрайт, 2019. 274с.
45. Стабников В.Н. Проектирование процессов и аппаратов пищевых производств. Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1982. 199 с.
46. Данилов І.П. Апарати мікробіологічної промисловості : навч. посібник. Харків: НТУ “ХПІ”, 2008. 272с.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						81
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

47. Карпушкин С.В., Борисенко А.Б. Оборудование технологических комплексов : учебное пособие. Тамбов : ТГТУ, 2014. 149с.
48. Уебб Ф. Біохімічна технологія і мікробіологічний синтез. М. : Виробництво антибіотиків, 1970. 570с.
49. Ружинська Л.І. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв. Навч. посібник. К.: НТУУ «КПІ», 2014. 130с.
50. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Основи проектування: навчальний посібник. Львів: Інтеллект-Захід, 2008. 736с.
51. Дытнерский Ю.И. Основные процессы и аппараты химической технологии : Пособие по проектированию. М. : Химия, 1983. 272с.
52. Шестоपालов О.В., Пітак І.В., Новожилова Т.Б. Біотехнологічний захист та охорона навколишнього середовища: навчальний посібник. Харків: НТУУ «ХПІ», 2016. 218с.

					<i>ДП 7115. 00.000 ПЗ</i>	Арк.
						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		