

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

АНДРЕЄВА Богдана Валерійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Arthrobotrys oligospora* для одержання Нематофагіну

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович к. т. н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-к

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5; ферментер об'ємом: 100 м³; коефіцієнт заповнення: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання; опис технологічної схеми; контроль виробництва; охорона довкілля

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу - 1 аркуш формату А1

Апаратурна схема біосинтезу - 2 аркуша формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.24 – 11.03.24	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	12.03.24- 24.03.24	
3	Техніко-економічне обґрунтування	25.03.24- 30.03.24	
4	Біосинтез цільового продукту	31.03.24- 06.04.24	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	07.04.24- 13.04.24	
6	Специфікація обладнання	14.04.24- 20.04.24	
7	Опис технологічної схеми	21.04.24- 30.04.24	
8	Контроль виробництва	01.05.24- 10.05.24	
9	Охорона довкілля	11.05.24- 16.05.24	
10	Оформлення кваліфікаційної роботи	17.05.24- 19.05.24	
11	Оформлення графічної частини	20.05.24- 28.05.24	

Здобувач

(підпис)

Богдан АНДРЕЄВ

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена одержанню біомаси *Arthrobotrys oligospora* для одержання препарату «Нематофагін» з використанням штаму *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5. Штам синтезує найбільшу кількість біомаси (8,35 г/л) на найдешевшій середовищі (1,8 грн/л), а також являється одним із небагатьох штамів які здатні вибивати не тільки дорослі особини, а і яйця нематод.

«Нематофагін» - препарат який використовується для боротьби з галовою нематодою як у відкритому та закритому ґрунті.

Для виробництва необхідне обладнання для підготовки очищеного повітря, насоси, дозатори, збірники, установка безперервної стерилізації, 3 інкулятори на 10 л, 100 л, 1 м³, посівний апарат на 10 м³, ферментер на 100 м³

Робота складається зі вступу, 9 розділів, графічної частини (технологічної і апаратурної схем) та списку використаної літератури з 27 найменувань, 70-сторінок, 3 рисунків, 14 таблиць і 2 схем.

У роботі наведено технологічний процес біосинтезу *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 для одержання препарату «Нематофагін», який включає в себе допоміжні роботи (підготовка і стерилізація поживних середовищ, розчинів для підтримання рівня рН під час культивування), стадії підготовки посівного матеріалу та вирощування культури у виробничому ферментері.

Наведено склад поживного середовища для культивування *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5. Згідно середовища підібрано схему його підготовки та підібрано режими стерилізації. Розраховано необхідну кількість стадій підготовки посівного матеріалу.

Технологічна і апаратурна схема процесу представлена у графічній частині проекту на 3 аркушах формату А1.

Ключові слова: нематоди, nematodes, гриби-нематофаги, *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5, nematophagous fungi.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the production of *Arthrobotrys oligospora* biomass for the production of the drug 'Nematophagin' using the strain *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5. The strain synthesises the largest amount of biomass (8.35 g/l) on the cheapest medium (1.8 UAH/l), and is also one of the few strains that can kill not only adults but also nematode eggs.

«Nematophagin» is a preparation used to control the gall nematode both in open and closed ground.

The production requires equipment for the preparation of purified air, pumps, dispensers, collectors, a continuous sterilisation unit, 3 inoculators of 10 litres, 100 litres, 1 m³, a sowing machine of 10 m³, a fermenter of 100 m³

The work consists of an introduction, 9 chapters, a graphical part (technological and hardware diagrams) and a list of references consisting of 27 titles, 70 pages, 3 figures, 14 tables and 2 diagrams.

The paper describes the technological process of biosynthesis of *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 for the production of Nematophagin, which includes auxiliary work (preparation and sterilisation of culture media, solutions to maintain the pH level during cultivation), stages of preparation of seed material and cultivation of the culture in a production fermenter.

The composition of the nutrient medium for cultivation of *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 is presented. According to the medium, the scheme of its preparation was selected and sterilisation modes were chosen. The required number of stages of seed preparation was calculated.

The technological and hardware scheme of the process is presented in the graphic part of the project on 3 sheets of A1 format.

Key words: nematodes, nematophagous fungi, *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5, nematophagous fungi.

ЗМІСТ

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ	1
РЕФЕРАТ	4
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту	9
РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	16
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	17
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	19
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	20
3.1. Потреба в цільовому продукті - Нематофагіні.....	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва	21
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	22
РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	26
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента.....	26
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	27
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	30
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	30
Підрозділ 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	31
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	32
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	34
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання.....	37
РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	42
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.....	54
8.1. Карта постадійного контролю.....	54
8.2. Мікробіологічний контроль	59
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту	60
8.3.1. Концентрація біомаси	60
8.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	62

РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля	64
9.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів.....	64

ВСТУП

На сьогоднішній день важливою проблемою сільського господарства є боротьба з нематодами, які розвиваються, живуть та поїдають корені рослин. Саме тому у агрокультурі окрім хімічних пестицидів та гербіцидів починають розвиватися біологічні. Гриб *Arthrobotrys oligospora* являється одним з найпоширеніших представників нематофагових грибів які зустрічаються в ґрунтах. Застосування *Arthrobotrys oligospora* цілком безпечно як для людей, тварин та овочів, так і для екології.[1]

Загалом гриб *Arthrobotrys oligospora* має унікальну здатність уловлювати нематоду формуючи 3-D пастки.

Актуальність використання *Arthrobotrys oligospora* обумовлена недостатністю препаратів для обробки ґрунтів, які завозяться в Україну з закордону. Тому актуальність почати широкомасштабне виробництво препаратів проти нематод буде набагато ефективніше та більш економічно вигідно чим закуповувати їх у закордонних виробників. Також на даний момент проводиться досить велика кількість експериментів для змінення генетичного матеріалу грибі для того щоб збільшити вірулентність нематод та збільшити продукцію міцелію.[2]

Отже, аналізуючи можна сказати, що застосування *Arthrobotrys oligospora* у сільському господарстві допомагає боротися з нематодами, висока смертність нематод при таких самих концентраціях як і хімічних засобах захисту рослин, тим самим відтісняючи застарілі хімічні пестициди, новими біопрепаратами для захисту рослин

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Андрєєв Б.В.						8	70
Перевір.	Воронцов О.О.							
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							
						Кафедра БТМ		

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Нематофагін – біоінсектецид який може прийти на заміну хімічних препаратів (Відата та Агровертіна) для обробки рослин.



Рис. 1 Нематофагін

Діючою основою препарату є міцелій, токсичні метаболіти та спори гриба *Arthrobotrys oligospora* з титром не нижче $2,0 \times 10^6$ КУО/см³. Препарат токсигенної дії: гриб здатний утворювати ловчі пристосування (петлі) для вбивання нематод, синтезує при цьому комплекс ферментів – протеаз. Застосовується на квітково-декоративних, овочевих та зеленних культурах для боротьби з фітопаразитичними нематодами у закритому ґрунті, а також захищає полуницю (суницю) від галових нематод у відкритому ґрунті.

Також доведено що використання біопрепаратів на основі гриба *Arthrobotrys oligospora* збільшує біомасу рослин.[3] Препарат повністю безпечний для людей та тварин.

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андрєєв Б.В.				Розділ 1. Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.						9	70
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.	Стабніков В.П.							

Arthrobotris oligospora здатний утворювати ловчі пристосування для умертвіння та використання в їжу нематод та інших найпростіших. Ловчі пристосування (септовані гіфи завтовшки 5-8 мкм) розвиваються на міцелії гриба. Клейкі мережі складаються з великої кількості кілець. Доторкнувшись до клейкої мережі, нематода прилипає і дедалі більше захоплюється мережею. Незабаром після цього з мережі розвивається гіфа, що розчиняє кутикулу і проникає всередину тіла нематоди. Процес поглинання грибом вмісту тіла нематоди триває трохи більше за добу. Хижі гриби можуть протягом тривалого часу розвиватися як сапрофіти у ґрунті або на рослинних рештках, засвоюючи при цьому мінеральні сполуки азоту. Крім того, продуктами метаболізму *Arthrobotris oligospora* є лінолієва кислота та інші метаболіти, які мають токсичну дію для нематод.[4]

Норми витрат:

- у момент висадки рослин (у кожен лунку) – 5,0 мл/лунку - 10,0 мл/лунку;
- у ґрунт за 2 тижня до висадки рослин, а також у канавки під вегетуючі культури – 20,0 мл - 30,0 мл на кожен рослину.

Біологічна ефективність – 70% - 85 %.

Препарат потрібно зберігати при температурі від 4°C до 10°C. При таких умовах препарат буде зберігатися до 3 місяців.[5]

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

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

A. oligospora, який може захоплювати нематод, утворюючи тривимірні мережі зі спеціалізованих гіф, вважається найпоширенішим хижаком нематод у помірних ґрунтах. [6]

Широко використовується в сільському господарстві для профілактики та захисту рослин від галових нематод. Вперше почали використовувати *A. oligospora* в 90-х роках ХХ століття. Гриб використовували як в первородному виді так і у вигляді препаратів на основі міцелію та спор *A. oligospora*. [7]

Проводилась велика кількість експериментів щоб визначити який штам найкраще підходить для виготовлення препаратів. Також намагаються виготовити гриб який буде продукувати велику кількість міцелію, а також буде володіти гарною здатністю вбивати, як личинки так і яйця нематод.

Різні штами *Arthrobotrys oligospora* які були знайдені в різних регіонах планети мають різні умови для найкращого утворення біомаси. Також штами відрізняються хижацькою активністю. В таблиці 2.1 наведені 3 штами які являються одними із найкращих штамів які продукують досить високу кількість біомаси у порівнянні з іншими, а також мають високу хижацьку активність.

В таблиці 2.1 наведені такі штами:

Arthrobotrys oligospora ORS 18692 S5— нематофаг, відомий своєю здатністю вловлювати та знищувати паразитичних нематод рослин. Він відрізняється від інших штамів *A. oligospora* своєю морфологією, генетичними характеристиками та здатністю продукувати позаклітинні ферменти, такі як протеази та хітинази.

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андрєєв Б.В.				Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агенту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.						11	70
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.							

Цей штам був вивчений на предмет його потенціалу як агента біологічної боротьби з нематодами-паразитами рослин у сільському господарстві.[8]

Arthrobotrys oligospora YMF 1.3170. Відомо, що він є дуже ефективним грибом, що вловлює нематоди, створюючи клейкі сітки, які захоплюють і знерухомлюють нематоди для поглинання поживних речовин. Цей штам був використаний для вивчення молекулярних механізмів, що лежать в основі відлову нематод у *A. oligospora*, а також для розробки нових стратегій біоконтролю для нематод-паразитів рослин. Крім того, було показано, що він продукує різні вторинні метаболіти з потенційним застосуванням у фармацевтиці, включаючи артроботризини, олігоспороли та олігоміцини.[9]

Arthrobotry oligospora ATCC 24927 є одним із найперших виділених штамів гриба *Arthrobotrys oligospora* тому являється найбільш вивченим штамом. Головною проблемою цього штаму являється низька здатність до вловлювання нематод тому він являється модельним організмом. На основі *Arthrobotry oligospora* ATCC 24927 розглядаються можливості генетичної модифікації які дадуть можливість підвищити кількість вловлюваних нематод і збільшать вірулентність даного штаму, а також інших штамів *Arthrobotry oligospora*. [10]

Arthrobotrys oligospora CBS 289.82 є штамом грибка *A. oligospora*, що вловлює нематоди, який був виділений із зразків ґрунту в Китаї. Повідомлялося, що він має потужну нематоцидну дію проти різних нематод, що паразитують на рослинах, включаючи галлову нематоду *Meloidogyne incognita*. *A. oligospora* CBS 289.82 також вивчали на предмет його можливого використання в біологічному контролі нематод-паразитів рослин у сільському господарстві. Крім того, його виробництво біомаси та екзополісахариду було оптимізовано для використання в промислових цілях.[11] Однак в даній роботі цей штам не буде оцінюватись оскільки вирощується на твердому поживному середовищі.

Найкращим штамом з проаналізованих виявився *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 який росте на дешевому середовищі і виробляє найбільше біомаси, із мінусів він культивується найдовше з усіх проаналізованих штамів.

Таблиця 2.1 Порівняльна характеристика штамів *Arthrobotrys oligospora*

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Умови культивування	Література
<i>A. oligospora</i> YMF 1.3170	<ul style="list-style-type: none"> • глюкозу - 20 • кукурудзяний розчин - 20 • KH_2PO_4 – 2 • MgSO_4 - 0,5 • FeSO_4 - 0,01 	8,1	120	<p>28 °C pH-6.0</p> <p>культивування <i>Arthrobotrys oligospora</i> YMF 1.3170 відбувалося в умовах зануреної культури в ротаційному шейкері зі швидкістю 180 об/хв.</p>	<p>Тамара Владимировна Теплякова “Strain of nematophage fungus <i>arthrobotrys oligospora</i> infecting eggs and larvae of cyst-forming golden potato-root nematode <i>globoidera rostochiensis</i> in cysts”</p> <p>https://patents.google.com/patent/EA032309B1/en?inventor=%D0%A2%D0%B0%D0%BC%D0%B0%D1%80%D0%B0+%D0%92%D0%BB%D0%B0%D0%B4%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%BD%D0%B0+%D0%A2%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D1%8F%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%B0&page=1</p>
<i>A. oligospora</i> ORS 18692 S5	<ul style="list-style-type: none"> • 15 г сахарози • 1 г NH_4NO_3 • 0,5 г KH_2PO_4 • 0,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • 0,01 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • 0,01 г $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 	8,35	216	<p>pH 6,33 температура 26,68°C</p> <p>швидкість перемішування 185,83 об/хв</p> <p>початкове співвідношення вуглецю до азоту 26</p> <p>використовували колби Ерленмейера на 250 мл, що містили 100 мл модифікованого середовища Чапека-Докса для глибинної культури <i>A. oligospora</i> ORS 18692 S5</p>	<p>Jae-Kook Lee*, Dong-Geun Kim! and Sang-Bum Lee “Nutritional Requirements and Mass Production of Nematode-trapping Fungus, <i>Arthrobotrys oligospora</i>” DOI: 10.1016/S1226-8615(08)60234-4</p>

<i>A. oligospora</i> ATCC 24927	<ul style="list-style-type: none"> • кукурудзяний екстракт - 7,5 мл • меляса бурякова – 30 мл • KH_2PO_4 – 5 г • $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2 г • NaNO_3 – 5 г 	6,5	72	28°C рН-6.0 18 об/хв Колби розміщують у термостатовані гойдалки і вирощують. Середовище розливають у колби по 100 мл і виробляють засів спорово-міцелярної суспензіїю штаму з розрахунку 5 мл на 100 мл середовища. Суспензію отримують з агаризованої культури штаму гриба, що вирощується в біологічній пробірці на скошеному агарі.	H. M. Tkalenko 1*, Ya. M. Gadzalo 2, O. I. Borzykh 1, S. V. Horal «IN VITRO SCREENING OF NEW STRAINS OF PREDACIOUS NEMATOPHAGOUS FUNGI FOR BIOCONTROL SUITABILITY WHEN PRODUCED IN LIQUID CULTURE»
---------------------------------	---	-----	----	---	--

Висновок: умови культивування різних штамів майже нічим не відрізняються, підтримка того ж рН, t та інших показників. Хоч і *A. oligospora* ORS 18692 S5 потрібно більше часу на культивування (216 годин), але він виробляє найбільше біомаси (8,35 г/л), а також середовище на якому він культивується найдешевше (1,8 грн/л). Також непотрібно забувати про особливості штаму оскільки він здатний вловлювати не тільки дорослі нематоди а також молодь, личинки та яйця нематод, тобто має найбільшу здатність вбивати популяцію нематод.

Таблиця 2.2

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>A. oligospora</i> 1.3170 YMF	Глюкоза	20	80	1,6	1
	Рідкий аттрактант С.S.L (кукурудзяний екстракт)	20	190	3,8	1
	KH ₂ PO ₄	2	200	0,4	1
	MgSO ₄	0,5	93	0,04	1
	FeSO ₄	0,01	52	0,0005	1
	<i>A. oligospora</i> 18692 S5 ORS	Сахароза	15	100	1,4
NH ₄ NO ₃		2,4	42,80	0,24	1
KH ₂ PO ₄		0,5	200	0,1	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,5	33	0,016	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0,01	65	0,0006	1
MnSO ₄ ·H ₂ O		0,01	82	0,0008	1
<i>A. oligospora</i> 24927 ATCC	Рідкий аттрактант С.S.L (Кукурудзяний екстракт)	7,5	190	1,45	1
	меляса бурякова	30	50	1,5	1
	KH ₂ PO ₄	5	200	1	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	33	0,07	1
	NaNO ₃	5	290	1,45	1

prom.ua; 2- cakeshop.com.ua; 3- fruit-time.ua

Таблиця 2.3

Біологічний агент	Концентрація ПАР, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених ПАР за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>A. oligospora</i> YMF 1.3170	8,1	120	0,07	5,84	0,72

<i>A. oligospora</i> ORS 18692 S5	8,35	216	0,04	1,8	0,21
<i>A. oligospora</i> ATCC 24927	6,5	72	0,09	5,5	0,84

Отже по таблиці 2.3 більш вигідним виявися штам *A. oligospora* ORS 18692 S5. Оскільки в цьому штамі дуже дешеве середовище.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Arthrotrrys oligospora* ORS 18692 S5.

Тривалість культивування 216 год.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення:

Концентрація біомаси – 8,35 г/л

$$8,35 \times 0,5 = 4,175$$

$$M(C_{12}H_{22}O_{11}) = 342 \text{ г}$$

Кількість С в $(C_{12}H_{22}O_{11}) = 42\%$, Отже :

$$342 \text{ г} - 100\%$$

$$x \text{ г} - 42\%$$

$$342 \times 42 / 100 = 144 \text{ г}$$

$$(4,175 \times 342) / 144 = 9,91 \text{ г сах.}$$

На холосте окиснення відводиться приблизно 40% субстрату:

$$(9,91 \times 0,4) + 9,91 = 13,8 \text{ г/л}$$

Отже для одержання 8,35 г біомаси нам потрібно 13,8 г сахарози.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення:

Концентрація біомаси – 8,35 г/л

$$8,35 \times 0,1 = 0,835$$

$$M(NH_4NO_3) = 80$$

кiсть.N в $(\text{NH}_4\text{NO}_3)=28$

80-100%

x - 35%

$80 \cdot 35 / 100 = 28 \text{ г}$

$(80 \cdot 0,835) / 28 = 2,4 \text{ г/л}$

Для одержання 8,35 г/л біомаси вміст (NH_4NO_3) у середовищі повинен бути 2,4 г/л. Склад поживного середовища повністю відповідає потреба.

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

Гриб росте у вигляді гіф - довгих нитей, що утворюють міцелій. Клітини гриба мають вигляд циліндричних або близько до кульових форм.

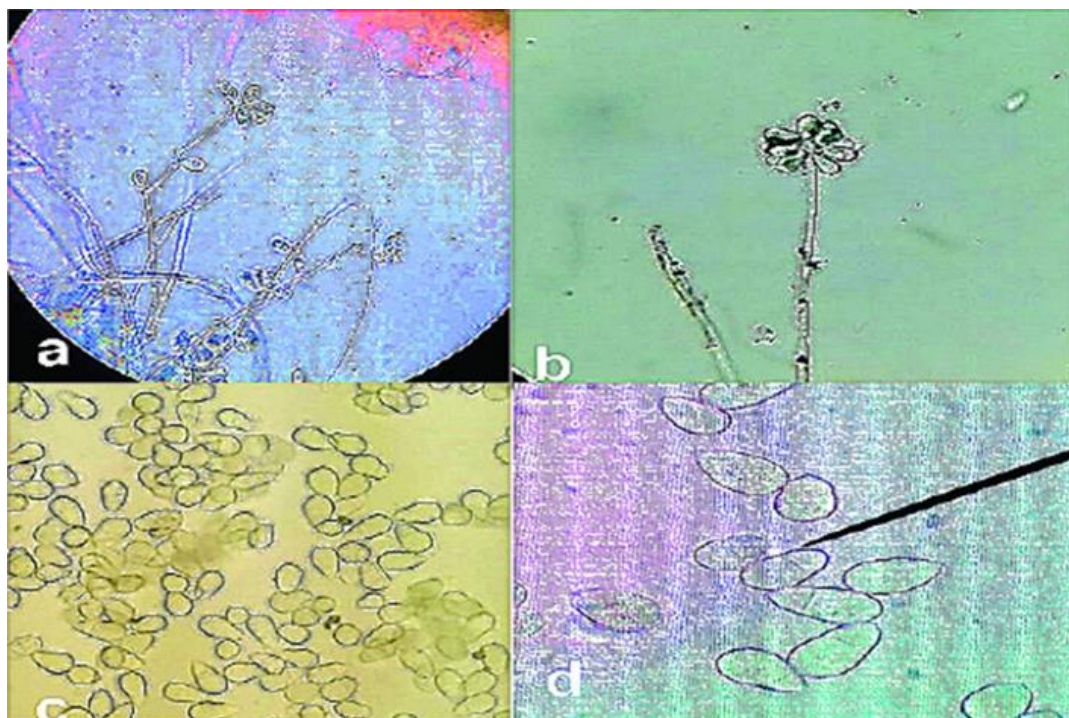


Рис.2.1 Морфологія *Arthrobotrys oligospora* під світловим мікроскопом $\times 40$. а, б Конідії на верхівках конідієносців; в, г конідії двоклітинні грушоподібної форми

Колонії на PDA білі, ватоподібні, швидко ростуть, досягаючи діаметра 50 мм через 7 днів у інкубаторі при 26 °С.

Міцелій частково поверхневий, частково занурений, складається з септованих, розгалужених, гладких гіф.

Конідієносці 110–308 мкм ($x = 213,5$ мкм, $n = 50$) завдовжки, 2,5–4,5 мкм ($x = 3,2$ мкм, $n = 50$) завширшки біля основи, поступово звужуються догори до вершини, 1,5–3 мкм ($x = 2,2$ мкм), $n = 50$) широкі на верхівці, прямостоячі, септовані, розгалужені, гіалінові, утворюючи 2–10 коротких полібластичних зубчиків на вершині, причому кожен зубчик містить один голобластичний конідій. Конідії двох типів: макроконідії 18–44,5 × 5–11,5 мкм ($x = 28,4 \times 8,7$ мкм, $n = 50$), від булавовидних до витягнутих грушоподібних, деякі злегка вигнуті, ширші заокруглені на вершині, вужчі до нижньої частини з усіченою в основі, 1-перегородчасті, перегородка від середини до підсередини, гіалінові, горлеподібні. Мікроконідії 7,5–28 × 4–11 мкм ($x = 17,6 \times 8,6$ мкм, $n = 50$), від субкулястих до булавоподібних, оберненояйцеподібні, ширші, заокруглені на вершині, усічені на сосочкові, випученій основі, асептатні, гіалінові, горлеподібні.

Хламідоспори 7–18,5 × 3,5–8 мкм ($x = 10,7 \times 5,8$ мкм, $n = 50$), циліндричні, гіалінові, у ланцюжках, якщо присутні, іноді горловинні, зі злегка бородавчастою стінкою. Захоплює нематод клейкою сіткою.

Штам росте в аеробних умовах. Температурний діапазон росту 25–30°C. Оптимальне значення рН середовища для росту штаму 6,3. Використовує вуглеводи як джерело вуглецю та енергії. При великих концентраціях солей спостерігається гальмування розвитку. При несприятливих умовах росту формує хламідоспори.[12]

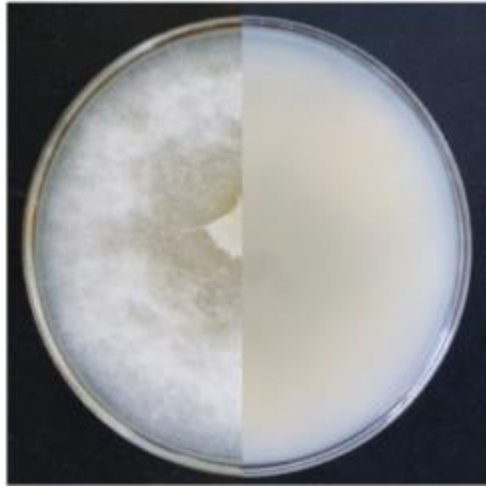


Рис.2.2. Вигляд колонії на чашці Петрі

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна класифікація для *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 наведена згідно електронній номенклатурі MycoBank

Домен: Eukaryota

Царство: Fungi

Підцарство: Dikarya

Відділ: Ascomycota

Підрозділ: Pezizomycotina

Клас: Orbiliomycetes

Порядок: Orbiliales

Родина: Orbiliaceae

Рід: *Arthrobotrys*

Вид: *Arthrobotrys oligospora*

Підвид: *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 [13]

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба в цільовому продукті - Нематофагін

Потреба в Нематофагіні зумовлена тим що фермерам потрібно переходити від шкідливих пестицидів до більш екологічних та дешевих біопрепаратів.

Препарат використовують для боротьби з галовою нематодою у відкритому та закритому ґрунті. Згідно інструкції препарат можна застосовувати під час всієї стадії вегетації. В таблиці 1.1 представлено кількість обробок в середньому за стадію вегетації у певних рослин. Доза для обробки 1 га поля 10 л/га.

Доза препарату може змінюватись залежно від ступеня зараження ґрунту.[14]

Табл.3.1

Потреби сільськогосподарській промисловості у препараті Нематофагін

Сільськогосподарська культура	Площі посівів, тис. га	Кількість препарату для однієї обробки 1 га поля, л/га	Кількість обробок за рік, шт.	Сумарна кількість препарат у для 1 га поля, л/га	Необхідний об'єм препарату для обробки під час вегетації, м ³
Картопля	1280	10	6	60	76800
Буряк	39	10	8	80	3120
Кольза	33,6	10	5	50	1680
					Всього:8160 [15]

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ		
Розроб.	Андресв Б.В.				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.					20	70
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.	Стабніков В.П.						

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Близько 61,5% це 50000 м³ препарату нематофагіну виробляється в Україні компаніями: «Черкасбіозахист», «Біотехніка» і компаніями, академіями у не промислових масштабах. Ще в Україну поступає близько 12% від річних потреб України. Країнами імпортерами якими являються: Польща компанія «Bіо Agrіs» (8000 м³ за 2021 рік) та Нідерланди компанією «BASF» (2000 м³ за 2021 рік).[16]

Попри те що досить велика кількість компаній займається створення перпарату Наматофагін в Україні зберігається досить велика недостача цього препарату 21600 м³ (26,5%) тому пропоную виготовляти 3% від цих потреб.

Отже, вироблятимемо препарату Наматофагін в кількості:

$$G_{гп} = 21600 * 0,06 = 1296 \text{ м}^3/\text{на період виробництва}$$

Обраний біологічний агент *A. oligospora* ORS 18692 S5 виробляє біомаси у кількості 8,35 г/л (кг/м³). Концентрація біомаси в готовому препараті дорівнює кількості біомаси виробляємою грибом.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення річної потреби у препараті Нематофагін (згідно п.1.2) потрібно отримати 648 м³ культуральної рідини.

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, щоб розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість трудоднів – 120, тоді об'єм культуральної рідини за добу становить:

$$V_d = V_{гп} / T_{гп} = 648 / 120 = 5,4 \text{ м}^3$$

$$\text{Кількість } V_{цк} = (K_1 * V_d * T_{цф}) / 24 = (1,1 * 5,4 * 224) / 24 = 55 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

$$V_{г} = V_{цк} / K_3 = 56 / 0,6 = 91 \text{ м}^3$$

Згідно з таблицею, найближчим продукту за цикл буде становити:

за геометричним об'ємом є ферментер $V_{ф} = 100 \text{ м}^3$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$K_3 = 54/100=0.54$ – не перевищує заданого значення

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 54 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1-E_{\phi}} = \frac{54}{1-0,1} \approx 61 \text{ м}^3$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 61 \text{ м}^3$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зан} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\phi.1} = 61/0,6 = 101 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 100 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зан.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{61}{100} = 0,61$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1+X_{\phi}} = \frac{61}{1+0,1} = 55,4 \text{ м}^3$$

де X_{ϕ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 61 - 55,4 = 5,6 \text{ м}^3$$

Для отримання $5,5 \text{ м}^3$ культуральної рідини кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1-E_{ін}} = \frac{5,6}{1-0,1} = 6,2 \text{ м}^3$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 6,2/0,6 = 10,3 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 10 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = \frac{V_{роб.2}}{V_{сін}} = \frac{6,2}{10} = 0,62$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = \frac{V_{роб.2}}{1 + X_{ін}} = \frac{6,2}{1 + 0,1} = 5,63 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 6,2 - 5,63 = 0,56 \text{ м}^3$$

Для одержання $0,56 \text{ м}^3$ посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.3} = \frac{V_{пм2}}{1 - E_{ін}} = \frac{0,56}{1 - 0,1} = 0,62 \text{ м}^3$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 0,62/0,6 = 1,03 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 1 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.3} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сін}} = \frac{0,62}{1} = 0,62$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1 + X_{ін}} = \frac{0,62}{1 + 0,1} = 0,56 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 0,62 - 0,56 = 0,06 \text{ м}^3$$

Для одержання $0,06 \text{ м}^3$ посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.4} = \frac{V_{пм3}}{1 - E_{ін}} = \frac{0,06}{1 - 0,1} = 0,066 \text{ м}^3$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{in.} = 0,066/0,6 = 0,11 \text{ м}^3$.
 Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{cin} = 0,1 \text{ м}^3$ та
 уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.4} = \frac{V_{роб.4}}{V_{cin}} = \frac{0,066}{0,1} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс4} = \frac{V_{роб.4}}{1 + X_{in}} = \frac{0,066}{1 + 0,1} = 0,06 \text{ м}^3$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 0,066 - 0,06 = 0,006 \text{ м}^3 = 6 \text{ л}$$

Для одержання 6 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та
 посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в
 результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.5} = \frac{V_{пм4}}{1 - E_{in}} = \frac{6}{1 - 0,1} = 6,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{in.} = 6,6/0,6 = 11 \text{ л}$. Приймаємо
 найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{cin} = 0,01 \text{ м}^3 = 10 \text{ л}$ та уточнюємо
 прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.5} = \frac{V_{роб.5}}{V_{cin}} = \frac{6,6}{10} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс5} = \frac{V_{роб.5}}{1 + X_{in}} = \frac{6,6}{1 + 0,1} = 6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм5} = V_{роб.5} - V_{пс5} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ л} = 600 \text{ мл}$$

Культивування 600 мл посівного матеріалу можна провести в колбах на
 качалках об'ємом 750 мл з заповненням по 150 мл. Кількість колб:

$$n_{колб} = 600 / (750 \times 0,2) = 4 \text{ шт.}$$

Таблиця 3.4

Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та
 виробничого біосинтезу

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$, мЗ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини* $V_{роб.}$, мЗ (л)	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, мЗ (л)	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, мЗ (л)	Коефіцієнт заповнення, Кзап, частка	Геометричний об'єм ферментера, $V_{ст}$, мЗ (л)
1	2	3	4	5	6	7
VI	54	60	5,5	54,5	0,6	100
V	5,4	6,1	0,56	5,54	0,61	10
IV	0,54	0,62	0,06	0,56	0,62	1
III	0,054	0,066	6 л	60 л	0,66	0,1
II	5,4 л	6,6 л	0,6 л	6 л	0,66	0,01
I	0,54 л	0,7	-	0,7	0,2	4 колб

РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

A. oligospora ORS 18692 S5 використовує як джерело вуглецю сахарозу. Тому, згідно цього використовуючи онлайн базу KEGG був наведений шлях шлях Емдена-Маєрхофа для грибів, оскільки на KEGG не наведена схема для *Arthrotrrys*.



Ферменти:

1. альфа-глюкозидаза (КФ 3.2.1.20);
2. гексокіназа (КФ 2.7.1.1), глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9), фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2);
3. фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2);
4. глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9);
5. 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11);
6. фруктозо-бісфосфатальдолаза класу II (КФ 4.1.2.13);
7. гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);
8. фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3)
9. 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12);
10. енолаза (КФ 4.2.1.11);
11. піруваткіназа (КФ 2.7.1.40)

<h3 style="margin: 0;">НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ</h3>				
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Андреев Б.В.		
Перевір.		Воронцов О.О.		
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
<h3 style="margin: 0;">Розділ 4. Біосинтез цільового продукту</h3>				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			26	70
<h3 style="margin: 0;">Кафедра БТМ</h3>				

Рис.4.1 Схема катаболізму сахарози у *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5

Сахароза залучається до процесу катаболізму в результаті дії альфа-глюкозидази (КФ 3.2.1.20) перетворюючи сахарозу на фруктозу. Далі за допомогою гексокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється на фруктозу-6-фосфат, яка в свою чергу під дією глюкозо-6-фосфат-ізомерази (КФ 5.3.1.9) перетворюється на глюкозу-6-фосфат. Далі глюкоза-6-фосфат може перетворюватись двома шляхами: або під дією фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2) перетворюється на глюкоза-1-фосфат, або під дією гексокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється до глюкози. Тобто сахароза розщеплюється до фосфорильованих моносахаридів, які далі залучаються в процес гліколізу, де глюкоза-1-фосфат під дією фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2) перетворюється на глюкоза-6-фосфат яка ізомеризується у фруктозо-6-фосфат за участі глюкозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.9). Фруктоза-6-фосфат перетворюється на фруктозу-1,6-дифосфат за допомогою 6-фосфофруктокінази (КФ 2.7.1.11)

Утворений продукт піддається розщепленню фруктозо-бісфосфатальдолазою класу II (КФ 4.1.2.13) до гліцеральдегід-3-фосфату, котрий одночасно окиснюється та фосфорилується гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою (КФ 1.2.1.12) до 1,3-дифосфогліцерату, від якого далі відщеплюється молекула АТФ (фермент – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3), внаслідок чого утворюється 3-фосфогліцерат. Після ізомеризації 3-фосфогліцерату в 2-фосфогліцерат (за присутності 2,3-бісфосфогліцератнезалежна фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) відбувається перехід 2-фосфогліцерату під дією енолази (КФ 4.2.1.11) у фосфоенолпіруват після чого від фосфоенолпірувату піруваткіназою (КФ 2.7.1.40) відщеплюється АТФ, і в результаті утворюється піруват, котрий у подальшому надходить у цикл трикарбонних кислот.

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Схему біотрансформації сахарози у цільовий продукт (біомасу) наведено на рис.4.2.

Оскільки джерелом вуглецю є вуглевод (сахароза), то втрати інтермедіатів ЦТК будуть компенсуватись карбоксилюванням фосфоенолпірувату та пірувату

під дією фосфоенолпіруваткарбоксикінази (АТФ) (КФ 4.1.1.49) і піруваткарбоксилази (КФ 6.4.1.1) відповідно. [17]

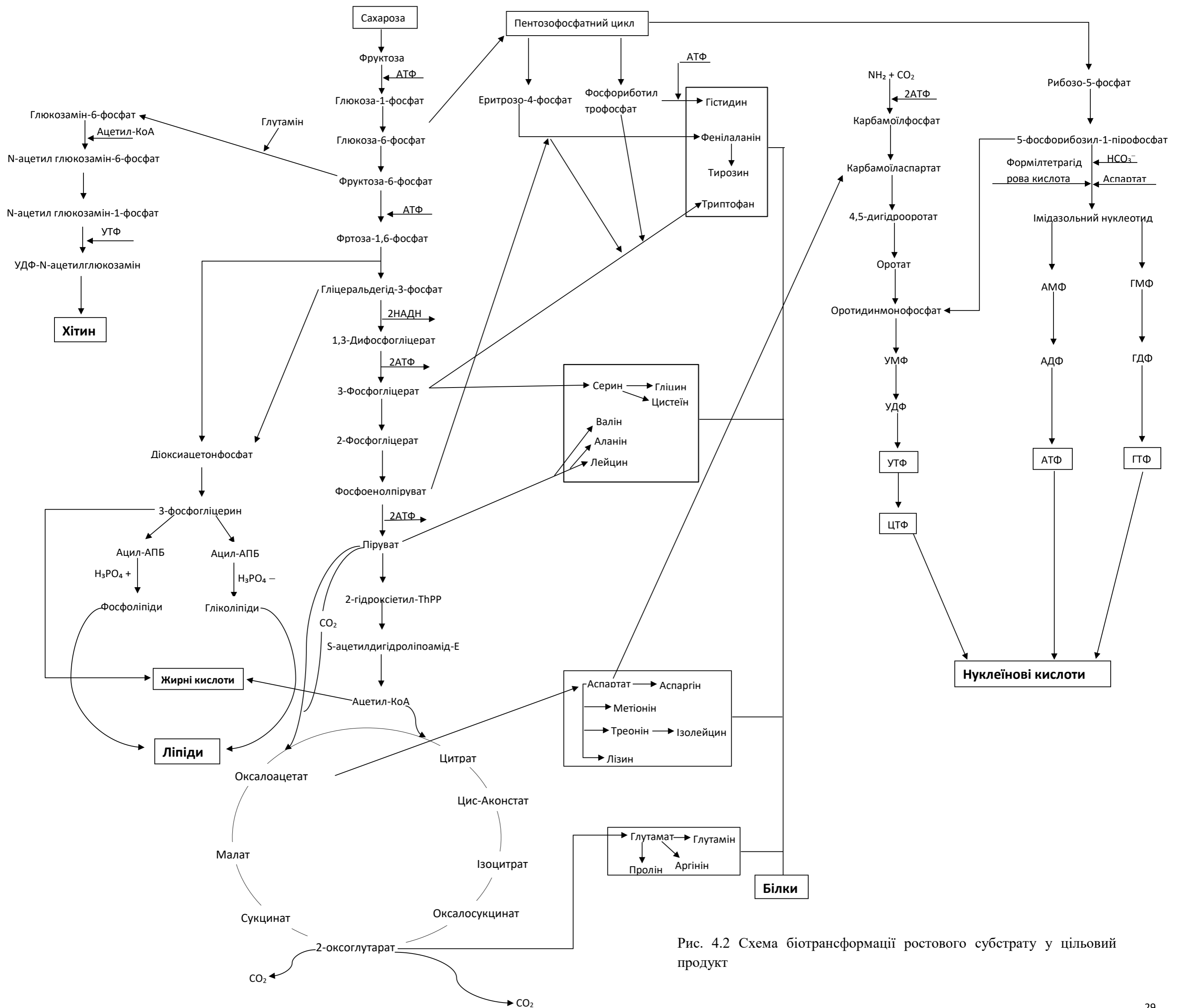


Рис. 4.2 Схема біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 передбачається здійснювати глибинним способом. Оскільки глибинний спосіб культивування має ряд переваг таких як: дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, забезпечити асептичні умови, а також підтримувати нормальну аерацію, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва з можливим переходом на безперервний спосіб культивування.

Оскільки основним завданням культивування *Arthrobotrys oligospora* являється накопичення біомаси то доцільно буде використовувати періодичний спосіб культивування адже за безперервного способу культура буде знаходитись в експоненційній фазі, що є не вигідним в цьому випадку.

Зважаючи на оптимальну температуру росту для культивування (26°C), і значення рН (6,3), можна сказати що ризик контамінації є високим, тому культивування проводять в асептичних умовах, а також необхідна стерилізація обладнання, комунікації і поживного середовища.

Враховуючи те що гриб є аеробом і йому потрібен кисень процес культивування проводиться при подачі аераційного повітря. Аерація культуральної рідини проводиться вмонтованим барботером всередині ферментера, та додатковим перемішуванням для збільшення контакту фаз.

Отже культивування *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 проводиться глибинним, періодичним способом, в асептичних умовах з використанням барботера для аерації та перемішуванням.

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Андреев Б.В.			Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					30	70
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Основна вимога до ферментера для глибинного культивування продуцента можливість проведення процесу в асептичних умовах за інтенсивної аерації середовища. Для підтримання асептичних умов ферментери мають бути абсолютно герметичними, а всі лінії трубопроводів повинні витримувати жорстку стерилізацію паром і працювати протягом всього культивування під невеликим надмірним тиском.

Для ефективного накопичення біомаси всередині апарату для культивування необхідно забезпечити умови для здійснення інтенсивного масо- та енергообміну. Тому всередині ферментера необхідно встановити перемішувальний пристрій. Біологічний агент є чутливим до зрізових зусиль, тому як перемішувальний пристрій доцільно обрати мішалки механічні з низькою швидкістю обертання або магнітні мішалки.

Також для підтримання оптимальної температури культивування потрібно щоб ферментер був оснащений датчиком температури, та зондом рН (6,3), який контролюється додаванням я 6% NaOH та 6% HCl .

Таким чином для культивування *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 використовуємо ферментер оснащений: сорочкою і датчиком температури, датчиком рН, барботером, датчиками розчиненого кисню та оснащений магнітною мішалкою.

Підрозділ 5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Arthrobotrys oligospora ORS 18692 S5 є аеробом, тому процес ферментації проходить за безперервної подачі стерильного аераційного повітря через барботер.

Підготовку стерильного стисненого аераційного повітря для біореакторів здійснюють в декілька етапів: забір повітря, фільтрація від механічних частинок, стискання повітря, охолодження та видалення конденсату, очищення на головному фільтрі та очищення на ідивідуальному фільтрі.

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі.

Для очистки від механічних частинок використовуємо фільтри грубої очистки.

Після цього повітря потряпляє на турбокомпресор, де піддається стисканню не менше 0,2 МПа, таке повітря має підвищену температуру. Тому потім воно подається у водяний теплообмінник для охолодження, після охолодження повітря виділяється конденсат який видаляється у ресивері.

Далі до ферментера повітря очищується за допомогою індивідуального фільтра. Головні фільтри наповнюють набивним волокном і встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. Це дає змогу видаляти 98% контамінантів. Використання індивідуальних фільтрів з надтонкими мембранами/волокнами дає змогу отримати повітря зі ступенем очистки 99,9999%.

Очищення повітря на індивідуальних фільтрах, повітря надходить через колектори і від головних фільтрів. В індивідуальних фільтрах застосовують тканину Петрянова на основі перхлорвінолового волокна.[18]

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

На ринку України присутні наступні миючі та дезінфікуючі засоби.[19]

Aqua Clordex

Засіб дезінфікуючий за ТУ У 20.2-41185077-001:2017

Використовується для поточної, заключної та профілактичної дезінфекції поверхонь приміщень, приладів, устаткування, санітарно-технічного обладнання підприємства фармацевтичної, мікробіологічної промисловості. Основною діючою речовиною якого є натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти (масова частка активного хлору у межах 55,0-57,%). Концентрація препарату може варіюватись від 0,03% до 3% в залежності від призначення.[20]

DEZALDUM 20

Засіб дезінфікуючий за ТУ У 20.2-31287090-008:2020

Використовується для поточної, заключної та профілактичної дезінфекції поверхонь приміщень, приладів, устаткування, санітарно-технічного обладнання підприємства фармацевтичної, мікробіологічної промисловості. Діючі речовини мас., %: 16,5–19,5 алкілдиметилбензиламоній хлорид; 10,5–11,5 глутаровий альдегід.

Властивості Dezaldum 20 — ефективний засіб проти таких видів патогенних мікроорганізмів:

- патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми (кишкова паличка, бруцели, клостридії, стрептококи, стафілококи, сальмонели і ін.);
- патогенних грибів Кандида і Трихофітон; пліснявих грибів

Фізичні і хімічні властивості:

- Прозора рідина з легким приємним запахом
- Значення рН (концентрату): 6,5–7,8
- Питома густина при 20 °С: 1,07–1,12 г/см³ [21]

Дезінфікуючий засіб Гембар 25,0

Належить до дезінфікуючих засобів тривалої дії (від 7 днів і більше). Випускається у вигляді рідкого концентрату. Діюча речовина – полігексаметиленгуанідін гідрохлорид - 25,0%. Засіб використовують для дезінфекції різного обладнання, інвентарю, поверхонь. Відноситься до малонебезпечних речовин. (IV клас безпеки). Володіє такими пролонгованими властивостями: бактерицидна, віруліцидна та фунгіцидна. Робочі розчини готують концентрацією 0,4 %. Вони можуть зберігатись до 6 місяців.[22]

Таблиця 5.1

Узагальнена характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчи-ну, Е _{дз} , Грн/м ²
Aqua Clordex	Поверхні, стіни, двері, підлога	0,5	240	1,2	0,1	24
DEZAL DUM 20	Поверхні, стіни, двері, підлога	0,5	170,40	0,852	0,1	17,04
Гембар 25	Поверхні, стіни, двері, підлога	0,4	516	2,06	0,1	51,6

Враховуючи результати розрахунку у Таблиці 2.1, обираємо у якості найбільш ефективного дезінфікуючого засобу DEZALDUM 20. Слід зауважити, що з часом слід змінювати типи дезінфікуючих засобів, оскільки йде адаптація сторонньої мікробіоти до вибраного дезінфікуючого засобу, тому можна використовувати Aqua Clordex який за результатами таблиці являється більш вигідним ніж Гембар 25.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для культивування *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 використовують таке поживне середовище:

Сахароза-15 г/л

NH_4NO_3 – 2,4 г/л

KH_2PO_4 – 0,5 г/л

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г/л

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г/л

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г/л

CaCO_3 – 1 г/л

pH середовища – 5,9-6,3

Оскільки потрібно підтримувати рівень pH 6,3 для цього будемо використовувати 6% розчин соляної кислоти та 6% розчин гідроксиду натрію.

Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Аналізуючи склад поживного середовища для вирощування *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А : Розчин сахарози. Режим стерилізації: $T = 112\text{ }^\circ\text{C}$; $P = 0,05$ МПа; $\tau = 30$ хв

Композиція Б : $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Режим стерилізації: $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $T = 131\text{ }^\circ\text{C}$

Композиція В: : CaCO_3 . (131°, 40 хв.)

Композиція Г: KH_2PO_4 . Режим стерилізації: $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $T = 131\text{ }^\circ\text{C}$

Сахароза являється термолабільним компонентом тому потребує м'якого режиму стерилізації. CaCO_3 стерилізується окремо оскільки не розчиняється при стандартній для солей температурі. Солі композиції Б стерилізують при

стандартній для солей температури, щоб запобігти випадінню в осад фосфорних солей при нагріванні.+

Вирощування інокуляту в посівних апаратах об'ємом 10, 100 та 1000 л
Стерилізація 6,5, 65 та 650 л поживного середовища, необхідних для цих стадій, здійснюється у відповідних посівних апаратах.

Вирощування в інокуляторі 10, 100 та 1000 л

Композиція А : Розчин сахарози. Режим стерилізації: $T = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$; $P = 0,05$ МПа; $\tau = 30$ хв

Композиція Б : $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Режим стерилізації:
 $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $T = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$

Композиція В : CaCO_3 . (131°, 40 хв.)

Композиція Г: KH_2PO_4 . Режим стерилізації: $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $T = 131$ °С

Стерилізація композиції А буде відбуватися в посівному апараті, а композиції з солями будуть стерилізуватися окремо у автоклаві.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для посівного апарату 10 м³ та ферментера 100 м³

Оскільки посівний апарат і ферментер мають великий об'єм доцільно використовувати УБС для стерилізації поживного середовища. У реактор-змішувач поступають всі компоненти поживного середовища, перемішуються та за допомогою насоса перекачується в УБС. Режим стерилізації в УБС 160°С, 5 хв.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання

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

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою, яка забезпечує вилучення забруднюючих частинок
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Фільтр сітчастий, фільтроматеріал – вінілпластикові сітки, корпус – із оцинкованої сталі. Продуктивність – 1950 м ³ /год, стартовий опір – 160 Па. Розміри: 592*287*292 (мм). Клас очищення: G2/G3 (E = 90 %)
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий KSD10A. Максимальний тиск – 8 МПа, потужність – 7,5 кВт, продуктивність 1,1 м ³ /хв
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Кожухотрубний теплообмінник SCE 53С з нержавіючої сталі. Діапазон робочих температур – від -60 до 400 °С, робочий тиск – від 6 до 40 бар.
Рс-5	Ресивер	1	Ресивер з нержавіючої сталі Setkom 500 LT/ DIK TANK об'ємом 500 л

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андреев Б.В.				Розділ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.						37	70
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.	Стабніков В.П.							

Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Рідинний калорифер з нержавіючої сталі, продуктивність за повітрям – 1000 л/хв
Ф-7	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр кишенькового типу, фільтроматеріал – поліестер і мікрОВОлокно, корпус – із оцинкованої сталі. Продуктивність – 2100 м ³ /год, стартовий опір – 127 Па. Розміри: 287*592*600 (мм). Клас очищення: G4/F9 (E = 92 %)
ІФ-8 ІФ-18 ІФ-37 ІФ-45 ІФ-53	Індивідуальний фільтр	5	Фільтр НЕРА, фільтроматеріал – гофрований фільтр папіл з мікротонкого скловолокна, корпус – із пластику, алюмінію, оцинкованої або нержавіючої сталі. Продуктивність – 1200 м ³ /год, стартовий опір – 250 Па. Розміри: 305*610*150 (мм). Клас очищення: Н10-У16 (E = 99,995 %)
Ін-9	Інокулятор		Інокулятор BR500-M1 об'ємом 10 л, з нержавіючої сталі SS316L, оснащений сорочкою, барботером та датчиками розчиненого кисню, піни, рН і температури, швидкість перемішування від 5 об/хв до 1000 об/хв.

Н-10	Насос перистальтичний	1	Лабораторний перистальтичний насос ВТ300/2J YZ П15, з продуктивністю від 0,004 до 68 л/год .
Р-12 Р-14	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 10 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,4 м, висота – 0,45 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт
Р-16 Р-21 Р-23	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,135 м, висота – 0,31 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт
ПА-19	Посівний апарат	1	Посівний апарат BR500-M1 об'ємом 100 л, з нержавіючої сталі SS316L, оснащений сорочкою, барботером та датчиками розчиненого кисню, піни, рН і температури, швидкість перемішування від 5 об/хв до 1000 об/хв. 100 л
ДЗ-24 ДЗ-28 ДЗ-32 ДЗ-40 ДЗ-48	Дозатор ваговий		Дозатор ваговий напівавтоматичний ДВСВ-Н, діапазон зважування від 0,2 до 10 кг, дискретність 0,005 кг .
Р-26	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 100 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,97 м, висота – 2,8 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт
Н-27 Н-31	Насос перистальтичний	2	Перистальтичний насос DEBEM MP, з продуктивністю 103 л/год .

Продовження табл.6.1

Р-30 Р-34	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 63 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 0,97 м, висота – 2,6 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт
Н-35 Н-43	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий Sea-Land МК 300 М 230, продуктивність 9,6 м ³ /год .
ПА-38	Посівний апарат	1	Посівний апарат об'ємом 1 м ³ , з нержавіючої сталі SS316L, оснащений сорочкою, барботером та датчиками розчиненого кисню, піни, рН і температури, швидкість перемішування від 50 об/хв до 1000 об/хв.
ДЗ-39 ДЗ-47	Дозатор ваговий	2	Дозатор ваговий напівавтоматичний ДВСВ-Ф, діапазон зважування від 5 до 70 кг, дискретність 0,005 кг .
Р-42	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 10 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Діаметр – 2,6 м, висота – 5,6 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт
УБС-44 УБС-52	Установка безперервної стерилізації	2	Установка безперервної стерилізації, OLIMPIC FT з продуктивністю до 40 м ³ /год .
ПА-46	Посівний апарат		Посівний апарат об'ємом 10 м ³ , з нержавіючої сталі SS316L, оснащений сорочкою, барботером та датчиками розчиненого кисню, піни, рН і температури, швидкість перемішування від 50 об/хв до 1000 об/хв.

P-50	Реактор-змішувач	1	Реактор сталевий з номінальним об'ємом 50 м ³ , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм. Частота обертання мішалки – 100 об/хв; потужність двигуна – 0,75 кВт
H-51	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Leo 3.0 380, продуктивність 54 м ³ /год .
Фр-54	Ферментер		Ферментер об'ємом 100 м ³ виготовлений на замовлення в ТОВ "ГК ЕВРОХІММАШ К.О.", з нержавіючої сталі SS316L, оснащений сорочкою, барботером та датчиками розчиненого кисню, піни, рН і температури.
H-55	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос CLEANPRO з продуктивністю від 12 м ³ /год .

Примітка: пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел: 1) <https://ventfilter.kiev.ua/> («Вент-фільтр», фільтри для повітря); 2) <https://airgroup.com.ua/> («Airgroup», компресор); 3) <https://termocom.com.ua/> («Термоком», кожухо-трубні теплообмінники); 4) <https://instrade.com.ua/> («Instrade», Ресивер); 5) <https://opeks.ua/> («ОПЭКС (TRANTER)» Рідинні калорифери); 6) <https://www.lab1st.com/> («Lab1st» Інокулятор об'ємом 10 л); 7) <https://china-fermenter.com/> («ВХВІО» Інокулятор 1000 л); 8) <https://www.innovabiomed.com/> («innova» посівний апарат 10 м³); 9) ("ГК ЕВРОХІММАШ К.О." ферментер 100 м³ та реактори змішувачі); 10) <https://polytechnic.com.ua/> ([НВПІП "Політехнік"](#), дозатори вагові); 11) <https://www.cft-group.com/> («CFT», УБС); 12) <https://amarequip.com/> («Amar» реактори змішувачі); 13) <https://chemtest.com.ua/> («Хімтест Україна+» насос перистальтичний); 14) <https://prom-nasos.com.ua/> («Debem» насос перистальтичний); 15) <https://tapflo.ua/> («TAPFLO» насоси перистальтичні); 16) <https://rozetka.com.ua/> («Sea-Land» насос перистальтичний; «Leo» насос перистальтичний)

РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми

Технологічна схема біосинтезу *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 включає допоміжні операції (приготування 6% розчину HCl, приготування і стерилізація 6% розчину NaOH, а також приготування і стерилізація поживних середовищ) та основний технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу біомаси *Arthrobotrys oligospora* ORS 18692 S5 наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Сенітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийно-дизенфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування мийно-дезенфікуючого розчину "DEZALDUM 20"

ДР 1.2 Підготовка приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту яка розташована на 3 м в висоту від даху будівлі, де концентрація мікроорганізмів стабілізована. Повітрозабірник обладнаний металевою сіткою для видалення забруднень.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Повітря фільтрується сітчастим фільтром для видалення механічних частинок більше 10 мкм, пропускна здатність фільтра 1950 м³/год., ефективність очищення досягає 90%.

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Андрєєв Б.В.			Розділ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					42	70
						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 2.3. Компресування повітря

Для стискання повітря використовуємо компресор KSD10A. потужністю 1,1 м³/хв., тиск складає 8МПа.

ДР 2.4. Охолодження та видалення вологи

Теплообмінник-охолоджувач (нагрівач) SCE 53С продуктивністю 53 кВт. Температура повітря на виході регулюється швидкістю подачі теплоносія, температура 25°C, вологість 60 %.

ДР 2.5. Нагрів повітря

Підігрів повітря відбувається в теплообміннику-нагрівачі SCE 53С до температури, вищої від температури культивування на 5 – 10 °С, тобто до 35 °С, його вологість становить 40 %.

ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі

Повітря очищується в головному фільтрі кишенькового типу, фільтроматеріал – поліестер і мікрОВОлокно, корпус – із оцинкованої сталі. ефективність очищення досягає 92%.

ДР 2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Повітря надходить до індивідуального фільтра (тонкої очистки) HEPA зі скловолокна, продуктивністю 1200 м³/год ефективність очищення досягає 99,99%.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 3. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 3.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для колб

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 4.1.

Таблиця 7.1

Композиції компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 650 мл сер., г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	15 г	11,4	А	100

Вода		88,6		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,38	Б	356,7
NH ₄ NO ₃	1	0,76		
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,01	0,0076		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,0076		
Вода		355,6		
CaCO ₃	1	0,76	В	97,5
Вода		96,76		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,38	Г	96,38
Вода		96		
Усього				650

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 11,4 г сахарози. Наважки поміщають у колбу, додають 88,6 мл питної води, перемішують, закривають ватно– марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,38 г MgSO₄ × 7H₂O, 0,76 г NH₄NO₃. Наважки поміщають у колбу, додають 355,6 мл води питної, перемішують, закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

Оскільки MnSO₄×H₂O і FeSO₄·7H₂O дуже мало і їх не можливо зважити на терезах з них роблять 1% розчини.

ДР 3.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують CaCO₃ – 0,38 г – суспендують окремо, додаючи 25,25 мл води, а потім у колбах з ватно-марлевым корком стерилізують в автоклаві при 131°, 40 хв.

ДР 3.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних терезах зважують 0,38 г KH₂PO₄. Наважку поміщають у колбу і додають 96 мл питної води, перемішують закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 3.1.5. Приготування і стерилізація композиції Д

У колбу наливають 100 мл води і за допомогою вагів зважують 1 мг $MnSO_4 \times H_2O$ і $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ дадають у колбу, перемішують закривають ватно-марлевим корком та стерилізують в автоклаві при 131° , 40 хв.

ДР 3.1.5. Змішування композицій.

Змішуємо в колбі композиції від ДР 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4., 3.1.5. Проводимо мікробіологічний контроль. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ДР 3.2 Приготування та стерелізація композицій для інокулятора 10 л

Таблиця 7.2

Композиції компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 10 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,5 л сер., г	Композиції	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	15 г	114	А	1000
Вода		886		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5	3	Б	5000
NH_4NO_3	1	7		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,01	0,07		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	0,07		
KH_2PO_4	0,5	3		
Вода		4482		
Конденсат		500		
$CaCO_3$	1	7	В	500
Вода		493		
Усього				6500

ДР 3.2.1. Приготування і стерелізація композиції А

На технічних терезах зважують 114 г сахарози додають 886 мл питної води, перемішують і стерилізували гострою парою при $t = 112^\circ C$ (30 хв).

ДР 3.2.2. Приготування і стерелізація композиції Б

На технічних терезах зважують 3,8 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 7,6 г NH_4NO_3 , 0,076 г $MnSO_4 \times H_2O$, 3,8 г KH_2PO_4 і 0,076 г $FeSO_4 \times 7H_2O$ додають 4480 мл води та стерилізують в інокуляторі гострою парою 131° , 40 хвилин. До композиції додається 6% HCl (приблизно 2 мл/л) до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% $NaOH$.

ДР 3.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 7,6 г $CaCO_3$. Наважку переносять у колбу і додають 492 мл води питної, ретельно перемішують до однорідної суспензії. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують при $131^\circ C$ протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа

ДР 3.3 Приготування та стерелізація композицій дял інокулятора 100 л

Таблиця 7.3

Композиції компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 100 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 65 л сер., г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	15 г	1140	А	10
Вода		8860		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5	38	Б	50
NH_4NO_3	1	76		
$MnSO_4 \times H_2O$	0,01	0,8		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	0,8		
KH_2PO_4	0,5	38		
Вода		44800		
Конденсат		500		
$CaCO_3$	1	76	В	5
Вода		4920		
Усього				65

ДР 3.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 1140 г сахарози додають 8860 мл дистильованої води, перемішують і стерилізували гострою парою при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 3.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 38 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 76 г NH_4NO_3 , 0,76 г $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 38 г KH_2PO_4 і 0,76 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ додають 44800 мл води та стерилізують в інкуляторі гострою парою 131° , 40 хвилин. До композиції додається 6% HCl (приблизно 2 мл/л) до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH .

ДР 3.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

Зважують на технічних вагах у попередньо відтарованій ємності 76 г CaCO_3 . Наважку переносять у колбу і додають 4920 мл води питної, ретельно перемішують до однорідної суспензії. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують при $131\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 40 хв за тиску 0,15 МПа

ДР 3.4 Приготування та стерелізація композицій для інкулятора 1м3

Таблиця 7.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інкуляторі об'ємом 1 м^3

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування $0,65\text{ м}^3$ сер., кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	15 г	12	А	100
Вода		88		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,4	Б	500
NH_4NO_3	1	0,7		
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01	0,007		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	0,007		
KH_2PO_4	0,5	0,4		
Вода		450		
Конденсат		500		
CaCO_3	1	0,8	В	50

Вода		49,2		
Усього				650

ДР 3.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 12 кг сахарози додають 88 л дистильованої води, перемішують і стерилізували гострою парою при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 3.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,4 кг $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 кг NH_4NO_3 , 0,007 кг $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,4 кг KH_2PO_4 і 0,007 кг $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ додають 448 л води та стерилізують в інкуляторі гострою парою 131° , 40 хвилин. До композиції додається 6% HCl (приблизно 2 мл/л) до досягнення рН 4,5. Після охолодження, поживне середовище доводять до рН 7,0 додаванням стерильного 6% NaOH .

ДР 3.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують CaCO_3 – 0,8 кг – суспендують окремо, додаючи 49,2 л води, а потім стерилізують гострою парою, при 131° , 40 хв.

ДР 3.5 Приготування та стерелізація композицій для інкулятора 10 м3

Таблиця 7.5

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інкуляторі об'ємом 10м3

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,5 м ³ сер., кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	15 г	114	А	6500
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	3		
NH_4NO_3	1	7		
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,01	0,07		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	0,07		
KH_2PO_4	0,5	3		
Конденсат		500		

CaCO ₃	1	7		
Вода		5866		
Усього				6500

ДР 3.5.1. Змішування та стерелізація поживного середовища в УБС

У реактор-змішувач (Р-42) поступають всі компоненти поживного середовища, перемішуються та за допомогою відцентрового насоса (Н-43) насоса перекачується в УБС-44. Режим стерелізації в УБС 160°C, 5 хв.

Після стерелізації поживне середовище переливають в ПА-46.

ДР 3.6 Приготування та стерелізація композицій для інокулятора 100 м³

Таблиця 7.6

Композиції стерелізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 65 м ³ сер., кг	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	15 г	1140	А	65000
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	30		
NH ₄ NO ₃	1	70		
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,01	0,7		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	0,7		
KH ₂ PO ₄	0,5	30		
CaCO ₃	1	70		
Вода		63133		
Конденсат		500		
Усього				

ДР 3.6.1 Змішування та стерелізація поживного середовища в УБС

У реактор-змішувач (Р-50) поступають всі компоненти поживного середовища, перемішуються та за допомогою відцентрового насоса (Н-51) насоса перекачується в УБС-52. Режим стерелізації в УБС 160°C, 5 хв.

Після стерелізації поживне середовище переливають в Фр-54.

ДР 4. Приготування титрувальних розчинів

ДР 4.1. Підготовка розчину 6% соляної кислоти

На підприємство кислота поступає у вигляді 36%. Для того, щоб отримати 6% розчин соляної кислоти, необхідно до 6 л 36% розчину додати 640 л води.

1 л – 36%

6% - x

$36/6 = 6$.

ДР 4.2. Підготовка і стерелізація розчину 6% гідроксиду натрію

ДР 4.2.1. Для інокулятора 10 л

Гідроксид натрію має вигляд білих непрозорих кристалів. В колбу вносимо 10 л х 2 мл 6% гідроксиду натрію = 20 мл, 6% гідроксиду натрію. Розчин лугу стерелізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2.2. Для інокулятора 100 л

Гідроксид натрію має вигляд білих непрозорих кристалів. В колбу вносимо 100 л х 2 мл 6% гідроксиду натрію = 200 мл, 6% гідроксиду натрію. Розчин лугу стерелізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 4.2.2. Для інокулятора 1м3

Гідроксид натрію має вигляд білих непрозорих кристалів. В колбу вносимо 1м3 х 2 мл 6% гідроксиду натрію = 2 л, 6% гідроксиду натрію. Розчин лугу стерелізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру штаму *A. oligospora* ORS 18692 S5 зберігають в холодильниках при температурі +2-6°C на скошеному середовищі МПА в пробірці. Пересів потрібно робити один раз в 4 місяці.

ТП 3.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з МПА для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті при $t = 28$ °C., 72 год.

ТП 3.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним МПА (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при $t = 27$ °C (72 год).

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 500 мл з стерильною композицією А (від ДР 3.1.1) зливають простерилізовані композиції Б, В, Г (від ДР 3.1.2.–3.1.4.), перемішують і розливають по у качалочні колби об'ємом 750 мл ($K3 = 0,2$). У пробірку з робочою культурою *A. oligospora* ORS 18692 S5 (від ТП 4.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану грибкову суспензію і вносять у колби на качалці з поживним середовищем. Культивують на качалках при $t = 27$ °C (108 год), 185 об./хв.

Після завершення культивування здійснюють відбір проб для проведення мікробіологічного контролю. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП. 3.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор об'ємом 5 л, де знаходиться композиція Б (від ДР 3.2.2), подають самопливом композицію А (від ДР 3.2.1) та композицію В (від ДР.3.2.3.) Для досягнення оптимального рН для культивування продуценту у поживне середовище вносять 6% розчин NaOH (від 4.2.1).Потім подають посівний

матеріал через засівний пристрій від *ТП 4.4* та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату.

Культивування здійснюють протягом 108 год за температури 27 °С, перемішування середовища 80 об/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю відсутність сторонньої мікробіоти. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП. 3.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокулятор об'ємом 5 л, де знаходиться композиція Б (від *ДР 3.3.2*), подають самопливом композицію А (від *ДР 3.3.1*) та композицію В (від *ДР.3.3.3*). Для досягнення оптимального рН для культивування продуценту у поживне середовище вносять 6% розчин NaOH (від 4.2.2). Вносять через трубу перетискування посівний матеріал від *ТП 4.5* та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату.

Культивування здійснюють протягом 108 год за температури 27 °С, перемішування середовища 80 об/хв. Кожні 3-4 години здійснюють відбір проби для проведення мікробіологічного контролю. Відсутність сторонньої мікробіоти.

ТП. 3.7. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 1м3

В інокулятор об'ємом 1 м3, де знаходиться композиція Б (від *ДР 3.4.2*), за допомогою відцентрового насоса перекачують композицію А (від *ДР 3.4.1*) з реактора та композицію В (від *ДР.3.4.3*). Для досягнення оптимального рН для культивування продуценту у поживне середовище вносять 6% розчин NaOH (від 4.3.2).

Вносять через трубу перетискування посівний матеріал від *ТП 4.6* та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату.

Культивування здійснюють протягом 108 год за температури 27 °С та перемішування середовища 80 об/хв.

ТП. 3.8. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 10м3

В інокулятор об'ємом 10 м3 за допомогою насоса вноситься стерильне поживне середовище з УБС.

Через трубу перетискування вносять посівний матеріал від ТП 3.7 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату.

Культивування здійснюють протягом 108 год за температури 27 °С та перемішування середовища 80 об/хв.

ТП 4. Виробничий біосинтез

В ферментері об'ємом 100м³ за допомогою насоса вноситься стерильне поживне середовище з УБС.

Через трубу перетискування вносять посівний матеріал від ТП 3.8 та вмикають перемішуючий пристрій, аерацію, подають пару у кожух посівного апарату. Культивування здійснюють 216 години, при температурі 27°, 80-200 об./хв.

ЗВ 5. Знешкодження відходів

ЗВ 5.1. Знешкодження твердих відходів

Для знешкодження твердих відходів потрібно розділяти їх на ті що перероблюються і ті що не перероблюються. Відходи які можна повторно переробити відправляємо на спеціальні заводи з переробки, а ті що не перероблюються на звалище.

ЗВ 5.2. Знешкодження рідких відходів

Знешкодження рідких відходів відбувається за допомогою ультразвукового дезінтегратора і потім скидаються у міську каналізацію.

ЗВ 5.3. Знешкодження газоподібних відходів

Знешкодження повітря яке використовувалося для аерації відбувається шляхом спалювання в котельні підприємства а потім задля того щоб не забруднювати екологію газами використовуємо біоабсорбер.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва

Культивування *Arthrotrrys oligospora* ORS 18692 S5 проводиться за дотримання асептичних умов, необхідно на всіх етапах проводити мікробіологічний контроль на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою. 20 мл культуральної рідини необхідна для проведення аналізів, і вона відбирається кожної 4 години з біореактора.

8.1. Карта постадійного контролю

Далі наведено таблицю точок контролю виробництва біомаси *Arthrotrrys oligospora*

Таблиця 8.1

Карта контрольних точок виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 Приготування мийнодезінфікуючого розчину «DEZALDUM 20»	Розчин мийнодезінфікуючого розчину Концентрація	Рефрактометр	Концентрація перевіряється після приготування розчину	C=0,5%

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Андрєв Б.В.				Розділ 8. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.						55	70
						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Км, Кх 1.2.1 Щоденне прибирання	Підлога, стіна, обладнання Чистота	Візуальний огляд, мікробіоло гічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщенн я, відсутність пилу та бруду, КУО < 800/см ²
Км, Кх 1.2.2 Генеральне прибирання	Підлога, стіна, обладнання Чистота	Візуальний огляд, мікробіоло гічний контроль	Після прибирання	Чисте приміщенн я, відсутність пилу та бруду, КУО < 300/см ²
Кт, Км 3.1.1, 3.2.1, 3.3.1, 3.4.1 Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологі чний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ = 30 хв, P=0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.2, 3.2.2, 3.3.2, 3.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологі чний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ = 40 хв, P=0,15 МПа, відсутність мікробіоти

Кт, Км 3.1.3, 3.2.3, 3.3.3, 3.4.3 Приготування і стерилізація композиції В	Композиція В Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологі чний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ = 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1.4, Приготування і стерилізація композиції	Композиція Г Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіоло гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологі чний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р=0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 Приготування та стерилізація титрувального агенту гідроксиду натрію	Розчин гідроксиду натрію Температура, час, концентрація, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр , годинник, мікробіоло гічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, концентрація розчину визначається після приготуванн я, мікробіологі чний контроль після стерилізації	t= 121 °С, τ = 15 хв, С=6 %, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, 4.1 Підготовка титрувального агенту соляної кислоти	Розчин соляної кислоти Концентрація	Хімічний метод	Концентрація розчину визначається після приготування	C = 6 %
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Arthrobotrys oligospora</i> ORS 18692 S5 Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Мікробіо логічний контроль, Термомет р технічний	Мікробіологіч ний контроль проводять кожні 3-4 місяці при пересіві культури	t = 4°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури	Робоча культура <i>Arthrobotrys oligospora</i> ORS 18692 S5 Тривалість вирощування, температура, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність	Годинник , термомет р технічний , мікробіол огіч ний контроль	Температура контролюєтьс я і підтримується автоматично весь час вирощування, мікроскопіюва ння – кожні 4 годин	t= 28°C, τ = 72 год, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кт, Км 5.3</p> <p>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник , термометр технічний , технічний тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин</p>	<p>t= 28 °С, τ = 108 год, n = 185 об/хв, рН = 6.2, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.5, 5.6, 5.7, 5.8</p> <p>Вирощування в інокуляторі об'ємом 10,100,1000,10000 л</p>	<p>Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів</p>	<p>Годинник , термометр технічний , технічний тахометр, манометр, мікроскоп</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання – кожні 4 годин</p>	<p>t= 28 °С, τ = 108 год, n = 80 об/хв, рН = 6.2, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Кт, Км 6.1 Виробниче культивуванн я	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури, морфологічна відповідність організмів	Годинник , термомет р технічний , технічний тахометр, манометр, мікроскоп	Температура і швидкість обертання контролюютьс я і підтримуютьс я автоматично весь час вирощування, мікроскопіюва ння – кожні 4 годин	t= 28°C, = 216 год, n = 150 об/хв, рН = 6.2, с _{біомаса} = 8,35 г/л відсутність сторонньої мікробіоти
--	---	--	--	--

8.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль виробничого синтезу може здійснюватись двома шляхами: мікроскопіюванням та висів на агаризовані поживні середовища.

Пряме мікроскопіювання. Для контролю стерильності беруть пробу та роблять препарат розчавлена крапля (стерилізують скельця, фламбують петлю та наносять на скельце воду разом із досліджуваною культурою). За доп. світлового мікроскопа перевіряють наявність сторонніх мікроорганізмів спостереженням. Якщо сторонніх мікроорганізмів немає в 10 полях зору, середовище чисте. За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *A. oligospora* ORS 18692 S5. Гриб росте у вигляді гіф - довгих нитей, що утворюють міцелій. Клітини гриба *Arthrotrys oligospora* мають вигляд циліндричних або близько до кульових форм

Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо-картопляним агаром (ГКА) або сусло-агаром (СА) – грибів та дріжджів.[23]

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій

Пробу простерилізованого поживного середовища відбирають в об'ємі, як правило, 50 мл і здійснюють прямим висівом на агаризовані середовища. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища (або стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем і подальшим інкубуванням.

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єма проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами поміщають у термостат за температури 28-30°C. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 години.[30] На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів.[24]

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.3.1. Концентрація біомаси

У дві центрифужні пробірки відібрати по 5 мл культуральної рідини та центрифугувати за 3000 об/хв впродовж 5 хв. Після центрифугування фугат злити в окремі пробірки, а до осаду додати 5 мл дистильованої води (в кожен пробірку) та знову центрифугувати (3000 об/хв впродовж 5 хв). Операцію повторити двічі. Після відмивання біомасу (осад) кількісно перенести у попередньо висушений і зважений бюкс. Далі бюкси висушити до постійної маси у сушильній шафі за 105 °C. Висушені бюкси помістити в ексікатор, охолодити до кімнатної температури та зважити на аналітичних вагах. Різниця у значеннях бюксу з біомасою бактеріальних клітин двох послідовних зважувань – не більше, ніж декілька

одиниць у четвертому знаку після коми. На основі отриманих даних розрахувати загальну кількість біомаси, що виростає в колбі та в перерахунку на 1 мл культуральної рідини:

Кількість сухої біомаси в г/л розраховують за формулою:

$$x = A - B \frac{1000}{V}$$

де А і В — маса центрифужної пробірки (бюкса, фільтра) з осадом і без осаду, г; V — об'єм культуральної рідини, взятої для центрифугування чи фільтрування, мл. Біомасу ваговим методом визначають в двох паралельних пробах.[25]

Визначення КУО

КУО визначають шляхом розведення культуральної рідини і висівом на чашки Петрі з СА. Для прискорення та виключення людських помилок використовуються автоматичні системи розведень та посіву таких як Easy Spiral Dilute (Рис. 8.3.1) для якого не потрібне попереднє розведення зразка, тому що система автоматично розводить зразок до потрібної концентрації.



Рис.8.3.1 Easy Spiral Dilute

Для дослідження потрібно взяти зразок у кількості від 50 до 200 мкм за допомогою автоматичної піпетки, далі зразок поміщається у спеціальний контейнер. Далі оператор вибирає розведення яке потрібне і система автоматично розводить зразок. Після цього вибирається режим посіву на чашку Петрі у нашому

випадку використовуємо експоненціальний режим який характеризується зменшенням поверхневої концентрації. Після цього чашку інкубують при температурі 28°C, 24 години.

Для визначення кількості утворених колоній можна використати ручний метод підрахунку або автоматичний лічильник колоній наприклад (Scan 4000).

8.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення джерела азоту

Нітрат амонію визначають методом Несслера:

Метод полягає в додаванні в культуральну рідину реактива Несслера (K_2HgI_4), який реагує з аміаком, присутнім у зразку (в сильних лужних умовах) для отримання жовтого кольору. Інтенсивність кольору прямо пропорційна концентрації аміаку.

Реактиви:

1. Дистильована вода
2. Калій татрат
3. Реактив Несслера

Приготування:

Вміст $N-NH_4^+$ визначали методом Несслера за довжиною хвилі 410 нм. Для цього в мірну колбу 100 мл з дистильованою водою відсмоктували 1 мл культуральної рідини, додавали 2 мл 2% розчину калію татрату і 2 мл реактиву Несслера. Потім її доповнювали дистильованою водою до об'єм 100 мл.[26]

Визначення джерела вуглецю

Квантифікацію сахарози в поживному середовищі та культуральній рідині виконують за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для цього використовується хроматографічна колонка з кислотою розміром 7,8×300 мм та сорбентом Rezex ROA-H+. Умови проведення включають температуру в колонці 70°C, елюент із концентрацією 2,3 мМ сірчаної кислоти, швидкість подачі 0,5 мл/хв, та рефрактометричний детектор (RID). Зразок у кількості 50 мкл вводять у клапан вприскування, після чого він піддається адсорбції на сорбенті, а елюент

подається з вказаною швидкістю. Проходження сахарози через рефрактометричний детектор реєструється системою та відображається на комп'ютері у вигляді піків.[27]

РОЗДІЛ 9. Охорона довкілля

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

Місцями утворення газоподібних відходів на проектованому підприємстві являється повітря яке використовувалось для аерації під час вирощування інокуляту в інокуляторах та посівному апараті, а також після виробничого біосинтезу.

Рідкі відходи утворюються після миття обладнання та дезінфекції поверхонь (стін, дверей, обладнання).

Тверді відходи представляють собою упаковки від пакувальних матеріалів, сировини та і тд.

9.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

9.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Підчас миття виділяються рідкі відходи які містять в собі залишки кілтин, біомаси і тд. для їх знешкодження можна використовувати ультразвуковий дезінтегратор який буде розбивати клітини.

Після знешкодження рідкі відходи скидуються в міську каналізацію.

9.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи представлені тарами від миючих засобів, пакувальних матеріалів, сировини і інше, підтягаються переробці і мають транспортуватися до спеціальних компаній які займаються вторинною переробкою.

					НУХТ БТЕК 04.03.47 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Андрєєв Б.В.			Розділ 9. Охорона довкілля	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					65	70
						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Оскільки полівінілхлорид важко піддається переробці, на відміну від поліетилену високої щільності, ці два види пластику не рекомендується утилізувати разом. Тому попередньо проводять сортування всіх пакувальних матеріалів з подальшим транспортуванням до пунктів прийому вторсировини.

9.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Для утилізації газоповітряних відходів проєктованого виробництва пропонується здійснювати шляхом спалюванні в котельні підприємства.

За допомогою циркуляційного насоса повітря подається в камеру спалювання. Задля того щоб не забруднювати екологію газами, використовуємо біоабсорбер.

ЛІТЕРАТУРА

[1] Bai-Le Wang, Yong-Hong Chen, Jia-Ning He, Hua-Xi Xue, Ni Yan, Zhi-Jun Zeng, Joan W. Bennett, Ke-Qin Zhang, Xue-Mei “Integrated Metabolomics and Morphogenesis Reveal Volatile Signaling of the Nematode-Trapping Fungus *Arthrobotrys oligospora*” <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02749-17>

[2] U.B. Singh, A. Sahu, N. Sahu, R.K. Singh, S. Renu, D.P. Singh, M.C. Manna, B.K. Sarma, H.B. Singh, K.P. Singh “*Arthrobotrys oligospora*-mediated biological control of diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani*”

<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.12009>

[3] U B Singh , A Sahu, N Sahu, R K Singh, S Renu, D P Singh, M C Manna, B K Sarma, H B Singh, K P Singh «*Arthrobotrys oligospora*-mediated biological control of diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani*»

[4] M.S. Soliman, M.M. El-Deriny, D.S.S. Ibrahim, H. Zakaria¹ and Y. Ahmed «Suppression of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato plants using the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius»

[5] Інструкція до препарату Нематофагін

[Режим доступу:] <https://biotekhnika.od.ua/uk/produksiia/mikrobiolohichni-preparaty/nematofahin-bt>

[6] Duanyong Zhou ,Jianping Xu,Haixia Li ,Da Wang 1,2,Juan Gu ,Ke-Qin Zhang ,Ying Zhang “Historical Differentiation and Recent Hybridization in Natural Populations of the Nematode-Trapping Fungus *Arthrobotrys oligospora* in China “

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576814/>

[7] Stefan Olsson, Eva Friman “Heavy trap formation by *Arthrobotrys oligospora* in liquid culture”

DOI:[10.1111/j.1574-6968.1985.tb01126.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb01126.x)

[8] ROBIN DUPONNOIS, THIERRY MATEILLE & MATHIEU GUEYE “Biological Characteristics and Effects of Two Strains of *Arthrobotrys oligospora* from Senegal on *Meloidogyne* Species Parasitizing Tomato Plants”

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159550039693?journalCode=cbst20>

[9] Lu-Xia Wei, Hui-Xiang Zhang, Jian-Lin Tan, Yan-Sheng Chu, Nan Li, Hua-Xi Xue, Yan-Li Wang, Xue-Mei Niu,* Ying Zhang, and Ke-Qin Zhang” *Arthrobotrisins A-C, Oligosporons from the Nematode-Trapping Fungus Arthrobotrys oligospora*”

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21568306/>

[10] Xue-Mei Niu & Ke-Qin Zhang «*Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes»

<https://doi.org/10.1080/21501203.2011.562559>

[11] E. den Belder «Trapping of root-knot nematodes by the adhesive hyphae-forming fungus *Arthrobotrys oligospora*»

<https://edepot.wur.nl/206754>

[12] Tinatin Doolotkelvieva, Saykal Bobusheva, Ayperi Muratbekova, Christina Schuster «Isolation, Identification, and Characterization of the Nematophagous Fungus *Arthrobotrys oligospora* from Kyrgyzstan»

DOI: [10.1007/s11686-021-00404-5](https://doi.org/10.1007/s11686-021-00404-5)

[13] Онлайн ресурс: <https://www.mycobank.org/>

[14] Інструкція до препарату Нематофагін

[Режим доступу:] <https://cherkasybiozakhyst.com/nematofagin-bio/p91>

[15] Державна служба статистики України

[Режим доступу:] <https://www.ukrstat.gov.ua/>

[16] Державна служба України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів

[Режим доступу:] <https://dpss.gov.ua/>

[17] KEGG онлайн ресурс: <https://www.genome.jp/pathway/mapno=00010&category=Fungi>

[18] КАРЛАШ Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук – К: НУХТ, 2019. – 252 с.

[19] Державний реєстр дезінфекційних засобів

Режим доступу:

<https://moz.gov.ua/uploads/ckeditor/%D0%94%D0%B5%D1%80%D0%B6%D1%80%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2/10-11-2023/%D0%A0%D0%B5%D1%94%D1%81%D1%82%D1%80%20%D0%B4%D0%B5%D0%B7%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D1%96%D0%B2%20908.xlsx>

[20] Сайт виробника ТОВ "ІВАХІМ"

[Режим доступу:] <https://ivahim.prom.ua/ua/p972415815-zasib-aqua-clordex.html>

[21] Сайт виробника «АТМА»

[Режим доступу:] <https://atma.ua/profesijna-himiya/dezynfektsiya/zasib-dezinfikuyuchyj-dlya-poverhon-dezaldum-20-5l-da015000/>

[22] Інтернет магазин prom.ua

[Режим доступу:] <https://prom.ua/ua/p257133961-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-gembar.html>

[23] Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: лабораторний практикум освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. /В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 34 с

[24] Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. /В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

[25] В. В. Мотроненко, Т. М. Луценко, Л. М. Дронько БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ. ЧАСТИНА 1. ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ [Електронний ресурс:] Електронне мережне навчальне видання для здобувачів ступеня бакалавра за освітньою програмою «Регенеративна та біофармацевтична інженерія» спеціальності 163 «Біомедична інженерія» ден. і заоч. форм навч./ Галкін О. Ю.- К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 53 с.

[26] Heonsang Jeong , Jongtaek Park , Hyunook Kim “Determination of NH₄⁺ in Environmental Water with Interfering Substances Using the Modified Nessler Method”

[Режим доступу:] doi.org/10.1155/2013/359217

[27] Häßler T., Schieder D., Pfaller R., Faulstich M., Sieber V. Enhanced fedbatch fermentation of 2,3butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresource Technology*. 2012, 124: 237244.

[Режим доступа:] [doi:10.1016/j.biortech.2012.08.047](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.047).