

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Декан факультету

(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

«___» _____ червня 2025 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри

(підпис) Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

«___» _____ червня 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: «Одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* для виробництва гаупсину»

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

ДУКА Ксенія Георгіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник БУЦЕНКО Людмила Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Олена Гудзенко
(ім'я та прізвище)

(підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р

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

“ ” 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ДУКИ Ксенії Георгіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* для виробництва гаупсину»

керівник роботи проф. кафедри д.б.н. БУЦЕНКО Людмила Миколаївна

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 27 березня 2025 року №
188-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 року

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603; цільовий продукт: нативна культуральна рідина; геометричний об'єм ферментера: $1,25\text{ м}^3$; коефіцієнт заповнення: $0,65$

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу *Pseudomonas chlororapsis* - 1 аркуш формату A3

Апаратурна схема біосинтезу *Pseudomonas chlororapsis* - 1 аркуш формату A1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>01.03.25 – 14.03.25</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>15.03.25 – 25.03.25</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>26.03.25 – 04.04.25</i>	
4.	<i>Біосинтез цільового продукту</i>	<i>05.04.25 – 11.04.25</i>	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>12.04.25 – 20.04.25</i>	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>21.04.25 – 30.04.25</i>	
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>21.04.25 – 30.04.25</i>	
8.	<i>Основні етапи виділення та очищення цільового продукту</i>	<i>01.05.25 – 08.05.25</i>	
9.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>09.05.25 – 16.05.25</i>	
10.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>25.04.25 – 18.05.25</i>	
11.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>19.05.25 – 28.05.25</i>	

Здобувач

(підпис)

Ксенія ДУКА

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Людмила БУЦЕНКО

(ім'я та прізвище)

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	8
ABSTRACT.....	9
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГАУПСИНУ	11
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, СКЛАДУ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ.....	17
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	17
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища.....	23
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	24
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	25
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	27
3.1. Потреба у цільовому продукті	27
3.2. Розрахунок потужності виробництва біофунгіциду «Гаупсин»	29
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	31
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для Виробництва препарату «Гаупсин».....	33
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	37
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	37
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	38
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	44
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	44
5.1.1. Вибір типу ферментера.....	45
5.2 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря	45
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	47
5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	47
5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва гаупсину	53

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	58
5.4.1. Підготовка та стерилізація розчинів мікро елементів для підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування	59
5.4.2. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в колбах на качалках.....	60
5.4.3. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 16 л.....	61
5.4.4. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 160 л.....	63
5.4.4. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 742 л.....	64
5.4.6.1. Обґрунтування та спосіб стерилізації допоміжних розчинів	65
5.4.6.2. Обґрунтування кількості та приготування 2 н розчину HCl	65
5.4.6.3. Обґрунтування кількості та приготування 5 н розчину NaOH.....	66
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	67
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	77
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	85
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	89
9.1. Мікробіологічний контроль	89
9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	90
9.2.1. Концентрація біомаси	90
9.2.2. Концентрація цільового продукту	91
9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	92
9.2.3.1. Визначення концентрації гліцерину ензиматичним методом.....	92
9.2.3.2. Визначення концентрації джерела азоту.....	94
ЛІТЕРАТУРА	97
ДОДАТОК А	105
ДОДАТОК 1	108
ДОДАТОК 2	109

ДОДАТОК 3	110
ДОДАТОК 4	111
ДОДАТОК 5	112
ДОДАТОК 6	113
ДОДАТОК 7	114
ДОДАТОК 8	115
ДОДАТОК Б	116

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробленню технологічної та апаратурної схеми виробництва біопрепарату гаупсин на основі бактерій виду *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603. Біопрепарат є ефективною альтернативою хімічним пестицидам, забезпечуючи захист рослин від широкого спектру хвороб та шкідників, а також стимулюючи їх ріст. Ключовою перевагою є його біологічне походження, що гарантує екологічну безпеку та унеможливорює накопичення токсичних речовин у ґрунті та продукції. Згідно з розрахунком потреби ринку, необхідна річна кількість препарату становить 9442 л. Потужність виробництва розрахована на 0.75 м³ цільового продукту за один цикл.

Технологічний процес виготовлення біопрепарату на основі штаму *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 складається із допоміжних робіт (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних композицій, розчинів HCl та NaOH) та основних робіт (вирощування інокуляту в колбах на качалках, посівних апаратах та основний виробничий біосинтез).

Технологічна схема зображує такі стадії: підготовка аераційного повітря, стерилізація композицій поживного середовища, вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, інокуляторах об'ємом 16 л, 160 л та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1.25 м³.

Кваліфікаційна робота викладена на 118 сторінках друкованого тексту, містить 18 таблиць та 6 рисунків. Складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (60 джерел) та графічної частини (технологічна схема формату A3 та апаратурна схема формату A1).

Ключові слова: Гаупсин, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603, біопрепарат, біосинтез, глибинне культивування, нативна культуральна рідина, стабілізація.

ABSTRACT

The qualification thesis is dedicated to the development of a technological and apparatus scheme for the production of the biological product Gaupsin based on the bacterium *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603. This biological product is an effective alternative to chemical pesticides, providing plant protection against a wide range of diseases and pests, as well as stimulating their growth. A key advantage is its biological origin, which ensures environmental safety and prevents the accumulation of toxic substances in the soil and final products. According to the market demand calculation, the required annual amount of the product is 9442 L. The production capacity is designed for 0.75 m³ of the target product per cycle.

The technological process for producing the biological product based on the strain *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 consists of auxiliary operations (preparation of aeration air, preparation and sterilization of nutrient compositions, HCl and NaOH solutions) and main operations (inoculum cultivation in shake flasks, seed fermenters, and main production biosynthesis).

The technological scheme depicts the following stages: preparation of aeration air, sterilization of nutrient compositions, cultivation of inoculum in shake flasks, seed fermenters with volumes of 16 L and 160 L, and production biosynthesis in a 1.25 m³ fermenter.

The qualification thesis is presented on 118 pages of printed text, contains 18 tables, and 6 figures. It consists of an introduction, nine chapters, a list of references (60 sources), and a graphical part (a technological scheme in A3 format and an apparatus scheme in A1 format).

Keywords: Gaupsin, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603, biological product, biosynthesis, submerged cultivation, native culture fluid, stabilization.

ВСТУП

Псевдомонади - це один із найбільш вивчених родів бактерій, завдяки їх високій адаптивності та широкому спектру метаболічних здібностей. *Pseudomonas aureofaciens*, що належить до цього роду, відомий своєю здатністю синтезувати гаупсин - фунгіцидний біопрепарат.

Гаупсин є групою антибіотиків, які мають велике значення у сільському господарстві для захисту рослин від шкідників та фітопатогенів. Проте, виробництво гаупсину за допомогою *Pseudomonas aureofaciens* є складним процесом, який потребує оптимізації умов культивування та використання відповідних технологій для отримання високих виходів продукту.

Метою цієї кваліфікаційної роботи є дослідження можливостей використання *Pseudomonas aureofaciens* для отримання біомаси, необхідної для виробництва гаупсину. В рамках роботи будуть досліджені декілька продуцентів (*Pseudomonas chlororaphis* HT66, *Pseudomonas chlororaphis* PA23-63, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603), їх поживне середовище, оптимальні умови культивування та концентрація біомаси. Штам *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 відзначається найменшим часом культивування порівняно з іншими представниками та відносно високим показником кінцевої концентрації біомаси.

Головною новизною цієї роботи є використання нових підходів до отримання біомаси *Pseudomonas aureofaciens*, що дозволяють підвищити виходи гаупсину та зменшити витрати на його виробництво. Для досягнення цієї мети будуть використані найновіші наукові статті та патенти, що дозволять ефективно досягти поставленої мети.

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ВСТУП		
Розроб.		Дука К.Г.					
Перевір.		Буценко Л.М.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
						Літ.	Арк.
							Аркушів
							10 118
					Кафедра БТМ		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГАУПСИНУ

Гаупсин - це біопрепарат, що використовується в біотехнології для захисту рослин від хвороб та шкідників, стимулювання їхнього росту, очищення стічних вод та виробництва біопалива.

Назва продукції: Біопрепарат гаупсин.



Категорія та номер діючого нормативно-технічного документу на продукцію та реєстраційний номер: Препарат відповідає ТУ У 24.2-31374036- 001-2009 (додаток А) [1].

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГАУПСИНУ				Лім.	Арк.	Аркуші
Розроб.		Дука К.Г.									
Перевір.		Буценко Л.М.								11	118
Реценз.									Кафедра БТМ		
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

Свідоцтво про державну реєстрацію А №02155, патент №40089 (додаток А).
Висновок санітарно-епідеміологічної служби №05.03.02-05/2938 від 22.01.2010 року (додаток А).

Біопрепарат Гаупсин застосовується, як фунгіцид і інсектицид для захисту рослин від хвороб і комах-шкідників. Він стимулює ріст кореневої системи, поліпшує живлення рослин, збільшує стійкість до заморозків і посухи. Препарат може бути використаний на всіх культурах, включаючи полеві, садові, городні і декоративні рослини. Гаупсин не викликає резистентності патогенів, збільшує врожайність і має стимулюючу дію росту. Додати інформацію про біологічно-активні речовини, що містяться в культуральній рідині і впливають на рослини.

Його використання включає обробку насіння, замочування розсади, що призводить до підвищення польової схожості і проростання, а також сприяє розвитку кореневої системи. Гаупсин безпечний для людей і тварин, не має періоду очікування перед використанням, зменшує стресові впливи хімічних препаратів і продовжує термін зберігання зерна, овочів і фруктів [2]. Більш докладніше про терміни обробки культур ви можете прочитати у наведеній таблиці «табл.1.1».

Таблиця 1.1 [1]

Регламент застосування препарату «Гаупсин»

Культура	Терміни обробки	Норма витрати	Хвороби та шкідники
Зернові: пшениця, ячмінь, кукурудза, соняшник	I фаза обробка насіння II фаза кушіння III фаза виходу в трубку	3л Гаупсіна на 1 тонну насіння; 5-6 л/га	іржа, головешка, гниль сходів, хлібний клопик, пшеничний трипс, аскохітоз, клоп-черепашка, пліснявіння насіння, огневка, фузаріоз колоса, соняшниковий вусань, борошниста роса, смугаста-сітчаста плямистість, пероноспороз
Сади	I фаза зелений конус II фаза висування бутонів III фаза після цвітіння IV фаза через 15 днів після III обробки V фаза через 12 днів після IV обробки VI фаза перед збором врожаю	25-30 л/га	Моніліоз, курчавість, біла плямистість, парша, попелиця, довгоносик, букарка, казарка, плодожерка, вишнева муха, борошниста роса, плодові гнилі, гусениці, коккомікоз вишні, бурий кліщ, чорна, червона попелиця, яблучна та плодова міль, чорний рак, бура - дичата плямистість

Виноград	I фаза розпускання бруньок II фаза перед цвітінням III фаза після цвітіння IV фаза через 12-14 днів після III обробки V фаза зростання ягід VI фаза в міру необхідності	5-6 л/га	чорна плямистість, Гронова листовертка, сіра гниль, мілдью, оїдіум, листовійка, павутинний кліщ, виноградний зудень, мармуровий хрущ, виноградна пістрянка
Овочеві: огірки, помідори, перець, баклажани, цибуля, капуста, кабачки, морква та інші овочі	I Замочування насіння II фаза при появі 3-х справжніх листків III фаза перед цвітінням IV фаза через 10 днів після III обробки V фаза при досяганні VI фаза в міру необхідності	5 л/га	Паросткова муха, баштанна попелиця, кореневі гнилі, борошниста роса, антракноз, фузаріозне в'янення, бактеріоз, бура плямистість, бактеріальний рак, чорна ніжка, чорна цвіль, макроспоріоз, цибульний кліщ, цибульна моль, морквяна муха, огірковий комарик, скручування листя
Ягідні: смородина, агрус, малина, суниця, обліпіха, кавун, диня та інші ягідні культури	I фаза перед цвітінням II фаза після цвітіння III фаза через 10-14 днів після II обробки IV фаза через 10-14 днів після III обробки	5 л/га	смородиновий бруньковий кліщ, смородина моль, листкова галиця, ягідний пильщик, попелиці, вузкотіла златка, американська борошниста роса, антракноз, столбчата іржа, махровість листя, листовійка, суничний листоїд, сіра гниль, хлороз, мозаїка малини

Стислий опис зовнішнього вигляду та фізико-хімічних характеристик продукції:

- Опис: культуральна рідина штамів виду *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* та їх метаболіти.
- Зовнішній вигляд: рідина світло-жовтого кольору з опалесценцією.
- Запах: незначний специфічний запах бактеріального концентрату.
- Водневий показник розчину препарату, од. pH: 6,3-7,3.
- Колір: суспензія від світло-жовтого до світло-бурого чи бурого кольору.
- Загальна кількість життєздатних клітин *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* (КУО): не менше 1×10^{10} .
- Загальна кількість сторонніх мікроорганізмів: не більше 1%.

Нормативні вимоги до упаковки, маркування, зберігання та терміну придатності продукції наведено у таблиці «табл. 1.2».

Таблиця 1.2

Нормативні вимоги до готового продукту

Характеристики	Вимоги
Маркування	Згідно з ГОСТ 28471 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение»
Дата виготовлення	Вказується на етикетці
Упаковка	Згідно з ГОСТ 28471 в ПЕТ-ємності (пляшки чи каністри) об'ємом 0,5, 1, 5, 10 л
Термін придатності	6 місяців при $t^{\circ} +4 \dots +10^{\circ} \text{C}$, 4 місяці при $t^{\circ} +20 \dots +50^{\circ} \text{C}$
Умови зберігання	Зберігати в закритих приміщеннях, уникаючи попадання прямих сонячних променів. Препарат не можна заморожувати.

Біопрепарат гаупсин є безпечний для навколишнього середовища, людей, тварин і комах (4-й клас небезпеки) [3]. Пестицидні препарати III і IV класів небезпечності можуть використовуватись без обмежень за умови дотримання встановлених гігієнічних регламентів [4].

Заходи безпеки при використанні:

- Працюючих з отрутохімікатами слід забезпечити спецодягом з щільної, пилонапроникної тканини, спеціальним взуттям, респіраторами, захисними окулярами, рукавицями;

- Робота з отрутохімікатами повинна проводитися під керівництвом спеціалістів із захисту рослин або агрономів, які мають підготовку по заходах безпеки при роботі з отрутохімікатами;

- Уникати контакту шкіри, очей і одягу з препаратом та робочим розчином. Не вдихати пил та аерозольні випари;

- При роботі з отрутохімікатами потрібно дотримуватись правил особистої гігієни, на місцях роботи не приймати харчі, не пити, не палити. Перед харчуванням потрібно зняти спецодяг, вимити з милом руки і лице, прополоскати рот. Після роботи слід добре струсити одяг і прийняти душ;

- Спецодяг і захисні засоби перед їх повторним використанням піддавати очистці;

- В місцях роботи з отрутохімікатами забороняється зберігання харчів, води, фуражу та предметів домашнього побуту;

- Тривалість роботи з отрутохімікатами не повинна перевищувати 6 годин, а при використанні сильнодіючих отрут (препаратів ртуті, миш'яку. Фосфорорганічних сполук) – 4 години;

- Забороняється залишати отрутохімікати в полі та інших місцях без охорони;

- Випас худоби та укіс на оброблених гербіцидами ділянках дозволяється не раніше, як через 45 діб після обробки.

При роботі з пестицидами потрібно не допускати:

- Забруднення іригаційних вод і водних джерел, що використовуються для побутових потреб;

- Забруднення харчових продуктів і кормів;

- Випас худоби на оброблених територіях;

- Збирання врожаю або кормів протягом строків очікування.

Перша медична допомога при попаданні препарату на шкіру, в очі, шлунок, при вдиханні:

У разі будь-якого нездужання негайно припинити роботу, вжити заходів першої допомоги і викликати лікаря.

При попаданні препарату:

- У шлунок – необхідно дати постраждалому випити декілька стаканів води та викликати блювоту. Для більш повного видалення препарату із організму треба повторити це декілька раз. Після чого необхідно дати випити півсклянки 2% розчину питної соди, розмішати 2-3 столові ложки активованого вугілля;

- В очі – зняти препарат ватою або куском матерії та ретельно змити його теплою водою з милом (для фосфорорганічних – попередньо обробити 5-10% розчином аміаку або 2-5% розчином хлораміну);

- При інгаляційному попаданні в організм – постраждалого вивести із небезпечної зони, дати доступ свіжого повітря.

У разі необхідності доставити потерпілого в лікувальну установу для надання спеціалізованої допомоги. Лікування симптоматичне [5].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, СКЛАДУ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ

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

Бактерії роду *Pseudomonas* є однією з найбільш вивчених груп бактерій, які є антагоністами для ґрунтових фітопатогенів. До цього часу було виділено безліч штамів ризоферних псевдомонад, які пригнічують або сповільнюють ріст і розвиток фітопатогенних грибів і бактерій.

Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens) належить до непатогенних бактерій, які використовуються в якості ризобактерій для стимулювання росту рослин [6], що є актуальним на сьогоднішній день. Розглянемо порівняльну характеристику представників виду *Pseudomonas chlororaphis*, яка наведена в табл. 2.1.

У табл. 2.1 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 при рості на поживному середовищі з гліцерином, в якості джерела вуглецю, вартість якого складає 6,30 грн/л (табл.2.2), характеризується найменшим часом культивування (44 год), в порівнянні з усіма іншими представниками та відносно непоганим показником кінцевої концентрації біомаси 11,79 г/л [7].

При вирощуванні даного ж штаму тільки використовуючи яблучну м'якоть в якості джерела вуглецю замість гліцерину, час культивування значно збільшується (70 год), а показник кінцевої концентрації біомаси зменшується та становить 8,74 г/л [8]. Проте проаналізувавши табл. 2.2, можна побачити, що вартість середовища є найнижча (4,61 грн/л) за інші поживні середовища, які були наведені.

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, СКЛАДУ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ	Лім.		Арк.	Аркуші		
Розроб.		Дука К.Г.						17	118		
Перевір.		Буценко Л.М.				Кафедра БТМ					
Реценз.											
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

З наведеної інформації порівняльної характеристики представників виду *Pseudomonas chlororaphis* наведеної в табл. 2.1, *Pseudomonas chlororaphis* НТ66 має найбільший показник кінцевої концентрації біомаси (16,83 г/л) в порівнянні з іншими представниками, не зважаючи на довший час вирощування біологічного агента (72 год). Проте у табл. 2.3 показано, що вартість поживного середовища набагато вища за попередні (69,85 грн/л).

Pseudomonas chlororaphis PA23-63 володіє найменшою кінцевою концентрацією біомаси 5,82 г/л та найбільшим часом культивування 96 год [9]. У табл. 2.2 можна побачити, що біологічний агент має найвищу вартість середовища для культивування (71,20 грн/л) та найменшою кількістю утворенням біомаси за годину, але має найвищу вартість за 1 грам цільового продукту (табл. 2.3).

Отже, найефективнішим біологічним агентом є *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603. Щоб переконатися, розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість біомаси, синтезованих штамом, є найнижчою (23,52 грн/г), а кількість утворених біомаси за 1 год – найвищою (0,2679 г/год).

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика представників виду *Pseudomonas chlororaphis*

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> DSM 19603	Гліцерин	40	44	11,79	30 °C, pH 7,0, 44 год, концентрація розчиненого кисню 30 %, 300 об/хв, дробне внесення гліцерину в процесі культивування починаючи з 22 год	De Meneses L., Pereira J. R., Sevrin C., Grandfils C. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> as a multiproduct platform: Conversion of glycerol into high-value biopolymers and phenazines. <i>New Biotechnology</i> . 2019. doi:10.1016/j.nbt.2019.10.002
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,7				
	K ₂ HPO ₄	5,8				
	KH ₂ PO ₄	3,7				
	Розчин MgSO ₄	0.01				
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0.001				
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	2,78				
	CoSO ₄ ×7H ₂ O	1,98				
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	2,81				
	CuCl ₂ ×2H ₂ O	1,67				
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> DSM 19603	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,17	70	8,74	30 °C, pH 7,0, концентрація розчиненого кисню 30%, 300 об/хв	Pereira J. R., Araújo D., Freitas P., Marques A. C. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> : Cultivation on fruit pulp waste and polymer characterization. <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> . 2021, 167, 85–92. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.162
	Супернатант яблучної м'якоті *	40				
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,3				
	K ₂ HPO ₄	5,8				
	KH ₂ PO ₄	3,7				
	Розчин MgSO ₄	0.01				
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0.001				
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	2,78				
	CoSO ₄ ×7H ₂ O	1,98				
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	2,81				
	CuCl ₂ ×2H ₂ O	1,67				
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,17				
		0,29				

Примітка: * Супернатант яблучної м'якоті вноситься в кількості яка дозволить отримати концентрацію цукрів 40 г/л.

Закінчення табл.2.1

<i>Pseudomonas chlororaphis</i> HT66	Глюкоза Гліцерин Триптон Лауринова кислота MgSO ₄ K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	20 18,9 20 5 0,732 0,673	72	16,83	28 °C, 200 об/хв	Li H.-L., Deng R.-X., Wang W., Liu K.-Q., Hu H.-B. Biosynthesis and Characterization of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate with an Enriched 3-Hydroxydodecanoate Monomer from a <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Cell Factory. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> . 2021, 69(13), 3895–3903. doi:10.1021/acs.jafc.1c00500
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PA23-63	Рапсова олія Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ × 7H ₂ O Цитрат заліза амонію CaCl ₂ × 2H ₂ O Розчин мікроелементів: H ₃ BO ₃ – CoCl ₂ × 6H ₂ O ZnSO ₄ × 7H ₂ O MnCl ₂ × 4H ₂ O NaMoO ₄ × 2H ₂ O NiCl ₂ × 6H ₂ O CuSO ₄ × 5H ₂ O	10 3,7 0,83 2 0,2 0,06 0,01 0,001 0,3 0,2 0,1 0,03 0,03 10	96	5,82	30 °C, 150 об/хв	Sharma P. K., Munir R. I., de Kievit T. Synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from vegetable oils and free fatty acids by wild-type and mutant strains of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> . <i>Canadian Journal of Microbiology</i> . 2017, 63(12), 1009–1024. doi:10.1139/cjm-2017-0412

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів біомаси

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)*
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> DSM 19603	Гліцерин	40	43,99	1,7596	1
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,7	69	0,207	2
	K ₂ HPO ₄	5,8	261	1,305	3
	MgSO ₄	0,01	24	0,24	4
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	2,78	57	0,114	5
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	1,98	208	0,208	6
	CoSO ₄ ×7H ₂ O	2,81	720	1,44	7
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	1,61	15	0,015	8
	CuCl ₂ ×2H ₂ O	0,17	747	0,747	9
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,29	130	0,26	10
Вартість 1 л середовища – 6, 30 грн					
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> DSM 19603	Супернатант яблучної м'якоті	40	20	0,08	11
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,3	69	0,207	2
	K ₂ HPO ₄	5,8	261	1,305	3
	Розчин MgSO ₄	0,01	24	0,24	4
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	2,78	57	0,114	5
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	1,98	208	0,208	6
	CoSO ₄ ×7H ₂ O	2,81	720	1,44	7
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	1,61	15	0,015	8
	CuCl ₂ ×2H ₂ O	0,17	747	0,747	9
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,29	130	0,26	10
Вартість 1 л середовища – 4,61 грн					
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> HT66	Глюкоза	20	150	3	12
	Гліцерин	18,9	43,99	0,8314	1
	Триптон	20	3245,12	64,9024	13
	Лауринова кислота	5	190	0,95	14
	MgSO ₄	0,732	150	0,1098	15
	K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	0,673	60	0,040	16
Вартість 1 л середовища – 69,85 грн					
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PA23-63	KH ₂ PO ₄	0,83	261	0,216	3
	Рапсова олія	10	158	1,58	17
	Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O	3,7	80	0,296	18
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	112,27	0,224554	19
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,2	90	0,018	20
	Цитрат заліза амонію	0,06	4574,28	0,274456	21
	CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,01	15	0,00015	9
	H ₃ BO ₃	0,3	69	0,0207	22
	CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,2	1968	0,3936	23

	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,1	130	0,013	10
	MnCl ₂ × 4H ₂ O	30	208	6,24	6
	NaMoO ₄ × 2H ₂ O	30	1600	48	24
	NiCl ₂ × 6H ₂ O	20	600	12	25
	CuSO ₄ × 5H ₂ O	10	184	1,84	26
Вартість 1 л середовища – 71,20 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на січень 2024 р. – 1 - [Гліцерин](#); 2 - [Гідрофосфат амонію](#); 3 - [Гідроортофосфат калію](#); 4 - [Розчин 100 мМ MgSO₄](#); 5 - [Залізний купорос](#); 6 - [Марганець хлорид тетрагідрат](#); 7 - [Гептагідрат сульфату кобальту\(II\)](#); 8 - [Хлорид кальцію](#); 9 - [Хлорид міді](#); 10 - [Сульфат цинку гептагідрат](#); 11 - [Супернатант яблучної м'якоти](#); 12 - [Глюкоза](#); 13 - [Триптон](#); 14 - [Лауринова кислота](#); 15 - [Сульфат магнію](#); 16 - [Дигідрофосфат калію](#); 17 - [Рапсова олія](#); 18 - [Гептагідрат гідрофосфату натрію](#); 19 - [Сульфат амонію](#); 20 - [Гептагідрат сульфату магнію](#); 21 - [Цитрат заліза амонію](#); 22 - [Борна кислота](#); 23 - [Хлорид кобальту Гексагідрат](#); 24 - [Молібдат натрію](#); 25 - [Нікел\(II\) хлорид гексагідрат](#); 26 - [Купрум\(II\) сульфат пентагідрат](#)

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г біомаси, синтезованих на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утворених біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> DSM 19603	11,79	44	0,2679	6,30	23,52
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> DSM 19603	8,74	70	0,1248	4,61	36,94
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> HT66	16,83	72	0,2333	69,85	295,76
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PA23-63	5,82	96	0,0606	71,20	1174,92

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

До складу бактеріальної клітини входять наступні елементи (в % до маси сухої речовини): Карбон – 50; Оксиген – 20; Нітроген – 10...14; Гідроген – 8; Фосфор – 3; Сульфур, Калій, Натрій - 1; Кальцій, Магній, Хлор – 0,5; Ферум – 0,2; решта елементів – близько 0,3.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 11,79 г біомаси становить $11,79 \times 0,5 = 5,895$ г. У 92 грамах гліцерину містить 36 грам Карбону, а 5,895 грам карбону міститься в:

$$(5,895 \times 92) / 36 = 15,065 \text{ грам гліцерину}$$

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення» потрібно:

$$(15,065 \times 100\%) / 40\% = 37,66 \text{ грам гліцерину}$$

Так як у нас 37.66 грам гліцерину потрібно для синтезу 11,79 грам біомаси, а у нас 40 грам гліцерину цього буде достатньо для біосинтезу за Карбоном.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

У біомасі міститься 10 % Нітрогену, отже вміст Нітрогену у 11,79 г біомаси становить $11,79 \times 0,1 = 1,179$ г. У 132 грам $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ міститься 28 грам Нітрогену, а у 5.7 грам $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$:

$$(28 \times 5.7) / 132 = 1,2 \text{ грам Нітрогену}$$

Так як у $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ є 1.2 грами Нітрогену а для біосинтезу потрібно 1.179 розрахунок біомаси 11.79 за Нітрогеном можливе.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

У біомасі міститься 3 % Фосфору, отже вміст Фосфору у 11,79 г біомаси становить $11,79 \times 0,03 = 0,3537$ г. У 132 грам $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ міститься 31 грам Нітрогену, а у 5.7 грам $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$:

$$(31 \times 5.7) / 132 = 1,34 \text{ грам Фосфору}$$

Так як у $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ є 1,34 грами Фосфору а для біосинтезу потрібно 0,3537 розрахунок біомаси 11.79 за Фосфором можливе.

Інші компоненти середовища

Джерелами таких необхідних для росту бактерій елементів, як Fe^{2+} - FeSO_4 , Кальцію - CaCl_2 Магнію - MgSO_4 , Мангану - MnCl_2 , міді - CuCl_2 , Сульфур - MgSO_4 , FeSO_4 , CoSO_4 та ZnSO_4 .

Зробивши повний перерахунок даного поживного середовища можна зробити висновок що синтез біомаси 11.79 для *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 є можливим.

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

Під час мікроскопіювання фарбованих за Грамом препаратів добових культур, вирощених на відповідному поживному середовищі (МПА), ідентифікують забарвлення характерне для грамнегативних прямих або злегка вигнутих паличок *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 завдовжки 1,5–2,5 мкм і завширшки 0,5–0,8 мкм; клітини поодинокі або попарно, рухливі завдяки одній полярній джгутиковій нитці [10].

При культивуванні на М'ясо-пептонному агарі (МПА) з інкубацією при температурі 30 °C протягом 1-2 діб, очікується ріст колоній з характерною пігментацією, зумовленою синтезом оранжєвих феназинових сполук (зокрема феназин-1-карбоксамід та феназин-1-карбонова кислота). Враховуючи властивості штаму, що проявляються на Nutrient Agar (середовищі зі схожим поживним складом), колонії на МПА, ймовірно, будуть круглими, опуклими, гладенькими, блискучими, з кольором від абрикосового до яскраво-оранжєвого та діаметром 2–3 мм після відповідного часу інкубації.

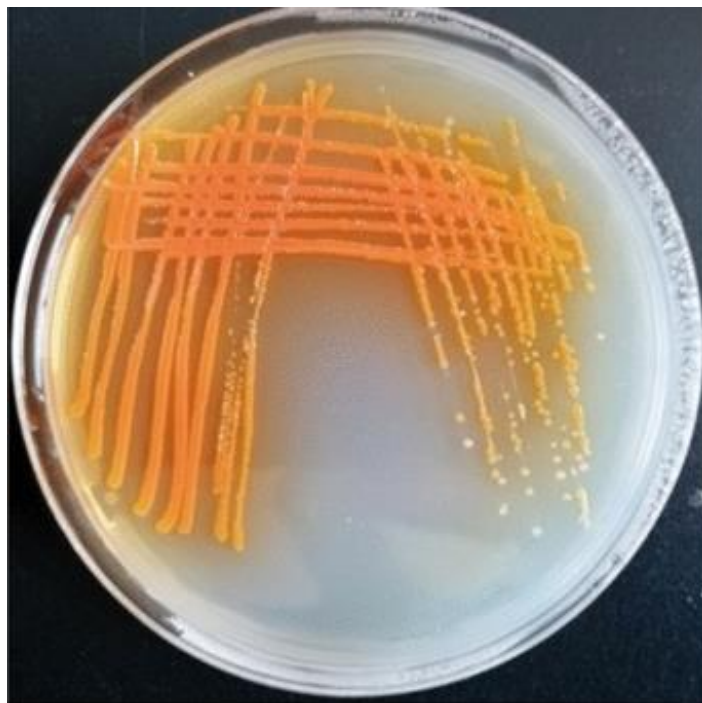


Рис. 2.3. Зображення пророслої культури *Pseudomonas chlororaphis* на МПА та її культуральні ознаки [60].

Спектр фізіолого-біохімічних властивостей штаму *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 залишається типовим:

Облігатний аероб, мезофіл (діапазон росту 4–37 °С, оптимум 28–30 °С).

Синтез вторинних метаболітів. Продукує феназинові пігменти з вираженою протигрибною активністю; секретує сидерофори (піровердинового типу), HCN та індол-3-оцтову кислоту, забезпечуючи ростостимулювальні та біоконтрольні властивості [11,12]. Толерантність до NaCl до 4 % мас.; оптимальний рН 6,0–7,0 [10].

Таким чином, DSM 19603 демонструє типовий для представників роду *Pseudomonas* набір морфолого-біохімічних ознак, а характерна оранжева пігментація колоній, що очікується і на МПА, слугує швидким діагностичним маркером при первинній ізоляції та ідентифікації.

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна філогенетична класифікація *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 наведена згідно з BacDive базою даних [10]:

Домен – Bacteria;

Тип - Pseudomonadota (Proteobacteria);

Клас – Gammaproteobacteria;

Порядок – Pseudomonadales;

Родина – Pseudomonadaceae;

Рід – *Pseudomonas*;

Вид - *Pseudomonas chlororaphis*;

Підвид - *P. chlororaphis subsp. aurantiaca*;

Штам - DSM 19603.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Світовий ринок мікробних препаратів для рослинництва щорічно зростає на декілька відсотків і до 2030 року за прогнозами сягне 5.30 млрд доларів [13] це зумовлено підвищенням загальної ефективності біодобрих та біопестицидів на основі симбіотичних та не симбіотичних організмів, а також загальносвітовою тенденцією на підвищення родючості ґрунтів та збільшення частки органічного землеробства з зменшенням частоти використання хімічних пестицидів. Сучасні інтенсивні методи землеробства передбачають використання широкого спектру мінеральних добрив та хімікатів, якщо перші представлені переважно неорганічними солями і в високих концентраціях порушують мікробіом ґрунту та призводять до зміни реакції ґрунту або до занадто кислої або занадто лужної, то інші, а саме хімікати для боротьби з патогенами, бур'янами та комахами є більш згубними, бо найчастіше без прямого втручання вони не повністю виводяться з ґрунту та рослин протягом сезону і накопичуються в них. Споживання рослинної продукції в яких перевищені норми концентрації фунгіцидів, інсектицидів або гербіцидів призводить до довготривалого поступово погіршення здоров'я людини, і найчастіше згодом може призвести до утворення злоякісних пухлин в організмі та зниження імунітету [14].

Всі сучасні біодобрива на основі корисних бактерій не включають в себе жодний патогенний або умовно патогенний штам мікроорганізмів, що робить їх безпечною альтернативою використання хімікатів. Оскільки *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 позиціонується як біологічний фунгіцид, то для аналізу потреби в цільовому продукті варто звернутися до

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Лім.	Арк.	Аркуші	
Розроб.		Дука К.Г.							
Перевір.		Буценко Л.М.					27	118	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

статистики використання фунгіцидів в агропромисловості України.

Так на момент кінця 2023 року було задекларовано використання 3954 т фунгіцидів та бактерицидів, всього було оброблено пестицидами 24165 тис га, тобто в середньому було використано 0.164 г/мл фунгіцидів або бактерицидів на га оброблюваних площ.

Також за даними державної служб статистики відомо, що на 243 тис га були використані біологічні засоби захисту рослин, тобто задекларовано всього 1% фермерів використовують біологічні засоби захисту рослин з або замість хімічних аналогів.

Оскільки біофунгіцид на основі *Pseudomonas chlororaphis* є універсального призначення, яке може бути застосоване як для боротьби так і профілактики, як і грибних патогенів, так і комах-шкідників, то його використання не обмежується тільки сільсько-господарськими польовими культурами, також він може бути використаний в садівництві, виноградарстві та ягідництві, також на приватних садибних ділянках та фермерами, що вирішують використовувати біологічні пестициди, тому враховуючи ці всі фактори, пропонується орієнтуватися на ринок споживачів, що займаються вирощуванням овочів в закритому ґрунті, виходячи з того, що останніми роками державою було засновано декілька програм з підтримки та започаткуванню тепличного бізнесу. Загалом за 2023 рік було висаджено 4402 га овочів закритого ґрунту

Пропонується ввести коефіцієнт 30%, як потенційних додаткових покупок продукції, через те що препарат не має прив'язки до конкретних культур і може бути застосований, як у закритому, так і в відкритому ґрунті. Тобто $4402 \text{ га} * 1.3 = 5722.6 \text{ га}$, де потенційно може бути застосований препарат «Гаубсин».

На ринку України широко представлені препарати типу «Гаубсин» або його аналоги з ідентичною потенційною дією, але іншим біологічним агентом, результати представлені в таблиці 3.1.

«Гаубсин» та його аналоги представлені на ринку України

Назва	Компанія-виробник	Біологічний агент/концентрація КУО	Джерело
Гаубсин FORTE	ТОВ «ENZIM»	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 4x10 ⁹ КУО/мл.	https://agro.enzim.biz/gaubsin.html
Триходермін	ТОВ «ENZIM»	<i>Trichoderma spp.</i> з титром не менше 1x10 ⁸ КУО/мл	https://agro.enzim.biz/trihodermin-viridin.html
ФІТОХЕЛП® біофунгіцид	ТОВ «BTU-centre»	<i>Bacillus subtilis</i> - не менше ніж 4x10 ⁹ КУО/см	https://btu-center.com/promisloviy-sektor/roslinnistvo/b-ofung-tsidi/fitokhelp/
Гаупсин	ТОВ «Добрий хазяїн»	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> B-111 і B-306, . <i>Tump</i> 10x10 ³ /мкг	https://bio-agro-zahist.com.ua/produksiya/biopreparaty/

3.2. Розрахунок потужності виробництва біофунгіциду «Гаупсин»

Виходячи з таблиці 3.1 можна прийти до висновку про широкий асортимент біофунгіцидів та інсектицидів на ринку України, список не є вичерпним, існує ще багато аналогів, але їх якість є сумнівною, оскільки в них не зазначений титр, адреса виробника та інші важливі показники, але через свою цінову політику не має сумнівів, що й мінорні представники ринку можуть користуватись популярністю.

Виходячи з того, що популярність органічного землеробства в Україні залишається на низькому рівні, планується виробляти препарат на рівні закриття 10% потреб потенціального ринку.

Як відомо в середньому в незалежності стадії росту рослини препарат «Гаупсин» в середньому використовують на овочеві культури на рівні 3 л/га 5 разів на сезон.

розраховуємо потребу 10% ринку:

Середня потреба*5722.6 га * 0.1

$$((3 * 5) * 5722.6) * 0.1 = 8584 \text{ л}$$

Для задоволення потреб 10% ринку необхідно 8584 л препарату. Оскільки готовий продукт є культуральною рідиною, для подовженого терміну зберігання, пропонується вносити в якості консерванту бензоат натрію на рівні 0.2% масової частки культуральної рідини. Враховуючи витіснення об'єму, а також потенційні втрати при розливі культуральної рідини по тарам на рівні 5%, отримуємо, що підприємство має виробляти:

$$8584 * 1.1 = 9442 \text{ л КР на рік.}$$

Розрахунок виходу культуральної рідини за 1 цикл ферментації для подальшого розрахунку кількості стадій підготовки посівного матеріалу, кількість трудоднів беремо за 30:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 9442 / 30 = 314.3 \text{ л/день}$$

Кількість культуральної рідини для створення культуральної рідини для препарату «Гаупсин» за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_d * T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 * 0.3143 * 52) / 24 = 0.750 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

Де:

K_1 – коефіцієнт запасу, який враховує втрати цільового продукту від нестерильних операцій, які визначаються величиною

$V_{\text{кр}}$ – кількість культуральної рідини за рік, м^3 (л)

$T_{\text{цф}}$ – тривалість циклу роботи ферментера, год.

$T_{\text{рд}}$ – кількість робочих днів на рік ($T_{\text{рд}} = 30 \dots 330$)

Підготовка ферментера включає: миття дезінфікуючими розчинами та візуальний огляд (2 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_3 ,

визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_3 = 0.750/0,6 = 1.25 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею 3.2, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{\Phi} = 1.25 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 0.75/1.25 = 0,6 - \text{є ідентичним заданому значенню}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.

1. Початковий об'єм культуральної рідини:

Для виробничого циклу обрано ферментер об'ємом 1.25 м^3 який забезпечує отримання 750 літрів культуральної рідини за один виробничий цикл. Втрати культуральної рідини внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря становлять 10%. Таким чином, з урахуванням втрат, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед біосинтезом визначається за формулою:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\Phi}) = 0.75 * 1,1 = 0.825 \text{ м}^3$$

де:

- $V_{\text{кр}}$ – об'єм культуральної рідини, який дорівнює 0.75 м^3 ;
- E_{Φ} – втрати через краплевинос (10%).

Розрахунок робочого та геометричного об'єму ферментера

Для визначення геометричного об'єму ферментера необхідно врахувати коефіцієнт заповнення, який для аеробних процесів зазвичай дорівнює 0,6. Таким чином, геометричний об'єм ферментера можна розрахувати за формулою:

$$V_{\Phi} = V_{\text{роб.1}} / 0.6 = 0.825 / 0.6 = 1.375 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер на 1.25 м^3 . Уточнений коефіцієнт заповнення для даного ферментера становить:

$$K_{з.1}=0.825/1.25=0,66$$

Цей коефіцієнт знаходиться трошки вище допустимих для аеробних процесів (0,55-0,65), але все ще є прийнятним, оскільки протягом культивування об'єм КР буде поступово зменшуватися через краплинонос, і вже протягом перших годин культивування досягне коефіцієнту 0.65.

Розрахунок кількості виробничих циклів на рік (N циклів)

Для визначення кількості виробничих циклів, необхідних для задоволення річної потреби у культуральній рідині, використовуються наступні вихідні дані:

- Річна потреба у культуральній рідині ($V_{гп}$) = 9442 л
- Об'єм культуральної рідини, що виробляється за один цикл ($V_{цк}$) = 750 л/цикл

Кількість виробничих циклів на рік ($N_{циклів}$) розраховується за формулою:

$$N_{циклів} = V_{гп} / V_{цк}$$

Підставляючи відомі значення у формулу, отримуємо:

$$N_{циклів} = 9442 \text{ л} / 750 \text{ л/цикл} \approx 12,589 \text{ циклів}$$

Оскільки кількість виробничих циклів повинна бути цілим числом, отримане значення округлюється до найближчого більшого цілого для забезпечення виконання річного плану виробництва.

$$N_{циклів} = 13 \text{ циклів на рік.}$$

Таким чином, для виробництва запланованого об'єму культуральної рідини в 9442 літри на рік, при продуктивності одного циклу 750 літрів та тривалості циклу 52 години, необхідно здійснити 13 повних виробничих циклів. При цьому загальний об'єм виробленої культуральної рідини становитиме:

$$13 \text{ циклів} * 750 \text{ л/цикл} = 9750 \text{ л.}$$

Це значення дещо перевищує розрахункову річну потребу, що створює невеликий виробничий резерв.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для виробництва препарату «Гаупсин»

Етап 1: Параметри основного виробничого ферментера (Стадія IV)

1.1. Робочий об'єм культуральної рідини в основному ферментері ($V_{\text{кр.ферм}}$), що необхідний для отримання цільового продукту, становить:

$$V_{\text{кр.ферм}} = 0.750 \text{ м}^3$$

1.2. Робочий об'єм середовища в основному ферментері ($V_{\text{роб.1}}$), що враховує втрати на краплинонос, розраховується за формулою:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр.ферм}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 0.750 \text{ м}^3 * (1 + 0,1) = 0.750 \text{ м}^3 * 1,1 = 0.825 \text{ м}^3$$

1.3. Об'єм посівного матеріалу ($V_{\text{пм.1}}$), необхідний для інокуляції основного ферментера, становить 10% від робочого об'єму середовища:

$$V_{\text{пм.1}} = V_{\text{роб.1}} * X_{\text{ф}} = 0.825 \text{ м}^3 * 0,1 = 0.0825 \text{ м}^3$$

1.4. Об'єм поживного середовища в основному ферментері ($V_{\text{пс.1}}$):

$$V_{\text{пс.1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм.1}} = 0.825 \text{ м}^3 - 0.0825 \text{ м}^3 = 0.7425 \text{ м}^3$$

Етап 2: Параметри першого посівного апарату (Стадія III)

2.1. Об'єм культуральної рідини ($V_{\text{кр.па1}}$), який необхідно отримати у першому посівному апараті, дорівнює об'єму посівного матеріалу для основного ферментера:

$$V_{\text{кр.па1}} = V_{\text{пм.1}} = 0.0825 \text{ м}^3$$

2.2. Робочий об'єм середовища у першому посівному апараті ($V_{роб.2}$) з урахуванням втрат:

$$V_{роб.2} = V_{кр.па1} * (1 + Eф) = 0.0825 \text{ м}^3 * (1 + 0,1) = 0.09075 \text{ м}^3$$

2.3. Геометричний об'єм першого посівного апарату ($V_{г.па1}$) розраховується за формулою:

$$V_{г.па1} = V_{роб.2} / Kз = 0.09075 \text{ м}^3 / 0,6 = 0.15125 \text{ м}^3$$

Приймаємо найближчий стандартний геометричний об'єм посівного апарату $V_{ст.па1} = 0.16 \text{ м}^3$.

Перевіряємо коефіцієнт заповнення для обраного апарату:

$$Kз.па1 = V_{роб.2} / V_{ст.па1} = 0.09075 \text{ м}^3 / 0.16 \text{ м}^3 \approx 0,567 \text{ (що є прийнятним, } 0,55\text{-}0,65\text{)}$$

2.4. Об'єм посівного матеріалу ($V_{пм.2}$), необхідний для інокуляції першого посівного апарату:

$$V_{пм.2} = V_{роб.2} * Xф = 0.09075 \text{ м}^3 * 0,1 = 0.009075 \text{ м}^3 \text{ (або } 9,075 \text{ л)}$$

2.5. Об'єм поживного середовища у першому посівному апараті ($V_{пс.2}$):

$$V_{пс.2} = V_{роб.2} - V_{пм.2} = 0.09075 \text{ м}^3 - 0.009075 \text{ м}^3 = 0.081675 \text{ м}^3 \text{ (або } 81,675 \text{ л)}$$

Етап 3: Параметри другого посівного апарату (Стадія II)

3.1. Об'єм культуральної рідини ($V_{кр.па2}$), який необхідно отримати у другому посівному апараті:

$$V_{кр.па2} = V_{пм.2} = 0.009075 \text{ м}^3$$

3.2. Робочий об'єм середовища у другому посівному апараті ($V_{роб.3}$) з урахуванням втрат:

$$V_{роб.3} = V_{кр.па2} * (1 + Eф) = 0.009075 \text{ м}^3 * (1 + 0,1) = 0.0099825 \text{ м}^3 \text{ (або } 9,9825 \text{ л)}$$

3.3. Геометричний об'єм другого посівного апарату ($V_{г.па2}$):

$$V_{г.па2} = V_{роб.3} / Kз = 0.0099825 \text{ м}^3 / 0,6 = 0.0166375 \text{ м}^3 \text{ (або } 16,6375 \text{ л)}$$

Приймаємо найближчий стандартний геометричний об'єм посівного апарату $V_{ст.па2} = 0.02 \text{ м}^3$ (20 л).

Перевіряємо коефіцієнт заповнення для обраного апарату:

$$K_{з.па2} = V_{роб.3} / V_{ст.па2} = 0.0099825 \text{ м}^3 / 0.02 \text{ м}^3 \approx 0,5.$$

3.4. Об'єм посівного матеріалу ($V_{пм.3}$), необхідний для інокуляції другого посівного апарату:

$$V_{пм.3} = V_{роб.3} * X_{ф} = 0.0099825 \text{ м}^3 * 0,1 = 0.00099825 \text{ м}^3 \text{ (або 0,99825 л, приймаємо за 1 л)}$$

3.5. Об'єм поживного середовища у другому посівному апараті ($V_{пс.3}$):

$$V_{пс.3} = V_{роб.3} - V_{пм.3} = 0.0099825 \text{ м}^3 - 0.00099825 \text{ м}^3 = 0.00898425 \text{ м}^3 \text{ (або 8,98425 л, у проєкті 9.08 л)}$$

Етап 4: Параметри початкової стадії культивування в колбах (Стадія І)

4.1. Об'єм культуральної рідини ($V_{кр.колб}$), який необхідно отримати в колбах для інокуляції другого посівного апарату:

$$V_{кр.колб} = V_{пм.3} = 0.001 \text{ м}^3 \text{ (1 л)}$$

4.2. Розрахунок кількості колб ($N_{колб}$). Використовуються качалочні колби об'ємом

$$V_{г.колби} = 750 \text{ мл (0.00075 м}^3\text{)} \text{ з коефіцієнтом заповнення } K_{зк} = 0,2.$$

Робочий об'єм однієї колби ($V_{роб.1колби}$):

$$V_{роб.1колби} = V_{г.колби} * K_{зк} = 0.00075 \text{ м}^3 * 0,2 = 0.00015 \text{ м}^3 \text{ (150 мл)}$$

Кількість колб:

$$N_{колб} = V_{кр.колб} / V_{роб.1колби} = 0.001 \text{ м}^3 / 0.00015 \text{ м}^3 \approx 6.67$$

Приймаємо $N_{колб} = 7$ колб.

Результати розрахунків відображені у таблиці 3.2.

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

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$, м ³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини $V_{роб.}$, м ³ (л)	Об'єм посівного матеріалу $V_{пм}$, м ³ (л)	Об'єм поживного середовища $V_{пс}$, м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера $V_{ст}$, м ³ (л)
IV	0.75	0.825	0.0825	0.742	0.63	1.25
III	0.0825	0.091	0.0091	0.082	0,56	0.16
II	9.1(л)	10.08(л)	1(л)	9.08(л)	0.46	0.016
I	1(л)	-	0.015(л/колба)	1(л)	0.2	7 колб

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Стандартним джерелом вуглецю для *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 є глюкоза, але даний мікроорганізм також здатен використовувати й інші вуглеводні субстрати. Для дослідження шляху катаболізму ростового субстрату гліцерину до пірувату у *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 була використана база даних Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

Катаболізм гліцерину починається з його першого перетворення на гліцеральдегід. Хоча це перетворення часто відбувається через проміжний гліцерон (дигідроксіацетон), початковий етап каталізується ферментом гліцериндегідрогеназою (КФ 1.1.1.6), що окиснює гліцерин. Наступним етапом є перетворення гліцеральдегіду на гліцерат під дією ферменту альдегіддегідрогенази (NAD⁺) (КФ 1.2.1.3).

Далі, гліцерат фосфорилується до 2-фосфогліцерату. Ця реакція здійснюється за участі ферменту гліцерат-2-кінази (КФ 2.7.1.165), що додає фосфатну групу до 2-го атому вуглецю. Подальша дегідратація 2-фосфогліцерату призводить до утворення фосфоенолпірувату. Ця реакція каталізується ферментом енолазою (КФ 4.2.1.11).

Заключним етапом катаболізму є перетворення фосфоенолпірувату на піруват. Ця ключова реакція здійснюється під дією ферменту піруваткінази (КФ 2.7.1.40), яка також супроводжується утворенням АТФ. Отриманий піруват вступає в наступні метаболічні перетворення. Дані перетворення схематично представлені на наданій схемі катаболізму гліцерину (рис 4.1.).

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Розроб.	Дука К.Г.						
Перевір.	Буценко Л.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Лім.	Арк.	Аркушів
						37	118



Рис. 4.1. Катаболізм гліцерину *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603.

Ферменти: 1 – гліцериндегідрогеназа (КФ 1.1.1.6); 2 – альдегіддегідрогеназа (NAD⁺) (КФ 1.2.1.3); 3 – гліцерат-2-кіназа (КФ 2.7.1.165); 4 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 5 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Джерелом вуглецю та енергії у поживному середовищі для культивування *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 – продуцента гаупсину є гліцерин [15].

Згідно з Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [16] катаболізм гліцерину у *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 відбувається шляхом катаболізму через фермент гліцериндегідрогенази (КФ 1.1.1.6) до пірувату.

Далі піруват перетворюється на оксалоацетат за допомогою фосфоенолпіруваткарбоксикінази (КФ 4.1.1.49), що вимагає АТФ. Після чого реакції відбуваються у зворотньому напрямку. Оксалоацетат перетворюється на фосфоенолпіруват за допомогою фосфоенолпіруваткарбоксикінази (КФ 4.1.1.49), що

утворює CO_2 . Це і є початком глюконеогенезу.

Далі фосфоенолпіруват перетворюється на 2-фосфогліцерат за допомогою енолази (КФ 4.2.1.11), після чого 2-фосфогліцерат перетворюється на 3-фосфогліцерат за допомогою фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12). 3-фосфогліцерат потім перетворюється на 1,3-бісфосфогліцерат за допомогою фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3). 1,3-бісфосфогліцерат перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат за допомогою фермента гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12). Гліцеральдегід-3-фосфат потім ізомеризується до дигідроксиацетонфосфату за допомогою тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1).

Нарешті, дигідроксиацетонфосфат та гліцеральдегід-3-фосфат конденсуються та з допомогою фермента фруктозо-1,6-бісфосфатаальдолаза (КФ 4.1.2.13) утворюється *D*-фруктоза 1,6-бісфосфат, який потім гідролізується до фруктозо-6-фосфату за допомогою фруктозо-1,6-бісфосфатази (КФ 3.1.3.11). Фруктозо-6-фосфат ізомеризується до глюкозо-6-фосфату за допомогою глюкозо-6-фосфат-ізомерази (КФ 5.3.1.9). Глюкозо-6-фосфат потім гідролізується до глюкози за допомогою гексокінази (КФ 2.7.1.1) (див. додаток 1,2).

Оскільки, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 прокаріот та грам-негативна бактерія, відповідно має тонку пептидогліканову шарову стінку, мембрана якої складається з фосфоліпідів.

Біосинтез жирних кислот у прокаріотів, згідно з Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, починається з ацетил-КоА і включає серію ферментативних реакцій, що призводять до утворення довголанцюгових жирних кислот. Спочатку ацетил-КоА карбоксилюється за допомогою ферменту ацетил-КоА карбоксилази (КФ 6.4.1.2 6.3.4.14 2.1.3.15) з утворенням малоніл-КоА. Далі малоніл-КоА конденсується з ацетил-КоА, утворюючи ацетоацетил-АЦП (ацетоацетил-ацил-носіїний білок), за допомогою ферменту 3-оксоацил-[ацил-переносний протеїн] синтаза III (КФ 2.3.1.180) (FabH). Потім ацетоацетил-АЦП редукується до β -гідроксибутират-АЦП за допомогою ферменту 3-оксоацил-[ацил-переносний білок] редуктаза (КФ 1.1.1.100) (FabG). Після

цього β -гидроксибутират-АЦП дегідратується до кронот-АЦП за допомогою 3-гидроксіацил-[білок-носій ацилу] дегідратаза (КФ 4.2.1.59 5.3.3.14) (FabA). Нарешті, кронот-АЦП редукується до бутирил-АЦП за допомогою ферменту еноіл-[білок-носій ацилу] редуктаза I (КФ 1.3.1.9 1.3.1.10) (FabI).

Після певних перетворень утворюється жирна кислота пальмітоїл-КоА, яка згодом реагує з гліцерин-3-фосфатом у присутності гліцерин-3-фосфатацилтрансферази (КФ 2.3.1.15 2.3.1.198) за утворення фосфатидилгліцеролу. Далі, фосфатидилгліцерол перетворюється в фосфатидилсерін за участю CDP-діацилгліцерин-серин-О-фосфатидилтрансферази (КФ 2.7.8.8). Фосфатидилсерін може бути конвертований в фосфатиділетаноламін за участю фосфатидилсериндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.65) або в фосфатиділхолін за участю певних ферментів (див. додаток 3).

У процесі синтезу ліпополісахариду клітинної стінки, одним з попередників є УДФ-галактоза, яка утворюється з глюкозо-6-фосфату. Це відбувається через декілька кроків: спочатку глюкозо-6-фосфат перетворюється на глюкозо-1-фосфат, а потім реагує з УТФ, утворюючи УДФ-глюкозу-фосфат. УДФ-глюкоза подальшим перетворенням стає УДФ-галактозою.

Другим попередником є гексозаміни, утворені з фруктозо-6-фосфату, який перетворюється на глюкозамін-6-фосфат за участю глютаміну.

УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін, попередники пептидоглікану, також синтезуються з глюкозамін-6-фосфату, проходячи через ряд реакцій, включаючи утворення глюкозамін-1-фосфату та N-ацетилглюкозамін-1-фосфату, та закінчуючи утворенням УДФ-N-ацетилмурамової кислоти [17].

Пептидоглікан будується з комплексу УДФ-N-ацетил-мурамової кислоти з пентапептидом, який утворюється додаванням активованих амінокислотних залишків до УДФ-N-ацетил-мурамової кислоти. Цей комплекс переноситься на ліпідний переносник, утворюючи ундекапренілдіфосфомурамову кислоту. Потім відбувається приєднання N-ацетилглюкозаміну, утворюючи комплекс дисахарид-пентапептид. Ці структурні одиниці інтегруються в пептидоглікан та перехресно зв'язуються, утворюючи клітинну

стінку (див. додаток 4)[17].

Біосинтез амінокислот глутамату, аспартату та аланіну відбувається через процеси трансамінування та амінування.

Глутамат синтезується з α -кетоглутарату, проміжного продукту циклу трикарбонових кислот (ТСА). Реакція каталізується ферментом глутаматдегідрогеназою (КФ 1.4.1.2). Аміак (NH_3) приєднується до α -кетоглутарату, утворюючи глутамат. Ця реакція потребує НАД(Р)Н як донора електронів.

Аспартат утворюється шляхом трансамінування оксалоацетату, іншого проміжного продукту ТСА циклу. Оксалоацетат реагує з глутаматом у присутності ферменту аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), який переносить аміногрупу з глутамату на оксалоацетат, утворюючи аспартат і α -кетоглутарат.

Аланін синтезується шляхом трансамінування пірувату. Піруват реагує з глутаматом за допомогою аланін-амінотрансферази (КФ 2.6.1.2), яка переносить аміногрупу з глутамату на піруват, утворюючи аланін і α -кетоглутарат (див. додаток 5,6).

Пуринові нуклеотиди синтезуються через *de novo* шлях, починаючи з рибозо-5-фосфату, що утворюється в пентозофосфатному шляху. Рибозо-5-фосфат перетворюється на фосфорибозилпірофосфат (PRPP) за допомогою ферменту PRPP-синтетази (КФ 2.7.6.1) з використанням АТФ. PRPP потім взаємодіє з глутаміном, утворюючи 5-фосфорибозиламін за допомогою ферменту амідофосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.14). Після цього серія реакцій з участю гліцину, формілтетрагідрофолату, глутаміну, АТФ та інших кофакторів приводить до утворення інозинмонофосфату (ІМФ), попередника для аденозинмонофосфату (АМФ) та гуанозинмонофосфату (ГМФ). ІМФ перетворюється на АМФ та ГМФ і після декількох додаткових реакцій приводить до АТФ і ГТФ (див. додаток 8).

Піримідинові нуклеотиди синтезуються через інший шлях, починаючи з карбамоїл-фосфату, який утворюється з глутаміну та вуглекислого газу за допомогою ферменту карбамоїл-фосфатсинтази (КФ 6.3.5.5). Карбамоїл-фосфат конденсується з

аспартатом, утворюючи карбамоїл-аспартат за допомогою аспартат-карбамоїлтрансферази (КФ 2.1.3.2). Після цього карбамоїл-аспартат циклізується до дигідрооротату за допомогою дигідрооротази (КФ 3.5.2.3). Дигідрооротат окиснюється до оротату за допомогою дигідрооротатдегідрогенази (КФ 1.3.98.1), а оротат конденсується з PRPP, утворюючи оротидинмонофосфат (ОМФ) за допомогою оротатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10). ОМФ декарбоксилюється до уридинмонофосфату (УМФ) за допомогою оротидинмонофосфатдекарбоксилази (КФ 4.1.1.23). УМФ потім фосфорилується до уридиндифосфату (УДФ) і уридинтрифосфату (УТФ). УТФ амінований до цитидинтрифосфату (ЦТФ) за допомогою ЦТФ-синтетази (КФ 6.3.4.2) (див. додаток 7). Ферменти взяті із KEGG [16]. Схема біотрансформації ростового субстрату на кінцевий продукт представлена на рис. 4.2.

Шлях біосинтезу гаупсину у *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603

1) Основні позначення:

2) Ферменти:

1 – альдегіддегідрогеназа (NAD⁺) (КФ 1.2.1.3); 2. Триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 3. Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 4. Фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 5. Фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 6. Енолаза (КФ 4.2.1.11); 7. Піруваткіназа (КФ 2.7.1.40); 8. Фосфоенолпіруваткарбоксикиназа (КФ 4.1.1.49); 9. Фруктозо-1,6-бісфосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 10. Фруктозо-1,6-бісфосфатаза (КФ 3.1.3.11); 11. Глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 12. Гексокиназа (КФ 2.7.1.1); 13. ацетил-КоА карбоксилаза (КФ 6.4.1.2 6.3.4.14 2.1.3.15); 14. 3-оксоацил-[ацил-переносний протеїн] синтаза III (КФ 2.3.1.180); 15. 3-оксоацил-[ацил-переносний білок] редуктаза (КФ 1.1.1.100); 16. 3-гідроксацил-[білок-носії ацилу] дегідратаза (КФ 4.2.1.59, 5.3.3.14); 17. Еноіл-[білок-носії ацилу] редуктаза I (КФ 1.3.1.9, 1.3.1.10); 18. Гліцерин-3-фосфатацилтрансфераза (КФ 2.3.1.15, 2.3.1.198); 19. CDP-діацилгліцерин-серин-О-фосфатидилтрансфераза (КФ 2.7.8.8); 20. Фосфатидилсериндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.65); 21. глутаматдегідрогеназа (КФ 1.4.1.3); 22. аспаратамінотрансфераза (КФ 2.6.1.1); 23. аланін-трансаминаза (КФ 2.6.1.2); 24. PRPP-синтаза (КФ 2.7.6.1); 25. амідфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.14); 26. карбамоіл-фосфатсинтази (КФ 6.3.5.5); 27. аспарат-карбамоілтрансферази (КФ 2.1.3.2); 28. дигідрооротази (КФ 3.5.2.3); 29. дигідрооротатдегідрогенази (КФ 1.3.98.1); 30. оротатфосфорибозилтрансферази (КФ 2.4.2.10); 31. оротидинмонофосфатдекарбоксилази (КФ 4.1.1.23); 32. ЦТФ-синтаза (КФ 6.3.4.2); 33. глутамінсинтаза (КФ 6.3.1.2); 34. аланін рацемаза (КФ 5.1.1.1)

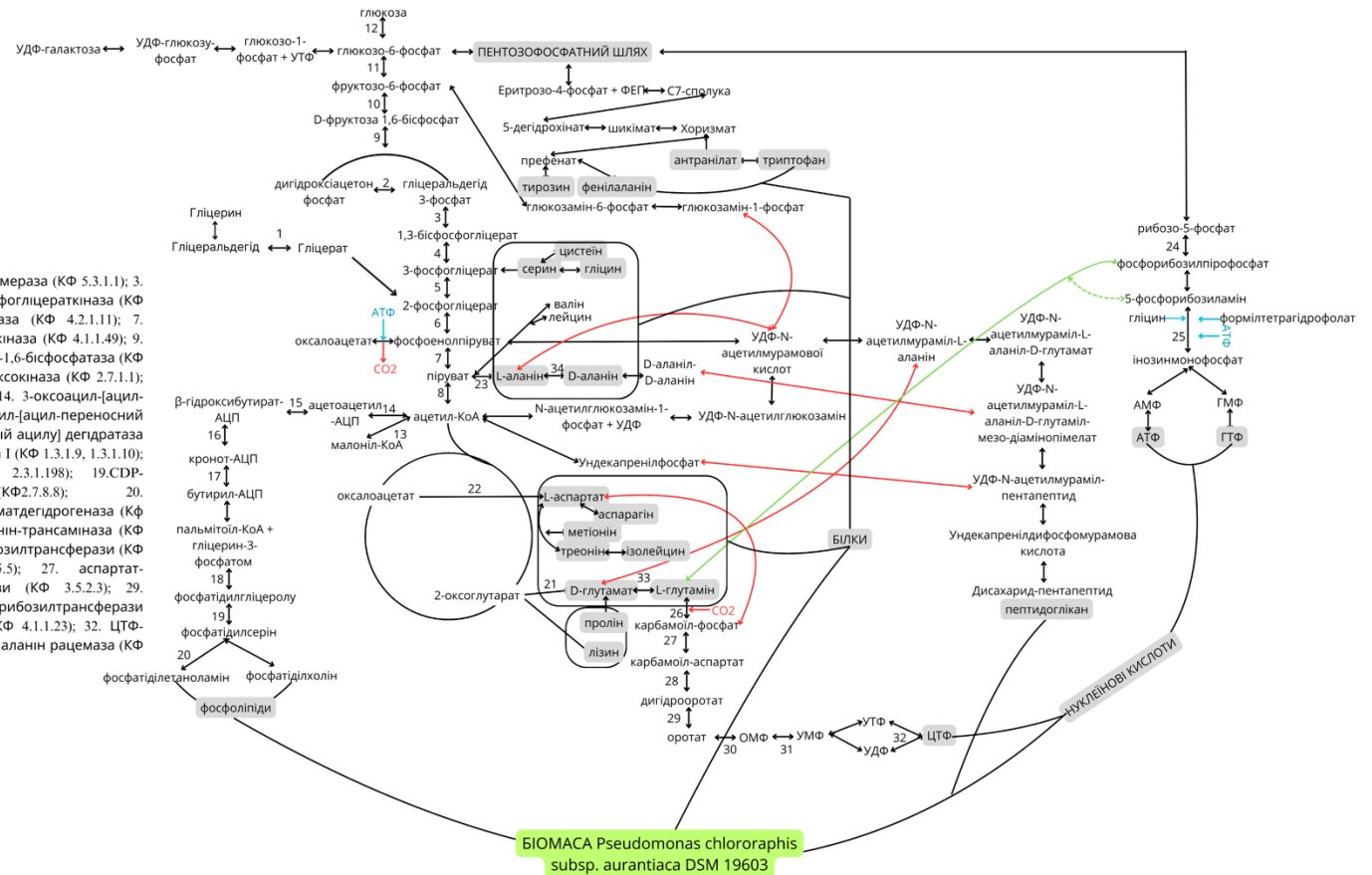


Рис. 4.2. Біотрансформація ростового субстрату гліцерину у біомасу *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

P. chlororaphis subsp. aurantiaca є грамнегативною бактерією з розмірами 0,7-0,8 x 1,5-3,6 мкм та рухається за допомогою полярних багатотрихоznих джгутиків [19]. Ця бактерія культивується аеробно при температурі 25-37 °С та оптимальному значенні рН 6,8, що є нейтральним середовищем [20]. Оскільки, такі умови сприяють росту мезофільних і нейтрофільних мікроорганізмів, існує ризик контамінації. Для уникнення контамінації необхідно забезпечити асептичні умови, що неможливо досягти при поверхневому культивуванні, треба простерилізувати обладнання, поживне середовище та аераційне повітря.

Для збільшення кількості культури, культивування для біосинтезу феназинових сполук зазвичай проводять глибинним способом. Оскільки, перевагами глибинного способу порівнянно з поверхневим способом будуть:

1. Більш висока продуктивність. В глибинному культивуванні мікроорганізми мають вільний доступ до поживних речовин і кисню, що сприяє їх росту та розмноженню. Це призводить до більш високої концентрації біомаси та продукції цільових продуктів порівняно з твердофазним культивуванням, де мікроорганізми обмежені доступом до поживних речовин.

2. Має кращий контроль процесу стосовно таких параметрів, як температура, рН, концентрація поживних речовин і кисню.

3. Автоматизація

Під час виробничого культивування у ферментері повинні бути створені помірні температури та нейтральне середовище, адже *P. chlororaphis subsp.*

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркуші	
Розроб.		Дука К.Г.							
Перевір.		Буценко Л.М.					44	118	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

aurantiaca DSM 19603 є мезофілом.

Для забезпечення таких умов достатньо проводити культивування додаючи концентрацію розчиненого кисню 30% та дробно вносячи гліцерин, починаючи з 22 год культивування «табл. 2.1».

Перевагою напівбезперервного культивування є – періодичне додавання свіжого поживного середовища, що робить його компромісом між періодичним і безперервним культивуванням. Біосинтез феназинових сполук у цьому випадку відбувається у періодичному процесі, оскільки максимальний синтез антибіотика відбувається у стаціонарній фазі росту продуцента [21].

5.1.1. Вибір типу ферментера

Оскільки *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 є облигатним аеробом, тобто потрібно забезпечити подачу аераційного повітря для культивування, а це можливо за допомогою барботеру, який встановлений у нижній частині ферментеру. Цей процес полягає у подачі дрібних бульбашок газу під шар рідини, піднімаючись вгору, захоплюють з собою частки рідини, що призводить до її інтенсивного перемішування, таким чином оснащують аерацією середовище. Для забезпечення контролю за рН середовища, ферментатор повинен бути оснащений відповідним датчиком, що відображає значення рН. Для забезпечення сприятливих умов культивування, а саме оптимальної температури 30°C, що відповідає потребам мезофільного мікроорганізму, використовується теплова сорочка.

Для забезпечення розчинення кисню в усьому об'ємі середовища та для інтенсифікації масообміну у ферментері, де потрібна швидкість обертання 300 об/хв, рекомендується використовувати лопатеву мішалку. Лопатеві мішалки з 6 лопатями є оптимальним варіантом для забезпечення рівномірного перемішування та найпростіший і найдешевший тип мішалок, який добре підходить для культивування *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603, адже цей процес не потребує інтенсивного масообміну.

5.2 Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря

Біологічний агент *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 є строгим аеробом, тому для стадії виробництва посівного матеріалу та виробничого культивування підготовка стерильного аераційного повітря є необхідністю, [4] рівень розчиненого кисню має становити 30% від кількості кисню, що подається в апарат за певний проміжок часу. Цей показник може бути досягнутий інтенсивними масообмінними процесами, такими як перемішування та підвищена інтенсивність подачі аераційного повітря. Згідно джерел [15] цей рівень розчиненого кисню досягався при швидкості оборотів перемішуючого пристрою на рівні 300-800 об/хв. Оскільки ферментер має бути з вбудованим електродом, що вимірює кількість розчиненого кисню (DO), то підтримування 30% розчиненого кисню, буде реалізовано шляхом постійної варіації налаштувань швидкості подачі стерильного повітря через барботер та швидкостей обертів мішалки. Також стерильне аераційне повітря необхідне для створення надлишкового тиску в апаратах та воно може бути використано для асептичної перекачки посівного матеріалу чи композицій поживного середовища між апаратами.

Підтримування асептичних умов в лабораторіях для підготовки посівного матеріалу в колбах відбувається завдяки фільтрам HEPA, що вбудовані в вентиляційну систему, а також бактерицидним лампами, які встановлені у асептичних мікробіологічних боксах в яких має відбуватися будь-яка взаємодія з культурою на цьому етапі.

Етапи підготовки аераційного повітря для створення посівного матеріалу в апаратах та виробничого культивування

- 1) Забір повітря з атмосфери виконується через вертикальну трубу з повітрязабірником, розташованим на висоті 2-3 м над найвищою точкою будівлі, де знаходиться обладнання для його стиснення та очищення.
- 2) Видалення частинок пилу з розмірами понад 50 мкм проводиться за допомогою плоских тканинних фільтрів грубого очищення.

- 3) Стиснення здійснюється компресорами або турбоповітрядувками, що призводить до підвищення температури повітря до 120–200 °С.
- 4) Охолодження стисненого повітря виконується до температури точки роси, за якої відбувається конденсація вологи. Для цього використовують водяні теплообмінники різних типів, зокрема кожухотрубні або «труба в трубі».
- 5) Конденсат вологи та залишки мастил із компресорів видаляються в ресивері, який також служить для зменшення пульсацій повітряного потоку, що може погіршувати ефективність наступного очищення.
- 6) Для стабілізації показників (тиску і температури) здійснюється підігрівання до 45–50 °С за допомогою пари у відповідних теплообмінниках.
- 7) Подальше очищення повітря виконується в головних емнісних фільтрах із набивкою, які забезпечують ступінь очищення 95%. Такі фільтри зазвичай розташовують неподалік ферментаційних цехів.
- 8) Завершальне очищення відбувається в індивідуальних фільтрах, розташованих безпосередньо на ферментері, де досягається ступінь очищення 99,99%.

Оскільки фільтрація повітря відбувається завдяки волокнистим та пористим матеріалам, вони потребують стерилізації за температури 130 °С з певним часом витримки [18].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

5.3.1. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Оскільки біотехнологічне виробництво впершу чергу передбачає роботу із різноманітними штамами мікроорганізмами, то санітарна підготовка на початку і в кінці кожного виробничого циклу є критичним етапом, від якого залежить прогнозованість процесу і якість кінцевого продукту. Зважаючи на ризики мікробіологічної та перехресної контамінації, персонал має неухильно забезпечувати встановлений санітарно-гігієнічний рівень виробництва аби виключити / максимально мінімізувати всі загрози, що несуть загрозу якості фінішного продукту. З цією метою під час санітарної підготовки використовуються мийні і дезінфікуючі засоби. *Мийний засіб* - це органічні або неорганічні речовини або їх комбінація, що

представляють собою мила та/або поверхнево-активні речовини, призначені для очищення і прання. *Дезінфекція* – це заходи, метою яких є знищення або руйнування потенційно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, спор та їх токсинів. Процедури мийки і дезінфекції проходять одна за одною і є комплексним заходом підтримання санітарно-гігієнічного режиму на виробництві. Для мінімізації ризиків забруднення сторонньою мікрофлорою та виникнення перехресної контамінації, персонал має проходити регулярні навчання та у рутині дотримуватися процедур по очищенню і дезінфекції.

Оскільки під час виробництва різні за природою матеріалів поверхні контактують із сировиною, після закінчення виробничого процесу залишаються залишки субстанцій, які важко видалити і з часом вони стають джерелами забруднення і основою для розвитку різноманітної мікрофлори. Зважаючи на це мийні і дезінфікуючі засоби, що будуть використовувати мають володіти наступними властивостями:

- нетоксичність для людини;
- толерантність до поверхонь, що підлягають обробці;
- ефективність проти широкого діапазону різноманітних мікроорганізмів;
- безпечність для цільового продукту, відсутність впливу органолептичні показники;
- швидка розчинності у воді під час приготування робочих розчинів.

Кілька миючих і дезінфікуючих засобів, що можна використати під час виробництва гаупсину наведено нижче:

Миючий засіб САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ– рідкий концентрат на основі аніонних, амфотерних і неіоногенні ПАР, призначений для миття і видалення забруднень з усіх видів поверхонь. Склад: аніонні ПАР, амфотерні ПАР, консервант, ароматизатор, неіоногенні ПАР, комплексонат, вода. Концентрат безбарвного до коричневого кольору. Ефективно видаляє з поверхонь і не фіксує на них різноманітні органічні (у т.ч. біологічні рідини), неорганічні та комбіновані забруднення. Здатність поверхнево-активних речовин до первинного біологічного розкладання. Засіб

використовують у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,1% до 10,0%. Для розрахунку приймемо середнє значення у 5,0% [22].

Миючий засіб LIV Актив 113 – лужний мийний засіб, однорідна однофазна слабо-жовта рідина. Склад: ПАР, комплексоутворювач, вода очищена, гідроксид калію, гідроксид натрію. Призначений для мийки (CIP-мийка) обладнання методом циркуляції, рециркуляції, розпилення (трубопроводи, фільтри, резервуари, пастирезатори, сепаратори, розливні машини, змішувачі, випарювачі, стерилізатори, підігрівачі, варочні та вакуум-варочні апарати, бродильні та лагерні танки). Зфективний при видаленні органічних забруднень – масел, плям, жирів, білків, дріжджів, молочного каменю, пригорівших цукру та патоки, пігментних і різноманітних нашарувань. Концентрація робочого розчину 1-3 % [23].

Дезінфікуючий засіб Desin – рідкий засіб. Склад: C10-спирт, алкоксилат, алкіламід-пропілбетаїн, дидецилдиметиламоній хлорид, полімер суміш C12-14-жироспиртовий етоксилат, тетранатрію сіль, етілендіамінтетраоцтова кислота. Має широкий спектр застосування. Комплексоутворюючі і диспергуючі складові видаляють неорганічні відкладення і запобігають їх подальшому утворенню. Комбінація солей амонію забезпечує надійну дезінфекцію навіть при низькій концентрації препарату. Ефективно знищує Gram-позитивні (пр.: *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*), і Gram-негативні (пр.: *Eschereschia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*) бактерії, має віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію. Запобігає появі цвілі та видаляє вже існуючі її відкладення. Бактерицидна, фунгіцидна, MRSA дія досягається при концентрації препарату в розчині 1-3%. Засіб використовується на підприємствах харчової і біотехнологічної промисловості [24].

Засіб дезінфекційний «Максисан». Розчин прозорий, легко змиваються, не залишають патьоків і нальоту, не фіксують органічні забруднення на оброблюваних об'єктах. Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук і допоміжних компонентів. Розчин ефективний при високому білковому навантаженні . Відсутня корозійна дія на метали (в т. ч. алюмінію), скло, полімерні матеріали, гуму, деревину, на лакофарбове і гальванічне покриття.

Максисан має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, , *P.*

aeruginosa, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* i *S. aureus* Methicillin Resistant, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecium* Vancomycin Resistant *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, герпесу, грипу, СНІДу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії. Використовують засіб у вигляді робочих розчинів в концентрації 0,04% - 0,25%. Рекомендована витрата робочого розчину – 100 мл/м² (протирання, зрошення) [25].

Отже, успішне функціонування біотехнологічного виробництва залежить в першу чергу від належним чином організованого процесу санітарної обробки, правильного вибору мийних і дезінфікуючих засобів, а також суворого дотримання персоналом усіх належних процедур. Порівняння характеристик вищенаведених засобів наведено у таблиці 5.1 нижче.

Таблиця 5.1

Порівняння різних мийних та дезінфікуючих засобів за складом, характеристиками, способом застосування та вартістю

Назва засобу	Склад	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість	Джерело
<i>Засоби для обробки внутрішньої поверхні обладнання</i>								
САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ (виробник: ІНТЕРДЕЗ (Україна))	аніонні ПАР, амфотерні ПАР, консервант, ароматизатор, неіоногенні ПАР, комплексонат, вода	Бактерії, віруси, гриби	рідкий концентрат на основі аніонних, амфотерних і неіоногенні ПАР, призначений для миття і видалення забруднень з усіх видів поверхонь Концентрат безбарвного до коричневого кольору. Ефективно видаляє з поверхонь і не фіксує на них різноманітні органічні (у т.ч. біологічні рідини), неорганічні та комбіновані забруднення	Відсутня корозійна дія на метали (в т. ч. алюмінію), скло, полімерні матеріали, гуму, деревину, на лакофарбове і гальванічне покриття міцність.	Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 0,1-10,0%.	Не потребує Реєстрації**	50,4 грн за 1 л	[22]
LIV Актив 113 (виробник: КВАНТ)	Р, комплексоутворювач, вода очищена, гідроксид калію, гідроксид натрію	Бактерії, віруси, гриби	лужний мийний засіб, однорідна однофазна слабо-жовта рідина. Зфактивний при видаленні органічних забруднень – масел, плям, жирів, білків, дріжджів, молочного каменю, пригорівших цукру та патоки, пігментних і		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 1,0-3,0%.	Не потребує Реєстрації (Додаток Б)	97,6 грн за 1 л	[23]

			різноманітних нашарувань					
Desin (виробник: HungaroChemicals Kft)	C10-спирт, алкоксилат, алкіламід- пропілбетаїн, дидецилдиметил амоній хлорид, полімер суміш C12-14- жироспиртовий етоксилат, тетранатрію сіль, етілендіамінтетр аоцтова кислота	Ефективно знищує Gram- позитивні (пр.: <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>), і Gram-негативні (пр.: <i>Eschereschia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i>) бактерії, має віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію. Запобігає появі цвілі та видаляє вже існуючі її відкладення.	Має широкий спектр застосування. Комплексоутворюючі і диспергуючі складові видаляють неорганічні відкладення і запобігають їх подальшому утворенню. Комбінація солей амонію забезпечує надійну дезінфекцію навіть при низькій концентрації препарату		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 1,0- 3,0%.	№ 602-123-20-5/1960	312,6 грн за 1 л	[24]
Максисан (виробник: Інтердез)	Комплекс чотирьох четвертинних амонієвих сполук і допоміжних компонентів .	має бактерицидну (включаючи мікобактерії туберкульозу, , <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> і <i>S.</i> <i>aureus</i> Methicillin Resistant, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia</i> <i>coli</i> , <i>Escherichia coli</i> 0157: H7, <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> <i>Vancomycin Resistant Salmonella</i> <i>enteritidis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>), віруліцидну (в т.ч. вірусів гепатитів, герпесу, грипу, СНІДу, рота-, коронавірус, збудників «пташиного грипу»), фунгіцидну (патогенні гриби і цвіль) і спороцидну дії	Розчин прозорий, легко змиваються, не залишають патьоків і нальоту, не фіксують органічні забруднення на оброблюваних об'єктах.. Розчин ефективний при високому білковому навантаженні		Застосовується у вигляді робочих розчинів концентрацією 0,04- 0,25%.	Наказ № 602-123- 20-5/3349	1350,0 грн за 1 л	[25]

*** - Безпосередньо на сайті ІНТЕРДЕЗ окремого PDF-файла у відкритому доступі немає — компанія видає його на запит (тел.+38 (044) 206-01-50./E-mail: info@interdez.com.ua). Це відповідає пункту 5 Регламенту: «Технічний опис зберігається виробником і надається компетентному органу на вимогу». **Регламент не зобов'язує виробника публікувати документ у вільному доступі** – лише зберігати і надавати за запитом (§ 5, Постанова КМУ № 717)(Додаток Б).

5.3.2. Розрахунок витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва гаупсину

Виробництво гаупсину триває 30 днів і передбачає підготовку інокуляторів об'ємом 7 л, 63 л, 630 л і ферментеру 5000 л, реакторів-змішувачів для приготування і стерилізації композицій, установку для перемішування колб, лабораторного боксу та обладнання для виділення (центрифуги і збірника культуральної рідини).

Біотехнологічне виробництво гаупсину складається із лабораторії контролю якості (зберігання робочих культур, бокси для пересівів культур, контроль якості), приміщення із автоматичною машиною для вирощування у колбах-качалках, приміщення для вирощування інокуляту і промислового біосинтезу і приміщення виділення гаупсину. Обладнання розмістимо на відстані 1,5 м одне від одного та від стін, щоб спростити персоналу обслуговування і очистку обладнання та приміщень. Габарити обладнання представлено у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Перелік обладнання, що використовується під час виробництва

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Інокулятор	16	-	-
Інокулятор	160	-	-
Ферментер	1250	-	-
Реактор змішувач	20	0,4	1,18
Реактор змішувач	20	0,4	1,18
Реактор змішувач	200	-	-
Реактор змішувач	50	-	-
Центрифуга	1250	-	-
Збірник культуральної рідини	1250	-	-
Всього	4216	-	-

Сумарний об'єм виробничого обладнання складає 4 216 л.

Наступний етап – розрахунок об'ємів мийних та дезінфікуючих засобів, на основі розмірів виробничих приміщень. План приміщення і розміщення обладнання під час виробництва культуральної рідини *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 представлено на рис. 5.1.

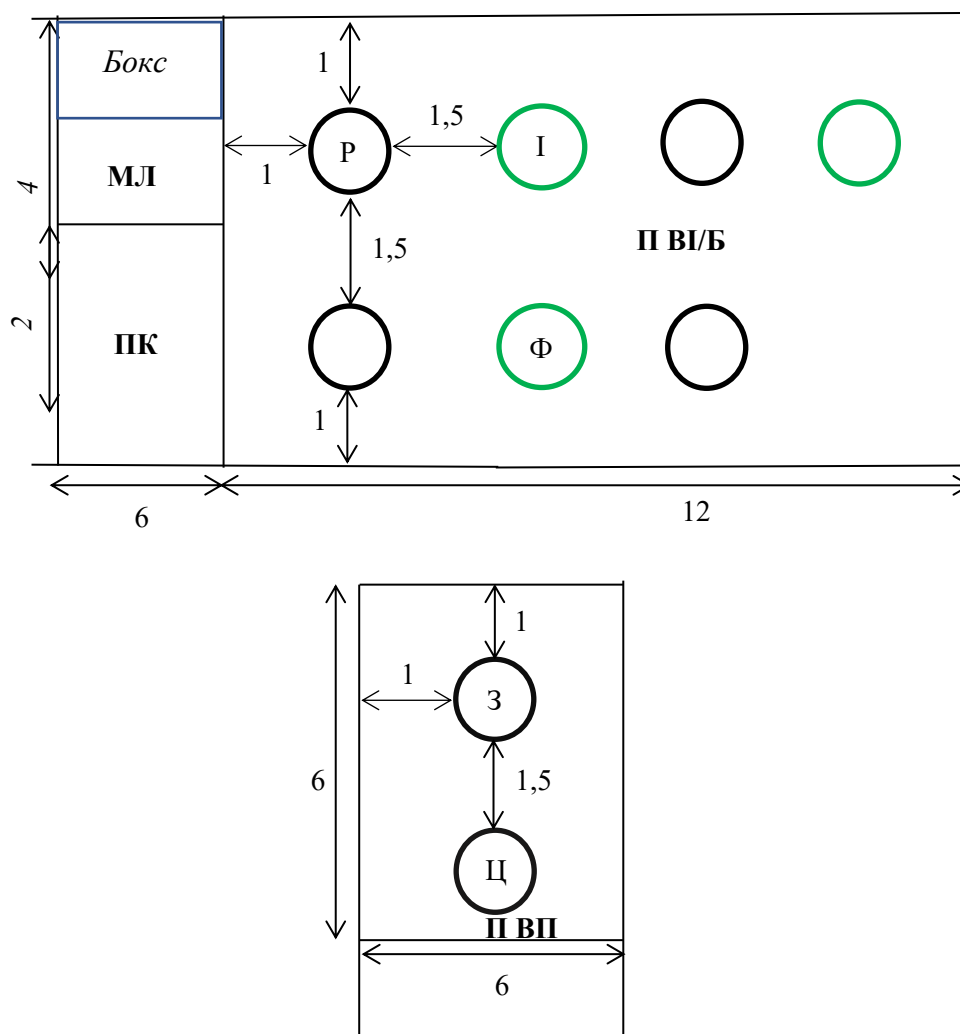


Рис. 5.1. Умовне схематичне зображення виробничих приміщень

П ВІ/Б – приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу;

ПК – приміщення з качалками;

МЛ – мікробіологічна лабораторія;

П ВП – приміщення виділення продукту

І, Р, Ф, Ц, З – інокулятор, реактор-змішувач, ферментер, центрифуга, збірник

Для підтримання чистоти приміщень, підлога буде митися щоденно – 30 разів.

Генеральне прибирання потрібно зазвичай 2 рази на місяць – в нашому випадку це 2 рази. Кількості миючих засобів для обробки стін та підлоги визначаємо так. Згідно із *рис. 5.1*, враховуючи висоту приміщень 5 м, площа підлоги приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу складає 72 м^2 ($12 \text{ м} \times 6 \text{ м}$), площа стін – $((12 \text{ м} \times 5 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 5 \text{ м})) \times 2 = 180 \text{ м}^2$, загальна площа – $72 \text{ м}^2 + 180 \text{ м}^2 = 252 \text{ м}^2$. Для

мікробіологічної лабораторії площа підлоги складає $6 \text{ м} \times 4 \text{ м} = 24 \text{ м}^2$, площа стін – $((4 \text{ м} \times 5 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 5 \text{ м})) \times 2 = 100 \text{ м}^2$, загальна площа – 124 м^2 . Для приміщення установки із качалками площа підлоги складає $2 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 12 \text{ м}^2$, площа стін – $((2 \text{ м} \times 5 \text{ м}) \times 2 + (3 \text{ м} \times 5 \text{ м})) \times 2 = 40 \text{ м}^2$, загальна площа – 52 м^2 . Для приміщення для виділення гаупсину площа підлоги складає $6 \text{ м} \times 6 \text{ м} = 36 \text{ м}^2$, площа стін – $((6 \text{ м} \times 5 \text{ м}) \times 2 + (6 \text{ м} \times 5 \text{ м})) \times 2 = 120 \text{ м}^2$, загальна площа – 156 м^2 .

Загальна площа поверхні обробки миючими засобами наведена в *табл. 5.3*.

Таблиця 5.3

Узагальнення даних площ стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м^2	Площа стін, м^2	Загальна площа, м^2
Приміщення вирощування інокуляту і виробничого біосинтезу	72	180	252
Мікробіологічна лабораторія	24	100	124
Приміщення з качалками	12	40	52
Приміщення виділення гаупсину	36	120	156
Разом	144	440	584

Періодичність миття обладнання розрахуємо нижче. Загальний об'єм культуральної рідини становить $8584,0 \text{ л}$, а об'єм культуральної рідини за 1 цикл дорівнює $750,0 \text{ л/цикл}$, то кількість виробничих циклів (циклів миття) становить: $8584 \text{ л} / 750 \text{ л/цикл} = 12 \text{ циклів}$. Варто врахувати додаткове миття після останнього циклу і загальна кількість буде становити 13. Тоді загальний об'єм миття:

$$4,21 \times 13 = 54,73 \text{ м}^3$$

Таблиця 5.4

Розрахунок площ миття / дезінфекції під час виробничого процесу

Об'єкт	Площа / об'єм об'єкту, $\text{м}^2 / \text{м}^3$	Періодичність миття / дезінфекції під час виробничого процесу	Загальна площа / об'єм, $\text{м}^2 / \text{м}^3$
Обладнання	$4,216 \text{ м}^3$	13	$54,73 \text{ м}^3$
Підлога	144 м^2	30	4320 м^2
Стіни, двері, вікна	440 м^2	2	880 м^2

Оскільки згідно вказівками інструкції із експлуатації, витрата робочих розчинів

на площу в 1 м^2 становить 100 мл, то можна розрахувати об'єми робочих розчинів. Згідно із розрахунками із *табл. 5.4*, загальний об'єм миття для обладнання складає $54,73 \text{ м}^3$. Зазвичай, щоб зменшити витрату води та мийного засобу і підвищити ефективність мийки, миючі засоби подають разом із водою через СІР-мийки, що в свою чергу економить до 50 % миючих і промивної води. Таким чином, для одного циклу миття буде необхідно: $4216 \text{ л} \times 0,5 = 2108 \text{ л}$ робочого розчину миючого засобу, а на весь час виробництва: $2108 \times 13 = 27\,404 \text{ л}$. Виходячи із результатів представлених у *табл. 5.4* загальна площа всіх поверхонь складає $4320 \text{ м}^2 + 880 \text{ м}^2 = 5\,200 \text{ м}^2$. Загальна витрата розчинів буде становити: $5200 \text{ м}^2 \times 100 \text{ мл} = 520,0 \text{ л}$.

Інформація стосовно вартості мийних і дезінфікуючих засобів, а також витрат під час миття і дезінфекції представлено нижче у *табл. 5.5*.

Витрати і вартість мийних / дезінфікуючих засобів під час виробництва гаупсину

Назва	Концентрація робочого розчину, %	Об'єкт миття / дезінфекції	Площа /об'єм миття / дезінфе кції об'єкту, м ³ /м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробниц тва, л	Вартість 1 л/кг мийног о/ дезінфі куючого засобу, грн	Вартість 1 л робочо го розчи ну, грн	Сумарна вартість миття /дезінфек ції під час виробниц тва, грн
САНПРО Ф- УНІВЕРС АЛ ¹	5,0 %	• Приміщення (усі типи твердих поверхонь, підлога, стіни) • Обладнання (передстерилізаційне очищення)	4216	2108	50,4	2,52	5312,2
LIV Актив 113 ₂	2,0 %	• Обладнання закритих систем (CIP-мийки, трубопроводи, резервуари)	4216	2108	97,6	1,95	4110,6
Desin ³	2,0 %	• Приміщення та виробничі поверхні • Технологічне обладнання — лінії розливу й фасування	5200	520	312,6	6,25	3250
Максисан ₄	0,25 %	• Приміщення (прибирання) • Обладнання та інструменти (передстерилізаційне очищення) • Шкіра рук персоналу — антисептична обробка та миття рук/тіла	5200	520	1350,0	3,37	1752,4

Примітка. Вартість засобів наведено станом на квітень 2025 р. 1- <https://prom.ua/ua/p2111652985-universalnoe-moyuschee-sredstvo.html> 2- <https://om24.com.ua/ru/product-mojuschee-sredstvo-liv-aktiv-113-silnoschelochnoe-ponizhennoe-penoobrazovanie-10l-000020230> 3- <https://klineko.com.ua/nejtralnye-sredstva/desin/> 4 - <https://interdez.com.ua/product/maksisan-unvcpd>

* розрахунок вартості 1 л робочого розчину описано для мийного засобу «САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ»: Ціна 1 л становить 50,4 грн, концентрація його робочого розчину – 5,0 %, тому в 1000 мл робочого розчину міститься 50,0 мл (0,05 л) концентрату. Таким чином вартість 5,0 % розчину становить: $50,4 \text{ грн} \times 0,05 \text{ л} = 2,52 \text{ грн/л}$.

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Поживне середовище для культивування *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603 згідно джерел [15] представляє собою суміш гліцерину та широкого спектру різних неорганічних солей. Склад поживного середовища представлений в таблиці 5.6.

Таблиця 5.6

Склад поживного середовища для культивування *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603

Компонент середовища	г/л
Гліцерин	40
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.3
K ₂ HPO ₄	5,8
KH ₂ PO ₄	3,7
Розчин MgSO ₄ 100 мМ	10 (мл)
Розчин мікроелементів у 1н соляній кислоті	1 (мл)
(FeSO ₄ ×7H ₂ O	2.78
MnCl ₂ ×4H ₂ O	1.98
CoSO ₄ ×7H ₂ O	2.81
CaCl ₂ ×2H ₂ O	1.67
CuCl ₂ ×2H ₂ O	0.17
ZnSO ₄ ×7H ₂ O)	0.29

Проаналізувавши склад поживного середовища мною було прийнято рішення про розділення його на наступні композиції:

Композиція А: Гліцерин не потребує стерилізації, його вносять безпосередньо в інокулятор або ферментер насосом через гребінку у потрібній кількості.

Композиція Б: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 - (режим стерилізації: 131°C , 40 хв, 0,15 МПа),

Композиція В: розчин мікроелементів 1 мл ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) не потребує стерилізації через те, що готується в 1 н розчині HCl .

Композиція Г: 100 мМ розчин MgSO_4 стерилізується при 131°C , 40 хв, 0,15 МПа

5.4.1. Підготовка та стерилізація розчинів мікроелементів для підготовки посівного матеріалу та виробничого культивування

Згідно статті, компоненти $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ додаються в поживне середовище у вигляді 1 мл розчину мікроелементів, солі розчиняються в 1 н розчині соляної кислоти (HCl), тож розраховуємо скільки всього літрів розчину мікроелементів необхідно для всіх стадій процесу культивування:

- Для стадії приготування в колбах на качалках необхідно взяти: 1 мл розчину мікроелементів.
- Для стадії приготування в інокуляторі 16 л необхідно взяти: 9.08 мл розчину мікроелементів.
- Для стадії приготування в інокуляторі 160 л необхідно взяти: 82 мл розчину мікроелементів.
- Для стадії приготування в виробничому ферментері 1250 л необхідно взяти: 742 мл розчину мікроелементів.

Сумуючи всі стадії ($742+82+9.08+1 = 834.08$) отримуємо 834 мл розчину мікроелементів, який буде готуватися в об'ємі 1 літра для спрощення його створення.

Для приготування 1 л розчину мікроелементів, на лабораторних вагах необхідно відважити наступні наважки 2.78 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1.98 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 2.81 г $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1.67 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.17 г $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.29 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, та попередньо створити 1.1 літр 1 н розчину соляної кислоти, шляхом змішування 101 мл 36% розчину HCl з 900 мл дистильованої води в колбі об'ємом 2 літри. Наважки додають у 1 н розчин соляної кислоти та ставлять на зберігання.

Для всього циклу культивування необхідно створити 8340 мл 100 мМ розчину MgSO_4

- Для стадії приготування в колбах на качалках необхідно взяти: 10 мл розчину MgSO_4 .
- Для стадії приготування в інокуляторі 16 л необхідно взяти: 90.8 мл розчину MgSO_4 .
- Для стадії приготування в інокуляторі 160 л необхідно взяти: 820 мл розчину MgSO_4 .
- Для стадії приготування в виробничому ферментері 1250 л необхідно взяти: 7420 мл розчину MgSO_4 .

Як відомо молекулярна маса MgSO_4 складає 120.4 г/М, тобто 100 мМ розчин містить 12.4 г/л MgSO_4 , для зручності створення розчину пропонується на етапі підготовки посівного матеріалу створити 1 л розчину, шляхом додавання 12.4 г MgSO_4 в 990 мл дистильованої води та стерилізувати в колбі об'ємом 2 літри при 131°C , 40 хв, 0,15 МПа. А розчин для виробничого культивування створювати в об'ємі 7.42 л в окремому реакторі-змішувачі стерилізаторі об'ємом 20 літрів з нижнім зливом для можливості його дозованої подачі через рідинні дозатори прямо в біореактор. Для створення 7.5 літрів 100 мМ розчину MgSO_4 необхідно розчинити наважку 93 г MgSO_4 в 7400 мл дистильованої води та стерилізувати в реакторі при 131°C , 40 хв, 0,15

МПа.

5.4.2. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в колбах на качалках.

Композиція А

Для приготування 1 літра поживного середовища необхідно взяти 40 г. Оскільки густина гліцерину дорівнює 1.26 г/мл, то 40 г гліцерину мають орієнтовний об'єм 31.75 мл. На технічних вагах за допомогою мірного стакану зважують 40 г гліцерину та вносять в загальну колбу з іншими простерилізованими композиціями.

Композиція Б

На технічних лабораторних терезах зважують наважки 3.3 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5.8 г K_2HPO_4 та 3.7г KH_2PO_4 після чого наливають в колбу об'ємом 2000 мл 950 мл дистильованої води та засипають наважки очікуючи повне їх розчинення, та ставлять в автоклав на наступний режим стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа

Таблиця 5.7

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Концентрація, г(мл)/л	Вміст компонента в 1 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Гліцерин	40	40	А	0.032
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.3	3.3	Б	0.77
K ₂ HPO ₄	5.8	5.8		
KH ₂ PO ₄	3.7	3.7		
Вода	950			
Розчин мікроелементів	1(мл)	1	0.001	
Розчин MgSO ₄	10(мл)	10	0.01	
Разом	1000 мл			

5.4.3. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 16 л

Композиція А

Для приготування 9.08 л поживного середовища необхідно взяти 363 г гліцерину. Оскільки густина гліцерину дорівнює 1.26 г/мл, то 363 г гліцерину мають орієнтовний об'єм 288 мл. На технічних вагах за допомогою мірного стакану зважують 363 г гліцерину та після чого асептично у полум'ї факела вносять в інокулятор.

Композиція Б

На технічних лабораторних терезах зважують наважки 30 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 52.6 г K_2HPO_4 та 33.6 г KH_2PO_4 , 25.4 г після чого наливають в реактор змішувач об'ємом 16 л 7.9 л дистильованої води та засипають наважки очікуючи повне їх розчинення використовуючи перемішувач реактора. Після повного розчинення наважок шляхом самоплину подають композицію в попередньо простерилізований інокулятор ставлять в режим стерилізації за наступних умов стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа.

Таблиця 5.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 16 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г(мл)/л	Вміст компонента в 9.08 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Гліцерин	40	363	А	0.29
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.3	30	Б	8.6
K ₂ HPO ₄	5.8	52.6		
KH ₂ PO ₄	3.7	33.6		
Вода	7.9			
конденсат	0.79			
Розчин мікроелементів	1(мл)	9	0.009	

Розчин MgSO ₄	10(мл)	90.8	0.09
Разом	9080 мл		

5.4.4. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 160 л

Композиція А

Для приготування 82 л поживного середовища необхідно взяти 3280 грам гліцерину, Оскільки густина гліцерину дорівнює 1.26 г/мл, то 3280 г гліцерину мають орієнтовний об'єм 2.6 л. На технічних вагах за допомогою нержавіючої ємності зважують 3280 г гліцерину та переносять в попередньо простерилізовану колбу об'ємом 3 літри.

Композиція Б

На технічних лабораторних терезах зважують наважки 271 г (NH₄)₂HPO₄, 475.6 г K₂HPO₄ та 303.4 г KH₂PO₄ після чого наливають в реактор змішувач об'ємом 160 л 70.6 л дистильованої води та засипають наважки очікуючи повне їх розчинення використовуючи перемішувач реактора. Після зливають розчин в інокулятор чого ставлять інокулятор в режим стерилізації за наступних умов стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа.

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 160 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г(мл)/л	Вміст компонента в 82 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Гліцерин	40	3280	А	2.6
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.3	271	Б	77.4

K ₂ HPO ₄	5.8	476		
KH ₂ PO ₄	3.7	303		
Вода	70.6(л)			
конденсат	7(л)			
Розчин мікроелементів	1(мл)	82	В	0.08
Розчин MgSO ₄	10(мл)	820	Г	0.8
Разом	82 л			

5.4.5. Приготування та стерилізація композицій поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 742 л

Композиція А

Для приготування 742 л поживного середовища необхідно взяти 29.68 кг гліцерину, оскільки густина гліцерину дорівнює 1.26 г/мл, то 29.68 кг гліцерину мають орієнтовний об'єм 23.5 л.

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 29.68 кг гліцерину та подають в попередньо простерилізований реактор-збірник-змішувач.

Композиція Б

На технічних терезах зважують наважки 2.45 кг (NH₄)₂HPO₄, 4.3 кг K₂HPO₄ та 2.75 кг KH₂PO₄, після чого наливають в реактор змішувач об'ємом 1000 л 635 л дистильованої води та засипають наважки очікуючи повне їх розчинення використовуючи перемішувач реактора. Після чого зливають в ферментер та встановлюють режим стерилізації за наступних умов 131°C, 40 хв, 0,15 МПа.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 1250 л

Компонент поживного середовища	Концентрація, г(мл)/л	Вміст компонента в 742 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Гліцерин	40	29.68	А	23.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.3	2450	Б	698.5
K ₂ HPO ₄	5.8	4300		
KH ₂ PO ₄	3.7	2750		
Вода	635(л)			
конденсат	63.5(л)			
Розчин мікроелементів	1(мл)	742	0.74	
Розчин MgSO ₄	10(мл)	7.42 (л)	8.16	
конденсат	0.742 (л)			
Разом	742 л			

5.4.6.1. Обґрунтування та спосіб стерилізації допоміжних розчинів

Згідно джерел [15], контроль рН поживного середовища здійснюється 5 н розчином NaOH та 2 н розчином HCl.

5.4.6.2. Обґрунтування кількості та приготування 2 н розчину HCl

2 н розчин HCl має концентрацію кислоти 73 г на літр, як відомо [27], 2 мл 6% розчину HCl зменшують рН поживного середовища об'ємом 1 літр на 1 значення. Вважаючи те, що бактерії роду *Pseudomonas* не сильно змінюють рН поживного середовища протягом культивування [26], то кількість 2 н розчину HCl який необхідно приготувати будемо розраховувати для зміни значення рН на 1.

60 (кількість кислоти в 6% розчині) – 1 (зміна значення рН в літрі)

72 (кількість кислоти в 2 н HCl) – x

$72/60 = 1.2$ значення рН

Згідно розрахунків 2 мл 2 н HCl потенційно змінюють рН середовища на значення 1.2, тож для зміни значення на 1 необхідно використати:

1.2 - 2 мл

1 – x

$(1*2)/1.2 = 1.6$ мл

Для зміни рН 1 літра поживного середовища на 1 необхідно використати 1.6 мл 2 н розчину HCl. Загалом протягом культивування ми створюємо наступні об'єми культуральної рідини (згідно таблиці 3.2): 10.08 л в інокуляторі на 16 літрів, 91 л в інокуляторі на 160 літрів та 825 л в ферментері на 1250 л. Тож загалом 926 л. Для цього нам необхідно підготувати $(1.6*926 = 1481.7)$ 1480 мл 2 н розчину HCl.

Для приготування технічного 2 н розчину HCl необхідно взяти 300 мл 10 н розчину HCl та 1180 мл дистильованої води.

5.4.6.3. Обґрунтування кількості та приготування 5 н розчину NaOH

5 н розчин NaOH необхідний не тільки для контролю рН під час культивування але і під час доведення рН поживного середовища до початкового перед подачею посівного матеріалу, оскільки розчин мікроелементів приготований на основі 1 н розчину HCl потенційно закислює поживне середовище. Оскільки 5 н розчин NaOH потрібен одразу для декількох цілей, то пропонується створити еквіваленту кількість цього титруючого агенту до 2 н розчину HCl, тобто 1480 мл.

Для створення такої кількості 5 н розчину їдкого натру потрібно 300 г безводного їдкого натру розчинити в колбі з 1480 мл води дистильованої та стерилізувати в автоклаві при 131°C, 40 хв, 0,15 МПа.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки підготовчих робіт та виробничого біосинтезу біомаси *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603

Позначення	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник Країна виробник: Польща Матеріал: нержавіюча сталь [28]
ФГО-2	Фільтр грубої очистки	1	Країна виробник: Україна Клас очищення G2 60% часточок розміром більше 0.4 мкм. Ширина 592 мм висота 592 мм [29]
К-3	Компресор для стиснення повітря	1	Основні характеристики: Тип компресора: Гвинтовий, масляний або безмасляний Потужність двигуна: Від 3 до 15 кВт. Продуктивність: Від 0,5 до 2,5 м³/хв. Робочий тиск: До 1,0 МПа. Осушувач повітря: Вбудований, забезпечує точку роси до +3°C. [30]

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат			
Розроб.	Дука К.Г.				РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.
Перевір.	Буценко Л.М.						Аркуші
Реценз.							67
Н. Контр.							118
Затверд.	Стабніков В.П.					Кафедра БТМ	

ТО-4	Теплообмінник охолоджувач для охолодження стисненого повітря	1	Тип: Теплообмінник з повітряним охолодженням Модель: НВЕ 20/0,8 Призначення: Охолодження масла та повітря в компресорах Країна виробник: Україна Гарантійний термін: 12 місяців [31]
Р-5	Ресивер для стабілізації подачі повітря	1	Ресивер повітряний вертикальний РВ 500.600 Основні характеристики: Об'єм: 500 літрів (0,5 м³) Внутрішній діаметр: 600 мм ±1,75 мм Довжина: 1888 мм Робочий тиск: 1,0 МПа (10 бар) Робоча температура: від -20°C до +100°C Матеріал виготовлення: вуглецева або нержавіюча сталь Маса: 155 кг Виробництво: Україна [32]
ТН-6	Теплообмінник нагрівач для стабілізації показників повітря	1	Пластинчастий теплообмінник ZE-500-40 Основні характеристики: Кількість пластин: 40 Робоча температура: від -50°C до +200°C Максимальний робочий тиск: 30/45 бар Різниця тиску (Δp_w): 18/20 кПа Потужність випарника: 22 кВт Потужність конденсатора: 29 кВт Витрати води: Випарник: 3,7 м³/год Конденсатор: 5,0 м³/год Розміри приєднання: Холодоагент (вхід/вихід): ODS 7/8" - 1 1/8" Вода (вхід/вихід): 1"G - 1"G Габаритні розміри: 526 мм x 115 мм [33]

Ф-7	Фільтр тонкої очистки	1	Модель: НЕРА фільтр 305×610×150 H11 Фяс 99% для часточок розміром більше 0.2 мкм [34]
РД-8	Рідинний дозатор на реактор змішувач	1	Дозуючий насос SEKO MS1A094C51A4000 Основні характеристики: Продуктивність: 40 літрів на годину. Максимальний тиск: 10 бар. Максимальний об'єм впорскування на такт: 5,75 мл. Матеріал корпусу: поліпропілен (PP). Матеріал ущільнень: фторопласт (FPM). Живлення: 230-400 В. [35]
33-9	Реактор збірник змішувач об'ємом 20 л	1	реактор РС-20.00.000 ПС Основні характеристики: Робочий об'єм: 20 л. Діапазон температури в корпусі: від 20 до 95°C. Тип гомогенізатора: роторний придонного розташування, швидкість обертів від 0 до 10 000 об/хв. Дисперсність після гомогенізації: від 5 до 50 мкм. Матеріал виготовлення в контакті з продуктом: сталь AISI 316 L. Матеріал виготовлення не в контакті з продуктом: сталь AISI 304. Чистота обробки поверхонь: в контакті з продуктом $Ra \leq 0,6$; зовнішні поверхні $Ra \leq 0,8$; зовнішні зварні шви $Ra \leq 1,6$. Габаритні розміри (без вакуумної системи): Довжина: 620 мм. Ширина: 410 мм. Висота з опущеною кришкою: 840 мм. Висота з піднятою кришкою: 1 180 мм. Маса нетто (без вакуумної системи): 65 кг. [36]

ІН-10	Інокулятор об'ємом 16 л	1	Об'єм: 16 літрів Termobiotech (під замовлення) Матеріал корпусу: Нержавіюча сталь Тип мішалки: пропелерна Система аерації: мембранний аератор Система контролю: Автоматичний контроль температури, рН, рівня розчиненого кисню (DO) Система подачі газів: Подача повітря Система подачі рідин: Подача поживних середовищ, буферних розчинів Система відбору проб: Пробовідбірник для моніторингу процесу Система стерилізації: стерилізація парою Система охолодження: Водяна або повітряна система охолодження Система моніторингу: Інтерфейс для підключення до комп'ютера або PLC [37]
Ф-11	Фільтр індивідуальної очистки повітря інокулятора	1	Матеріали: PTFE, поліпропілен, поліпропіленова опора, силіконове ущільнення. Сумісність стерилізації: Підходить для стерилізації парою (Steam-in-place). Особливість: Гідрофобний. Методи: Підходить для фільтрації газу. Розміри: Довжина: 5 дюймів (13 см). Діаметр: 6.9 см (2.7 дюйма). Фільтраційна площа: 0.32 м². Імipurіті: <0.25 EU/мл (ендотоксини бактерій за тестом LAL). Екстрактивні речовини: ≤17.5 мг/картридж. Розмір пор 0.2 мкм[38]

РД-12	Рідинний дозатор на реактор змішувач	1	Дозуючий насос SEKO MS1A094C51A4000 Основні характеристики: Продуктивність: 40 літрів на годину. Максимальний тиск: 10 бар. Максимальний об'єм впорскування на такт: 5,75 мл. Матеріал корпусу: поліпропілен (PP). Матеріал ущільнень: фторопласт (FPM). Живлення: 230-400 В. [39]
33-13	Реактор збірник змішувач об'ємом 200 л	1	Матеріал конструкції: нержавіюча сталь AISI 304, товщина стінок 2 мм. Зовнішня обробка: шліфована матова поверхня. Мішалка: механічна мішалка потужністю 0,75 кВт, обертова швидкість 28 об/хв. Миюча головка: ротаторна миюча головка на 360 градусів, виготовлена з AISI 304. Насос-диспергатор: розташований в нижній частині ємності. Робочий тиск: ємність працює без тиску. Внутрішня поверхня: матова. [40]
ІН-14	Інокулятор об'ємом 160 л	1	Інокулятор Techfors-S Температурний контроль: діапазон температур від 5°C до 70°C, з можливістю стерилізації паром при 130°C. Стерилізація: на місці, паром. Швидкість мішалки: 300 об/хв для клітинних культур; 1000–1500 об/хв для бактеріальних культур, залежно від розміру посудини. Насоси: 4 цифрові, вбудовані. Об'єм посудин: 160 літрів. [41]

Ф-15	Фільтр індивідуальної очистки інокулятора	1	Матеріали: PTFE, поліпропілен, поліпропіленова опора, силіконове ущільнення. Сумісність стерилізації: Підходить для стерилізації парою (Steam-in-place). Особливість: Гідрофобний. Методи: Підходить для фільтрації газу. Розміри: Довжина: 5 дюймів (13 см). Діаметр: 6.9 см (2.7 дюйма). Фільтраційна площа: 0.32 м². Імipurіті: <0.25 EU/мл (ендотоксини бактерій за тестом LAL). Екстрактивні речовини: ≤17.5 мг/картридж. Розмір пор 0.2 мкм[38] Країна виробник: США
ДЗ-16	Дозувальні ваги для зважування композиції гліцерину,	1	Об'ємно-поршневий дозатор Flex PH20 Точність дозування: від 0,5% до 1%. Тип дозування: об'ємний. Продуктивність: до 1400 одиниць на годину при дозі 50 мл. Об'єм дози: від 10 до 1000 мл. Тип насосу: пневматичний. Кількість клапанів видачі: 2 шт. Тип тари: флакони, баночки. Живлення: 240 В, 50–60 Гц. Підключення повітря: 0,6–0,8 МПа. Габаритні розміри: 1800×580×550 мм. Країна виробник Німеччина [42]
33-17	Реактор змішувач для композиції з гліцерином об'ємом 50 літрів	1	Основні технічні характеристики: Об'єм корпусу: номінальний — 63 л, робочий — 50 л. Матеріали виготовлення: Контактуючі з продуктом поверхні: нержавіюча сталь AISI 316 L. Не контактуючі з продуктом поверхні: нержавіюча сталь AISI 304. Мішалка: пропелерна 4-лопатева з подвійним торцевим автономним ущільненням вала. Частота обертання регульована, 300–800 об/хв. Країна виробництва: Україна [43]

Н-18	Перистальтичний насос для асептичної перекачки гліцерину в виробничий ферментер	1	Перистальтичний насос ВНЗ-V від. Основні технічні характеристики: Продуктивність: до 100 літрів на годину при тиску 1,5 бар. Регулювання продуктивності: 0–100% за допомогою потенціометра. Режим дозування: постійний ON-OFF. Тип управління: вкл/викл. Аналогове: регулювання продуктивності ручкою потенціометра (в %). Матеріал корпусу: поліпропілен, стійкий до хімічних реагентів. Матеріал робочого шланга: Santoprene®, Norprene®, Silicone, Tygon-LFL. Кількість роликів: 4. Напруга живлення: 90–260 В. Споживана потужність: 20 Вт. Максимальна висота всмоктування: 2,0 м. Розміри: 250 мм (довжина) × 200 мм (ширина) × 150 мм (висота). Вага: 2,1 кг. [44]
РД-19	Рідинний дозатор для подачі композиції Г в реактор збірник-стерилізатор	1	Дозуючий насос SEKO MS1A094C51A4000 Основні характеристики: Продуктивність: 40 літрів на годину. Максимальний тиск: 10 бар. Максимальний об'єм впорскування на такт: 5,75 мл. Матеріал корпусу: поліпропілен (PP). Матеріал ущільнень: фторопласт (FPM). Живлення: 230-400 В. [45]

Р-20	Реактор збірник стерилізатор для стерилізації композиції Г	1	Лабораторний реактор РС-20.00.000 ПС Об'єм: 20 літрів. Мішалка: магнітна мішалка австрійської фірми ZETA. Клапани: мембранні, ручні. Кришка: з оглядовим відкидним вікном Dn100 з двірником та підсвічуванням, запобіжним клапаном, клапаном подачі продукту, мийними голівками та резервними штуцерами. Корпус: оснащений теплообмінною паровою та теплоізолюючою сорочками. Бокова поверхня корпусу: оснащена санітарним пробовідбірником та портами для монтажу датчиків рН та O₂. Пульт керування: кнопочового типу або з панеллю PLC, технічним контролером та можливістю програмування процесів. Дно: мембранний асептичний донний клапан 612, Dn 15, патрубок кламп EN10357 A, 1.4435 (316L), матеріал мембрани EPDM, ручний привід, виробник «GEMU». [46]
ФР-21	Виробничий ферментер об'ємом 1.25 м ³	1	Ферментер Techfors-S Температурний контроль: діапазон температур від 5°C до 70°C, з можливістю стерилізації паром при 130°C. Стерилізація: на місці, паром. Швидкість мішалки: 300 об/хв для клітинних культур; 1000–1500 об/хв для бактеріальних культур Датчик контролю рН 0-12 Датчик контролю розчиненого кисню Об'єм посудин: 1250 літрів Країна виробник: Китай [47]

Ф-22	Індивідуальний фільтр виробничого ферментера	1	Тип фільтра: Повітряний картриджний фільтр Зовнішній діаметр: 152 мм (6 дюймів) Внутрішній діаметр: 89 мм (3,5 дюйма) Висота: 305 мм (12 дюймів) Матеріал фільтра: Папір Використання: Підходить для різних застосувань, включаючи сільськогосподарську техніку та промислове обладнання Сумісність: Аналог Baldwin PA2722, Fleetguard AF25247, Donaldson P181038 Клас очистки F-12 Країна виробник: США [48]
ДЗ-23	Дозувальні ваги для зважування композиції солей, що буде стерилізована в реакторі збірнику змішувачі	1	Об'ємно-поршневий дозатор Flex PH20 Точність дозування: від 0,5% до 1%. Тип дозування: об'ємний. Продуктивність: до 1400 одиниць на годину при дозі 50 мл. Об'єм дози: від 10 до 1000 мл. Тип насосу: пневматичний. Кількість клапанів видачі: 2 шт. Тип тари: флакони, баночки. Живлення: 240 В, 50–60 Гц. Підключення повітря: 0,6–0,8 МПа. Габаритні розміри: 1800×580×550 мм. Країна виробник Німеччина [42]
РД-24	Рідинний дозатор для дозування потoku води, що буде подана в в реактор збірник- змішувач	1	Дозуючий насос SEKO MS1A094C51A4000 Основні характеристики: Продуктивність: 40 літрів на годину. Максимальний тиск: 10 бар. Максимальний об'єм впорскування на такт: 5,75 мл. Матеріал корпусу: поліпропілен (PP). Матеріал ущільнень: фторопласт (FPM). Живлення: 230-400 В. [45]

33-25	Збірник змішувач для композиції фосфорних солей	1	ємність для розчинів об'ємом 1,2 м ³ (1200 літрів) Матеріал виготовлення: Корпус: Нержавіюча сталь AISI 316L. 2. Об'єм: Геометричний об'єм: 1,2 м ³ (1200 літрів). Номінальний об'єм: 1 м ³ (1000 літрів). 3. Робоче середовище: Водні, спиртові та інші розчини. 4. Тиск: Атмосферний. 5. Температурний режим: До 100°C. 6. Привод: Потужність: 1,5 кВт. Швидкість обертання: 20 об/хв. [49]
Н-26	Відцентровий насос для перекачки композиції фосфорних солей в виробничий ферментер		AlphaDynamic AD30/01 0,55 kW Основні характеристики: Потужність: 0,55 кВт Електроживлення: 3 фази, 380 В, 50 Гц Частота обертання: 900 об/хв Матеріал виготовлення: нержавіюча сталь AISI 304 2. Гідравлічні характеристики: Продуктивність: до 3,3 м ³ /год Висота підйому (напір): до 20 м вод. ст. Діаметр вхідного та вихідного патрубків: 3. Конструктивні особливості: Країна виробник: США [50]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка та очистка аераційного повітря

ДР. 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря захоплюється через вертикальну трубу з повітрозабірником (ПЗ-1), встановленим на висоті 15 м, що перевищує найвищу точку будівлі виробничого цеху на 3 м.

ДР. 1.2. Очищення від грубих домішок

Попередня очистка повітря здійснюється за допомогою тканинного фільтра грубого очищення (Ф-2), який затримує частинки діаметром понад 5 мкм із ефективністю очищення на рівні 90%.

ДР. 1.3. Стиснення повітря в компресорі

Для забезпечення процесу аерації, компенсації гідравлічного тиску рідини в ферментері та інших виробничих потреб, повітря стискається компресором (К-3). У процесі стиснення температура повітря підвищується до 120-200 °С, а тиск досягає 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження і видалення вологи

Стиснене повітря охолоджується в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-4) до температури -25...30 °С, що дозволяє видалити надлишкову вологу. Для цього також використовується ресивер (РС-5), який усуває пульсації повітряного потоку, що можуть негативно впливати на функціонування наступних фільтрів. Вологість повітря після цього етапу має становити 70%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Після ресивера (Р-5) повітря подається в теплообмінник-нагрівач (ТН-6) з метою нагрівання до температури 35 °С повітря перед подачею в апарати.

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Лім.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Дука К.Г.							
Перевір.		Буценко Л.М.					77	118	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

ДР 1.6. Тонка очистка повітря

Після ресивера повітря проходить через фільтр тонкого очищення (Ф7), які забезпечують затримання 99 % частинок розміром більше 0,2 мкм.

ДР 1.7. Очищення в індивідуальному фільтрі

На завершальному етапі очищення повітря подається на індивідуальні фільтри (Ф-10, Ф-13, Ф-21), які забезпечують остаточне видалення контамінуючих часточок перед використанням у посівних апаратах та ферментері.

ДР 2. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР.2.1. Приготування 2 н розчину соляної кислоти

В колбу об'ємом 2 л за допомогою мірного циліндра наливають 1180 мл дистильованої води, після чого поступово за допомогою мірного циліндру додають 300 мл 10 н (~36%) розчин HCl. Після чого закривають колбу ватно-марлевым короком та ставлять в темне місце на збереження.

ДР.2.2. Підготовка та стерилізація 5 н розчину їдкого натру

Для приготування 5 н розчину необхідно на технічних лабораторних вагах відважити 300 г сухого їдкого натру та розвести їх в попередньо налиті в 3 л колбу 1000 мл дистильованої води. Після повного розчинення об'єм за допомогою мірного циліндра об'єм доводять дистильованою водою до 1500 мл.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

Створюють 1 л 1 н розчину HCl шляхом наливання в колбу об'ємом 1 літр 910 мл дистильованої води, після чого поступово додають 90 мл 36% розчину HCl. Після чого на технічних лабораторних вагах зважують 2.78 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1.98 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1.67 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.17 г $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2.81 г $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 0.29 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Після чого за допомогою мірного циліндра об'ємом 1 літр відміряють 800 мл 1 н розчину HCl та наливають його в колбу об'ємом 2 л. Після чого вносять в колбу наважки солей, очікують їх повного розчинення, виливають розчин назад у мірний циліндр та доводять

об'єм дистильованою водою до 1 л, після чого повертають розчин назад в колбу. Щільно закривають ватно-марлевим короком та ставлять колбу в темне місце на збереження.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 100 мМ розчину магній сульфату

ДР 3.2.1. Підготовка та стерилізація 100 мМ розчину MgSO_4 для створення інокуляту

Для створення 1 л 100 мМ розчину MgSO_4 необхідно на технічних лабораторних вагах відважити 12.4 г MgSO_4 , після чого налити в колбу об'ємом 2 л 900 мл дистильованої води, після чого додати наважку солі та довести мірним циліндром об'єм до 1000 мл. Після доведення об'єму розчину поміщають назад в колбу закривають ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав за наступного режиму стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа

ДР 3.2.2. Підготовка та стерилізація 100 мМ розчину MgSO_4 для виробничого культивування

Для створення 7.42 л 100 мМ розчину MgSO_4 необхідно в реактор змішувач стерилізатор (Р-20) через рідинний дозатор (РД-19) подати 7.42 л води водопровідної та попередньо відважену на технічних лабораторних вагах наважку 93 г MgSO_4 додати в дистильовану води та за допомогою перемішуючого пристрою апарата (50 об/хв) дочекатися повного розчинення солі. Після цього шляхом подавання глухої в сорочку та гострої в апарат розчин стерилізують при 131°C, 40 хв, 0,15 МПа

ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування в колбах на качалках

ДР 4.1.1 Приготування композиції А для культивування в колбах на качалках

Використовуючи лабораторні технічні ваги та простерилізований мірний стакан в асептичних умовах наливають в мірний стакан 40 г гліцерину та не виходячи з умов асептики виливають гліцерин в колбу з простерилізованими композиціями Б,В.

ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б для культивування в колбах на качалках

Використовуючи технічні лабораторні ваги зважують наступні наважки солей: 3.3 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5.8 г K_2HPO_4 та 3.7 г KH_2PO_4 . Після чого наливають за допомогою мірного циліндру об'ємом 1 л в колбу об'ємом 2 л 770 мл дистильованої води та по чергово вносять наважки солей, очікуючи їх повного розчинення. Після чого щільно закривають колбу ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав для стерилізації за наступних умов: 131 °C 40 хв.

ДР 4.2 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування в посівному апараті об'ємом 16 л.

ДР 4.2.1 Приготування композиції А для культивування в посівному апараті об'ємом 16 л.

Використовуючи лабораторні технічні ваги та простерилізований мірний стакан в асептичних умовах наливають в мірний стакан 363 г гліцерину та не виходячи з умов асептики виливають гліцерин в стерильну колбу.

ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б для культивування в посівному апараті об'ємом 16 л.

На технічних лабораторних вагах зважують наступні наважки солей: 30 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 52.6 г K_2HPO_4 та 33.6 г KH_2PO_4 . Після чого подають в реактор змішувач (ЗЗ-9) через рідинний дозатор (РД-8) 7.7 л водопровідної води та при працюючому перемішуючому пристрої на рівні 150 об/хв по чергово вносять наважки солей. Після повного розчинення наважок композицію шляхом самоплину подають в інокулятор (ІН-10) та ставлять його в режим стерилізації за наступних показників: 131 °C 40 хв.

ДР 4.3 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування в посівному апараті об'ємом 160 л.

ДР 4.3.1 Приготування композиції А для культивування в посівному апараті об'ємом 160 л.

Використовуючи технічні ваги та чисту нержавіючу ємність в ємність наливають 3280 г гліцерину після чого в асептичних умовах виливають гліцерин в стерильну колбу.

ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б для культивування в

посівному апараті об'ємом 160 л.

На технічних лабораторних вагах зважують наступні наважки солей: 271 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 475.6 г K_2HPO_4 та 303.4 г KH_2PO_4 . Після чого подають в реактор змішувач (ЗЗ-13) за допомогою рідинного дозатора (РД-12) 69.6 л водопровідної води та при працюючому перемішуючому пристрої на рівні 150 об/хв по чергово вносять наважки солей. Після повного розчинення наважок, шляхом самоплину з реактора змішувача композиція надходить в інокулятор (ІН-14) який ставлять в режим стерилізації за наступних показників: 131 °C 40 хв.

ДР 4.4 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування в виробничому ферментері об'ємом 1250 л.

ДР 4.4.1 Приготування композиції А для культивування в ферментері об'ємом 1250 л.

Використовуючи об'ємно ваговий дозатор (ДЗ-16) зважують 29.68 кг гліцерину та додають в збірник-змішувач (ЗЗ-17).

ДР 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б для культивування в ферментері об'ємом 1250 л.

На технічних вагах (ДЗ-23) зважують наступні наважки солей: 2.45 кг $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 4.3 кг K_2HPO_4 та 2.75 кг KH_2PO_4 . Після чого подають в реактор змішувач (ЗЗ-25) за допомогою рідинного дозатора (РД-24) 635 л водопровідної води та при працюючому перемішуючому пристрої на рівні 150 об/хв по чергово вносять наважки солей. Після повного розчинення наважок композицію перекачують відцентровим насосом (Н-26) до виробничого ферментера (ФР-21). ферментер ставлять в режим стерилізації за наступних показників: 131 °C 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603

зберігають у пробірках зі м'ясо-пептонним агаром при 4°C. Пересіви здійснюють кожен місяць. Всі роботи за колекційною культурою проходять строго в асептичних умовах. Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з м'ясо-пептонним агаром, розсівають петлею методом виснаженого штриха на чашки Петрі із м'ясо-пептонним агаром і вирощують при температурі 30°C упродовж 24 год. Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 5.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізолювані колонії (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі м'ясо-пептонним агаром (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування – 24 год при температурі 30°C. Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Композиції А, Б та розчин $MgSO_4$ та розчин мікроелементів (від ДР 4.1.1, ДР 4.1.2, ДР 3.1 та ДР 3.2.1) в асептичних умовах зливають в 1 колбу та розливають по 150 мл у 7 стерильних колб об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* DSM 19603, вирощену на МПА, вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з розлитим поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Після вирощування на термостатичній качалці при 300 об/хв, упродовж 24 год культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 2 л. рН середовища початковий дорівнює 7. Мікробіологічний контроль культури здійснюють мікроскопіюванням.

ТП 5.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 16 л

В інокулятор (ІН-9) в якому знаходиться простерилізована композиція Б (від ДР

4.2.2) через посівний бачок при полум'ї факела при працюючий мішалці 200 об/хв вносять асептично злиті в 1 колбу композиції А, розчин мікроелементів та розчин MgSO_4 (від ДР 4.2.1, ДР 3.1 та ДР 3.2.1). Після чого за допомогою 5 М розчину NaOH (від ДР 2.2) в полум'ї факелу через посівний бачок доводять рН до 7. Посівний матеріал з колб (від ТП 5.4) зливають в 1 простерилізовану колбу об'ємом 2 л та при полум'ї факела через посівний бачок при працюючий мішалці вносять інокулят. Та культивують при температурі 30°C протягом 22 год. рН середовища початковий дорівнює 7 Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 5.6. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 160 л

В інокулятор (ІН-13) в якому знаходиться простерилізована композиція Б (від ДР 4.3.2) через посівний бачок при полум'ї факела при працюючий мішалці 200 об/хв вносять композиції А, розчин мікроелементів та розчин MgSO_4 (від ДР 4.3.1, ДР 3.1 та ДР 3.2.1). Після чого в полум'ї факела вносять 5 М розчин NaOH (від ДР 2.2) до доведення рН до 7. Посівний матеріал (від ТП 5.5) перекачують за допомогою труби перетискування. Та культивують при температурі 30°C протягом 22 год. рН середовища початковий дорівнює 7 Проводиться мікробіологічний контроль.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробниче культивування *P. chlororapsis* в ферментері об'ємом 1250 л

Із реактора-стерилізатора (Р-19) з 10 мМ розчином MgSO_4 (від ДР 3.2.2) в ферментер (ФР-20) в якому знаходиться простерилізована композиція Б (від ДР 4.4.2) за допомогою самоплину 10 мМ розчин MgSO_4 (від ДР 3.2.2) через гребінку подається в виробничий ферментер (ФР-20). Одночасно з ним композиція А (від ДР 4.4.1) за допомогою перистальтичного насосу (Н-17) перекачуються в виробничий ферментер (ФР-20). Одночасно з цим розчин мікроелементів (від ДР 3.1) подається через посівний бачок при полум'ї факела. Протягом всього процесу зливання композицій та внесення інокуляту мішалка працює на рівні 200 об/хв. Після чого рН за допомогою 5 М розчину NaOH (від ДР 2.2) через посівний бачок у полум'ї факела подається доки рН не буде доведено до 7. Посівний матеріал (від ТП 5.6) перекачують за допомогою труби

перетискування. Її культивують при температурі 30°C протягом 44 год., очікуючи досягнення концентрації біомаси на рівні не менше 11.79 г/л. рН середовища початковий дорівнює 7.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Аналіз доступної наукової літератури та патентної документації показує, що біопрепарат "Гаупсин" на основі штаму *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 є комплексним продуктом, ефективність якого зумовлена синергічною дією як самих бактеріальних клітин, так і широкого спектру біологічно активних речовин (БАР), що синтезуються ними в процесі культивування [53, 56]. Важливо зазначити, що точний склад біопрепарату "Гаупсин" та деталі промислової технології його виробництва є комерційною таємницею та захищені патентами, що обмежує доступ до вичерпної інформації для глибокого аналізу всіх аспектів [18]. Однак, на основі відкритих даних з наукових публікацій та описів до патентів, можна відтворити загальні принципи та підходи до виготовлення рідких формуляцій біопрепаратів на основі бактерій роду *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 для одержання готового препарату "Гаупсин" [53, 56].

У випадку з біопрепаратом "Гаупсин", згідно з Патентом України №73682 [56], кінцевий продукт являє собою нативну культуральну рідину, що містить клітинну біомасу штаму (*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603), титру $1.0-1.2 \times 10^{11}$ клітин в мл [56], разом із продуктами їх метаболізму; доводиться до стандартного титру 1×10^{10} кл./мл, за допомогою водного розчину стабілізатора, але не зазначається конкретної назви компоненту стабілізатора [56]. Стадія відокремлення біомаси від культуральної рідини для приготування товарної рідкої форми "Гаупсину" відсутня [56].

Рідка формуляція біопрепарату, в загальному розумінні, є суспензією живих

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ			Лім.	Арк.	Аркуші
Розроб.	Дука К.Г.									
Перевір.	Буценко Л.М.								85	118
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

мікроорганізмів та/або їх метаболітів у рідкому носії, що забезпечує їх стабільність, життєздатність та ефективність протягом певного періоду [51]. Загалом, типова рідка формуляція біопрепаратів, зокрема на основі бактерій роду *Pseudomonas*, являє собою водну або олійну суспензію, яка містить 10–40% мікроорганізмів, 1–3% стабілізуючих компонентів (супендерів), 1–5% диспергентів, 3–8% сурфактантів і 35–65% рідкого носія (вода або масло) [51]. Для збереження життєздатності клітин мікроорганізмів та подовження терміну придатності до складу також можуть включатися додаткові речовини: гліцерин, трегалоза, гуміарабік, полівінілпіролідон (PVP), ксантанова камедь, сорбат калію тощо [51, 52, 54, 55]. Таким чином, рідка формуляція включає як життєздатні клітини-продуценти, так і широкий спектр продуктів їх метаболізму, що разом забезпечують ефективну дію препарату в агроєкосистемах [51, 53].

Для біопрепаратів на основі *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, такими компонентами є клітинна біомаса продуцентів та культуральне середовище, в якому вони вирощувалися, збагачене продуктами їх життєдіяльності – БАР [53, 56]. Ці БАР включають похідні феназину (феназин-1-карбонова кислота, 2-гідроксифеназин-1-карбонова кислота, 2-оксифеназин), похідні фенілпіролу (піролнітрин), сидерофори (псевдобактин), екзополімери та ліпополісахариди [53]. Всі ці сполуки відіграють ключову роль у забезпеченні антифунгальної, антибактеріальної, ентомопатогенної та антивірусної активності препарату [53].

Для забезпечення довготривалого зберігання рідких формуляцій *Pseudomonas* активними, до складу поживних середовищ або кінцевого продукту вносяться ці спеціальні компоненти [52, 54, 55]. Відповідно до результатів дослідження Kumaresan and Kumeresan (2019) [54], використання трегалози у концентрації 10 мМ в рідкому поживному середовищі King's B broth продемонструвало найвищу ефективність у збереженні життєздатності клітин близькоспорідненого штаму бактерій *Pseudomonas fluorescens* TPS-3 до *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603. Через 360 діб зберігання за температури 28–32°C концентрація життєздатних клітин сягала 8.00×10^9 КУО/мл [54], що свідчить про

суттєву стабілізуючу дію даного дисахариду.

У контрольному зразку, який містив лише King's B broth без будь-яких хімічних добавок, життєздатність клітин значно знижувалась: концентрація *P. fluorescens* падала до 6.33×10^2 КУО/мл вже після 5 місяців зберігання [54], що свідчить про обмежену ефективність базового середовища без стабілізаторів.

Усі тестування проводилися в умовах кімнатної температури ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), без освітлення, у стерильних флаконах, що щільно закривались, без доступу кисню або перемішування [54]. Періодичне визначення життєздатності культури здійснювали щомісяця протягом 12 місяців за допомогою крапельного посіву на агаризоване середовище King's B із наступним підрахунком колоній [54].

Враховуючи вищезазначене, технологія отримання рідкої форми біопрепарату "Гаупсин" включає наступні ключові етапи [56]:

1. Культуральну рідину після закінчення виробничого процесу подають у збірник [56];
2. Для подовженого терміну зберігання, у збірник в якості стабілізатора та консерванту вноситься компонент трегалоза у концентрації 10 мМ [54], у кількості, достатній для забезпечення стабільності та доведення титру до 1×10^{10} кл./мл [56];
3. Зі збірника культуральна рідина надходить на лінію упаковки в пластикові пляшки. Готовий препарат "Гаупсин" розливається в асептичних умовах у споживчу тару: ПЕТ-пляшки об'ємом 1 л та ПЕТ-каністри об'ємом 10 л з УФ-добавками, задля унеможливлення деградації біокомпонентів препарату. Пляшки та каністри закриваються пластмасовими кришками [53, 56].

Для промислового й складського зберігання рекомендують тримати препарат у сухих, захищених від прямого світла приміщеннях [53, 56], при $4\text{--}25^\circ\text{C}$. Заморожування препарату не допускається [53].

Отже, обраний підхід до виготовлення біопрепарату "Гаупсин" у вигляді цільної

культуральної рідини (що містить біомасу та метаболіти) без відокремлення біомаси є технологічно виправданим та економічно доцільним [53, 56]. Це дозволяє зберегти весь комплекс біологічно активних речовин, синтезованих продуцентами, що забезпечує багатогранну дію препарату [53]. Підготовка інокулюму до логарифмічної фази росту забезпечує активне розмноження та накопичення БАР у виробничому циклі [56]. Використання стандартизованих умов культивування та розливу в зручну для споживача тару (пляшки та каністри) робить препарат доступним та ефективним для застосування в сільському господарстві [53, 56].

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ проводиться шляхом розсіву проби стерилізованого середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів, та МПА – для виявлення бактерій. Пробу стерилізованого поживного середовища беруть в об'ємі 50 мл.

Підготовка чашок Петрі: У попередньо простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі наливають по 20-30 мл розплавленого на киплячій водяній бані поживного середовища. Чашки залишають на рівній поверхні для рівномірного застигання агару і витримують 2-3 доби при температурі 30°C кришками донизу. Посіви здійснюються шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл стерилізованого середовища та нанесення його на поверхню відповідного середовища. Пробу рівномірно розподіляють за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами обгортають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32-34 °C протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °C протягом 3-5 діб для СА.

9.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

9.2.1. Концентрація біомаси

Вимірювання біомаси за допомогою оптичної густини (OD, optical density) є розповсюдженим методом у мікробіології для оцінки концентрації клітин у культурі. Цей метод базується на вимірюванні ступеня поглинання світла зразком клітинної суспензії. Ось як цей процес зазвичай виконується:

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Лім.	Арк.	Аркуші	
Розроб.		Дука К.Г.							
Перевір.		Буценко Л.М.					89	118	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

Обладнання та матеріали:

- Спектрофотометр (колориметр)

- Кювети (зазвичай з розміром оптичного шляху 1 см)

- Культура клітин

- Стерильний фізіологічний розчин або відповідне середовище для розведення

Процедура:

- Підготовка зразків:

Візьміть зразок клітинної суспензії з культури.

Якщо концентрація клітин дуже висока (значення $OD > 1$), розведіть зразок стерильним фізіологічним розчином або відповідним середовищем для розведення. Важливо точно записувати розведення для подальших розрахунків.

Калібрування спектрофотометра:

Увімкніть спектрофотометр і дайте йому прогрітися, якщо це потрібно.

Виберіть відповідну довжину хвилі для вимірювання. Для бактерій зазвичай використовують довжину хвилі 600 нм (OD_{600}), для дріжджів і інших мікроорганізмів можуть використовуватися інші довжини хвиль.

Заповніть кювету стерильним фізіологічним розчином (бланком) і встановіть нульове значення OD (тарування приладу).

Вимірювання OD :

Заповніть чисту кювету зразком клітинної суспензії.

Вставте кювету в спектрофотометр і виміряйте OD . Запишіть значення.

Якщо зразок було розведено, не забудьте врахувати розведення при розрахунку кінцевої концентрації клітин.

Перерахунок OD в концентрацію клітин:

Використовуйте стандартну криву залежності OD від концентрації клітин, яку потрібно попередньо побудувати для конкретного типу клітин у конкретному середовищі. Стандартну криву будують шляхом вимірювання OD серії зразків з відомою концентрацією клітин, а потім наносять ці дані на графік для створення калібрувальної

кривої.

За допомогою цієї кривої перераховуйте виміряні значення OD в концентрацію клітин (наприклад, у CFU/мл або мг сухої маси/мл) [58].

9.2.2. Концентрація цільового продукту

Кінцевим продуктом препарату «Гаупсин» є біомаса бактерій *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603, і її концентрація напряму впливає на якість кінцевого продукту, оскільки важливу роль в ефективності препарату відіграють не тільки життєздатні бактерії, а їх метаболіти, зокрема біополімери, що представляють собою суміш білків та полісахаридів, які в процесі аналізу біомаси гравіметричним методом, залишаються у зразку і аналізуються разом з клітинами.

Для гравіметричного аналізу біомаси в наукових джерелах з вивчення штаму *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 наводиться наступна методика:

- Відбирають 50 мл зразку культуральної рідини та центрифугують при $15,777\times g$, 20 хв, $4^{\circ}C$
- Зливають надосадову рідину та заливають деіонізовану воду, після чого ретельно перемішуючи.
- Після перемішування повертають ємності в центрифугу та повторно центрифугують при ідентичних умовах ($15,777\times g$, 20 хв, $4^{\circ}C$)
- Осад переносять на вологомір, рівномірно розподіляючи біомасу по всій площі висушування.
- Запускають аналіз % вологості.
- Після завершення аналізу знімають кінцеві вагові показники після випарювання вологи.

Розрахунок сухої клітинної біомаси:

$$СКБ = M_1 - M_0$$

де:

M_1 – маса пробірки з ліофілізованими клітинами,

M_0 – маса порожньої пробірки.

9.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

9.2.3.1. Визначення концентрації гліцерину ензиматичним методом

Аналіз концентрації гліцерину базується на ферментативній реакції, у якій гліцерин перетворюється на L-гліцерол-3-фосфат за допомогою гліцерокінази (GK). У подальших реакціях утворюється піруват, який відновлюється до лактату за участю NADH. Вимірювання зниження поглинання NADH при 340 нм дозволяє кількісно визначити гліцерин, оскільки зміна поглинання пропорційна його концентрації. Метод включає розбавлення зразка, додавання реагентів, інкубацію та реєстрацію змін у спектрофотометрі. Такий підхід забезпечує високу специфічність і точність, навіть у складних матрицях. Для оптимізації аналізу використовують розрахунок кінцевої концентрації з урахуванням розведення зразка.[15,59]

Підготовка реагентів:

1. **Буферний розчин** : Використовуйте у готовому вигляді. Зберігайте при 4°C.
2. **Розчин NADH**: Розчиніть вміст у 7,5 мл дистильованої води. Зберігайте при 4°C (до 4 тижнів) або більше 2 років при -10°C.
3. **Ферменти**: Перед використанням струсіть. Зберігайте у вертикальному положенні при 4°C.
4. **Стандартний розчин гліцерину**: Використовуйте у готовому вигляді. Зберігайте при 4°C.

Обладнання:

- Спектрофотометр (довжина хвилі 340 нм).
- Кювети (довжина оптичного шляху 1 см).
- Мікропіпетки (20–1000 мкл).
- Мірні колби для розведення (100 мл, 1000 мл).
- Ваги.

- міксер.

Підготовка зразка:

1. Отримання супернатанту культуральної рідини

1 мл культуральної рідини центрифугують при 13000 об/хв, протягом 5 хв при 4 °С.

2. Розведення зразка:

- Оцінка концентрації: Якщо концентрація гліцерину у зразку становить 10–40 г/л, виконуємо розведення **1:1000**:
 - Візьміть 1 мл культуральної рідини.
 - Додайте його до 999 мл дистильованої води у мірній колбі.
 - Добре перемішайте.
- Після розведення очікувана концентрація становитиме 0,01–0,04 г/л, що підходить для подальшого аналізу.

Аналізу:

1. Заповнення кювети:

- Додайте у кювету такі компоненти:
 - 1,90 мл дистильованої води.
 - 0,10 мл розведеного зразка.
 - 0,20 мл буферного розчину.
 - 0,10 мл NADH розчину.
 - 0,02 мл ферментного розчину PK/LDH.

2. Попередня реакція:

- Перемішайте розчин у кюветі.
- Виміряйте поглинання через 4 хвилини.

3. Запуск основної реакції:

- Додайте 0,02 мл розчину гліцерокінази.
- Перемішайте.
- Через 5 хвилин виміряйте поглинання. Якщо реакція триває, продовжуйте зчитування через кожні 2 хвилини, поки показники не стабілізуються.

Розрахунок концентрації:

1. Розрахуйте зміну поглинання:

$$\Delta A_{\text{гліцерин}} = A_1 - A_2$$

2. Обчисліть концентрацію гліцерину в розведеному зразку:

$$c_{\text{розв.}} = 0,3421 \times \Delta A_{\text{гліцерин}} [\text{г/л}]$$

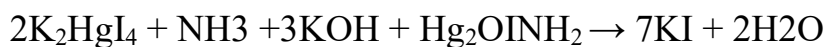
3. Визначте кінцеву концентрацію в початковому зразку, враховуючи коефіцієнт розведення $F=1000$:

$$c_{\text{кінц.}} = c_{\text{розв.}} \times 1000$$

9.2.3.2. Визначення концентрації джерела азоту

Один з найбільш відомих методів, визначення амонійного азоту є метод Несслера амоній реагує з реагентом Несслера, утворюючи кольоровий комплекс, інтенсивність якого вимірюється спектрофотометрично.

У тесті на аміак реагент Несслера (K_2HgI_4) реагує з аміаком, присутнім у зразку (в сильно лужних умовах), утворюючи жовтий колір. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації аміаку.



Матеріали та реактиви:

-Зразок розчину: Вода або інша рідина, що містить амоній.

-Реактив Несслера: Приготовлений шляхом змішування ртуть-йодиду (HgI_2),

калій-йодиду (KI) і лугу (KOH або NaOH).

- Буферний розчин: Щоб підтримувати рН зразка в потрібному діапазоні.

- Стандартний розчин амонію: Для калібрування.

- Дистильована вода: Для приготування розчинів і промивання.

- Спектрофотометр: Для вимірювання інтенсивності кольору.

- Лабораторний посуд: Пробірки, піпетки, колби.

- Процедура:

- Підготовка зразків і стандартів:

- Приготувати серію стандартних розчинів амонію різної концентрації з відомого стандартного розчину.

- Розбавлення зразку, якщо необхідно, щоб концентрація амонію знаходилася в межах вимірювань.

Реагування з реактивом Несслера:

- Взяти 50 мл кожного стандартного розчину та зразка у окремі пробірки.

- Додайте до кожної пробірки 1 мл буферного розчину для підтримання стабільного рН.

- Додати 1-2 мл реактиву Несслера до кожної пробірки, добре перемішайте.

Інкубація:

Проходження реакції 10-15 хвилин при кімнатній температурі. Під час реакції утворюється кольоровий комплекс, інтенсивність якого пропорційна концентрації аміаку.

Вимірювання:

- Встановлення спектрофотометру на відповідну довжину хвилі (близько 400-425 нм).

Кювети зі стандартними розчинами використовуйте для калібрування спектрофотометра.

- Вимірювання абсорбції кожного зразка.

Побудова калібрувальної кривої:

-Побудувати графік залежності абсорбції від концентрації для стандартних розчинів.

-Отримаємо рівняння калібрувальної кривої.

-Розрахунок концентрації амонію у зразках:

Використовуючи рівняння калібрувальної кривої, визначте концентрацію амонію у невідомих зразках за виміряною абсорбцією [37].

ЛІТЕРАТУРА

1. Біо Агро Захист. (2025). Державна реєстрація Гаупсину. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://bio-agro-zahist.com.ua/uk/component/content/article/8-osnovna-ukr/23-derzhavna-reiestratsiia-preparativ?Itemid=268>
2. Greendecor. (2025). Біо інсекто-фунгіцид «Гаупсин», 1 л. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://greendecor.com.ua/ua/dlya-rastenyi/zaschita/bolezni/guapsin-1l.html>
3. Агроексперт-Трейд. (2024, 17 січня). Ультрафіт (Гаусин / Гаупсин) – фунгіцид + інсектицид + мікродобриво. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://agroexp.com.ua/uk/bio-preparat-lf-gausin-gaupsin-insektetsid-fungitsid-mikroudobrenie>
4. Міністерство охорони здоров'я України. (1998, 28 серпня). 8.1 Пестициди і агрохімікати: гігієнічна класифікація пестицидів за ступенем небезпеки. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=4164>
5. Best-SZR. (2025). Заходи безпеки при використанні засобів захисту рослин. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://best-szr.com.ua/korisna-informaciya/zahodi-bezpeki>
6. Awasthi, Y. C., Ramana, K. V., Chaudhary, P., Srivastava, S. K., & Awasthi, S. (2017). Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 235–243. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.493>

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ЛІТЕРАТУРА	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Дука К.Г.								
Перевір.	Буценко Л.М.						97	118	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.	Стабніков В.П.								

7. Bonnineau, C., Tlili, A., Faggiano, L., Montuelle, B., & Guasch, H. (2013). The use of antioxidant enzymes in freshwater biofilms: Temporal variability vs. toxicological responses. *Aquatic Toxicology*, 136–137, 60–71. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.009>
8. Dourado, M. N., Franco, M. R., Peters, L. P., Martins, P. F., & Souza, L. A. (2015). Antioxidant enzyme activities of *Burkholderia* spp. strains: Oxidative responses to Ni toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 19922–19932. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5204-1>
9. Chen, Y., Shen, X., Peng, H., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2015). Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics Data*, 4, 33–42. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.01.006>
10. Leibniz Institute DSMZ. (2023). *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 (BacDive strain 13159). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/strain/13159>
11. Serafim, B., Bernardino, A. R., Freitas, F., & Torres, C. A. V. (2023). Recent developments in the biological activities, bioproduction, and applications of *Pseudomonas* spp. phenazines. *Molecules*, 28(3), 1368. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.3390/molecules28031368>
12. Zhou, J., & Wu, H. (2022). Regulation of phenazine-1-carboxamide production by quorum sensing in *Pseudomonas chlororaphis*. *Research in Microbiology*, 173(4–5), 103–110. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172322000652>
13. Precedence Research. (2024, 10 жовтня). Biofertilizers market size to hit USD 9.14 bn by 2032. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.precedenceresearch.com/biofertilizers-market>

14. Hashimi, M. H., Hashimi, R., & Ryan, Q. (2020). Toxic effects of pesticides on humans, plants, animals, pollinators and beneficial organisms. *Asian Plant Research Journal*, 5(4), 37–47. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.9734/APRJ/2020/v5i430114>
15. de Meneses, L., Pereira, J. R., Sevrin, C., & Grandfils, C. (2020). *Pseudomonas chlororaphis* as a multiproduct platform: Conversion of glycerol into high-value biopolymers and phenazines. *New Biotechnology*, 55, 84–90. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.002>
16. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). (2025). KEGG database. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/>
17. Пирог, Т. П., & Пенчук, Ю. М. (2019). *Біохімічні основи мікробного синтезу* (підручник, 304 с.). [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://profbook.com.ua/index.php?download_id=2020&product_id=443
18. Карлаш, Ю. В., & Красінько, В. О. (2022). *Основи проектування біотехнологічних виробництв* (373 с.). Київ: НУХТ. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://nuwm.edu.ua>
19. Abis Encyclopedia. (2025). *Pseudomonas chlororaphis*. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.tgw1916.net/Pseudomonas/chlororaphis.html>
20. Podstawka, A. (2023). Archive BacDiveID: 10.13145/Bacdive13159.20230509.8.1. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://bacdive.dsmz.de/pdf-view/13159>
21. Morohoshi, T., Yamaguchi, T., Xie, X., Wang, W., Takeuchi, K., & Someya, N. (2017). Complete genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism. *Microbes and Environments*, 32(1), 47–53. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1264/jsme2.me16162>
22. Interdez. (2025). Інструкція на засіб «САНПРОФ-УНІВЕРСАЛ». [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/sanprof-universal-sanatsiia>

23. Omega-B. (2025). Засіб мийний «LIV Актив 113». [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://omega-b.com.ua/product/liv-aktyv-113-zasib-myjnyj-luzhnyj-iz-ponyzhenym-pinoutvorennnyam/>
24. Klineko. (2025). Дезінфікуючий засіб «DESIN». [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://klineko.com.ua/nejtralnye-sredstva/desin>
25. Interdez. (2025). Дезінфікуючий засіб «МАКСИСАН». [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/maksisan-unvcpd>
26. Sánchez-Clemente, R., Igeño, M. I., Población, A. G., Guijo, M. I., Merchán, F., & Blasco, R. (2018). Study of pH changes in media during bacterial growth of several environmental strains. *Proceedings*, 2(20), 1297. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.3390/proceedings2201297>
27. 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. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dspace.nuft.edu.ua/bitstreams/f9829e27-f5ba-4d79-9b4e-8bd7861c8207/download>
28. AES. (2025). Повітрозабірник стіновий NavyFlex VLB100. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://aes.in.ua/uk/povitrozabirnik-stinovij-navyflex-vlb100>
29. AlterAir. (2025). Повітряні панельні фільтри грубого очищення G1–G4. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4>
30. WestMed. (2025). Гвинтові компресори Т. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://westmed.com.ua/product/gvyntovi-kompresory-t>
31. KMS-Market. (2025). Теплообмінник з повітряним охолодженням. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/ua/p89246060-teploobmennik-vozdushnym-ohlazhdeniem.html>

32. Kongyr. (2025). Ресивер повітряний вертикальний RV-500.600. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://kongyr.com.ua/ua/products/resiver-vozdushniy-vertikalniy-rv-500.600.html>
33. Frostland. (2025). Теплообмінник пластинчастий ZE-500-40 (аналог WTK P7-40-EVF). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://frostland.com.ua/uk/product/teploobminnik-plastinchastij-ze-500-40-analog-wtk-p7-40-evf>
34. Tehno-Parts. (2025). HEPA фільтр 305610150 H11 FIAS. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://tehnoparts.com.ua/ua/hepa-filtr-305610150-h11-fias>
35. DosingTech. (2025). Насос дозуючий Seko MS1A094C51A4000 (40 л/год, 10 бар). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/nasos-dozuyuchij-seko-ms1a094c51a4000-40-l-god-10-bar-rr-fpm>
36. Promvit. (2025). Машини для приготування м'яких і рідких лікарських форм. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/category/mashiny-po-prigotovleniyu/myagkix-i-zhidkix-lekarstvennyx-form>
37. Thermo Fisher. (2021). *Каталог біотехнології 2021*. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://thermobiotech.ua/upload/termofisher/katalog-biotekhnologiya-2021.pdf>
38. Sigma-Aldrich. (2025). Reactors. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/mm/ctgr75s01>
39. Wise-Master. (2025). Реактор 200 л AISI 304 (лабораторний). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://wise-master.com/reaktori/reaktor-200-l-aisi-304-laboratornij-dlya-virobnictva-gumativ>
40. Unilab. (2025). Ферментери Techfors Infors. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors>
41. Etatron. (2025). Насос перистальтичний ВНЗ-V. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v
42. Promvit. (2025). Реактор для рідини RS-50 (виконання EX). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-zhidkosti-rs-50-ispolnenie-ex>

- 43.ChinaPharmaMachine. (2025). Реактор-змішувач. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://chinapharmamachine.com/product/fermentation_tank
- 44.Inline Filters. (2025). Картриджний повітряний фільтр FIN-FA10463. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://inlinefilters.co.uk/Filters-Air/Cartridge/Round/FIN-FA10463>
- 45.Wise-Master. (2025). Ємність для розчинів 1.2 м³ AISI 316L. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://wise-master.com/reaktori/yemnist-dlya-rozchiniv-12-m3-aisi-316l>
- 46.Prom.ua. (2025). Насос для сольового розчину. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1055155391-nasos-dlya-solevogo.html>
- 47.Promvit. (2025). Реактор для рідини RS-20 (виконання EX). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-dlya-zhidkosti-rs-20-ispolnenie-ex>
- 48.Unilab. (2025). Ферментери для біотехнології (каталог). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors>
- 49.DosingTech. (2025). Дозуючі насоси Seko (огляд лінійки). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/nasos-dozuyuchij-seko-ms1a094c51a4000-40-l-god-10-bar-rr-fpm>
- 50.Unilab. (2025). Ферментери для біотехнології (загальна сторінка). [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/fermentery-i-bioreaktory/FermenteryTechforsInfors>
- 51.Ahlawat, N., & Kumari, K. (2025). Use of bioformulations and bio-control agents in agriculture: A review. *Plant Archives*, 25(Suppl 1), 1529-1538. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2025.v25.supplement-1.211>
- 52.Santhosh, G. P. (2018). Cell protectants, adjuvants, surfactant and preservative and their role in increasing the shelf life of liquid inoculant formulations of *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 6(4), 116-122. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.6821>

53. Kiprianova, E. A., Safronova, L. A., & Prosyanyan, A. O. (2017). Antimicrobial, entomopathogenic and antiviral activity of Gaupsin biopreparation created on the basis of *Pseudomonas chlororaphis* strains. *Biotechnologia Acta*, 10(1), 7-16. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.15407/biotech10.01.007>
54. Kumaresan, G., & Kumeresan, A. (2019). Development of liquid formulation amended with different chemical additives on the survival of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 6(5), 443-451. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.jetir.org/papers/JETIRBP06078.pdf>
55. Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, 54(2), 83-89. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.04.004>
56. Інсектофунгіцидний біопрепарат для боротьби із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О.А. Кіпріанова, С.В. Гораль : пат. 73682 Україна: А01N 63/00, С12N 1/20, С12R 1/38, А01P 3/00, А01P 7/04. № а 2004031748 ; заявл. 10.03.2004 ; опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://iprop-ua.com/inv/sw606mrx/>
57. Павленко, О.М., Павленко, Л.Л., Павленко, М.Г., Павленко, І.А. Мікробіологічний контроль нестерильних лікарських засобів. Тенденції та 101 перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації. Матеріали Міжнар. наук. інтернет-конф. (40). 2018 рр. 639-642. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://eprints.mdpu.org.ua/id/eprint/2991>
58. Корнієнко, І. М. (2017). *Промислова та екологічна біотехнологія* (методичні вказівки). Кам'янське: ДДТУ. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-mzp18.pdf>
59. Megazyme. (2025). *Assay Protocol K-GCROL (Glycerol)*. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://prod-docs.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-GCROL_DATA.pdf

60. Liu, K., Li, L., Yao, W. *et al.* Genetic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* Lzh-T5 to enhance production of trans-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilic acid. *Sci Rep* **11**, 16451 (2021). [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94674-8>

ДОДАТОК А



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ
НАВКОЛИШНЬОГО ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА УКРАЇНИ

ПОСВІДЧЕННЯ

про державну реєстрацію

Серія А № 02155

Видане ТОВ «Захист-Агро» та ПП «Агро-Захист», Україна
(назва організації чи фірми)

про те, що відповідно до Закону України "Про пестициди та агрохімікати"

препарат Гуансин, р., біопрепарат
(назва та його препаративна форма)

діюча речовина бактерії Pseudomonas aureofaciens B-111 та B-306, тип
життєздатних клітин 10×10⁹/мкг препарату
(назва та її клас)

виробник препаративної форми ТОВ «Захист-Агро» та ПП «Агро-Захист», Україна

виробник діючої речовини ТОВ «Захист-Агро» та ПП «Агро-Захист», Україна

сфера та умови застосування Зернові, садові (яблуня), в т.ч. для роздрібного продажу населенню.
Тара: пляшки полімерні смістю від 0,25 до 3,0 л, канистри
полімерні смістю від 5,0 до 25,0 л.
(культура чи об'єкт, тара, фасування та кількість, кг/л)

Зареєстрований в Україні терміном до "31" грудня 2020 р.

Запис у державному реєстрі за № 7638 від "27" серпня 2010 р.

Заступник Міністра

М.П.



А. Володін

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК А	Лім.	Арк.	Аркушіє	
Розроб.		Дука К.Г.							
Перевір.		Буценко Л.М.					105	118	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							





МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА САНІТАРНО-ЕПІДЕМІОЛОГІЧНА СЛУЖБА

Міністерство охорони здоров'я України
(назва установи)

01601 м. Київ, вул. Грушевського, 7
(місцезнаходження)

253-94-84, 559-29-88

ЗАТВЕРДЖУЮ



Голова державного санітарно-епідеміологічного управління лікарів України

М.А.Ситенко

Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи

від 22.01 2010р.

№ 05.03.02-05/ 2938

Біопрепарат «Гуансін», р. (бактерії *Pseudomonas aureofaciens* В-111 та В-306, титр життєздатних клітин 10×10^6 /млг препарату)

(об'єкт експертизи)

код за ДКПН: 24.20.15

(код за ДКПН, код за УКТЗДІ артикулі)

Сільське господарство, державна реєстрація, роздрібний продаж населенню

(сфера застосування та розповсюдження об'єкта експертизи)

ТОВ «Захист-Агро», 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 31374036; ПП «Агро-Захист» 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 33579239, Україна, -

(назва, виробник, адреса, місцезнаходження, телефон, факс, Email, WWW)

ТОВ «Захист-Агро», 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 31374036; ПП «Агро-Захист» 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 33579239, Україна, -

(назва, виробник, адреса, місцезнаходження, телефон, факс, Email, WWW)

За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи погоджено включення об'єкта експертизи Біопрепарат «Гуансін», р. (бактерії *Pseudomonas aureofaciens* В-111 та В-306, титр життєздатних клітин 10×10^6 /млг препарату) до "Переліку пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні" зі статусом "постійна реєстрація". Використовується за призначенням в агропромисловому та приватному секторі для захисту зернових та садових культур (яблуні) з нормою витрати 4-6 л/га, двократно.

За параметрами токсикометрії відповідає IV класу небезпечності (малонебезпечні сполуки), згідно з ГОСТ 12.1.007-76, проявляє слабку подразнюючу дію на слизові оболонки очей, не подразнює шкіру, не володіє сенсibilізуючою дією.

Для контролю за безпечним застосуванням препарату необхідно дотримуватись гігієнічних нормативів: ГДК *Pseudomonas aureofaciens* у повітрі робочої зони - 1×10^5 КУО/м³ (пімігуючий показник - дисбіотична дія). Строки виходу на обробку ділянок та строки очікування до збору урожаю не регламентуються.

Під час застосування, транспортування, зберігання необхідно дотримуватись вимог ДСП § 8.1.2.001-98 "Транспортування, зберігання і застосування пестицидів в народному господарстві", ДСП 201-97 «Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами), ГОСТ 28471-90 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение».

Висновок дійсний до: постійно

Відповідальність за дотримання вимог цього висновку несе заявник.

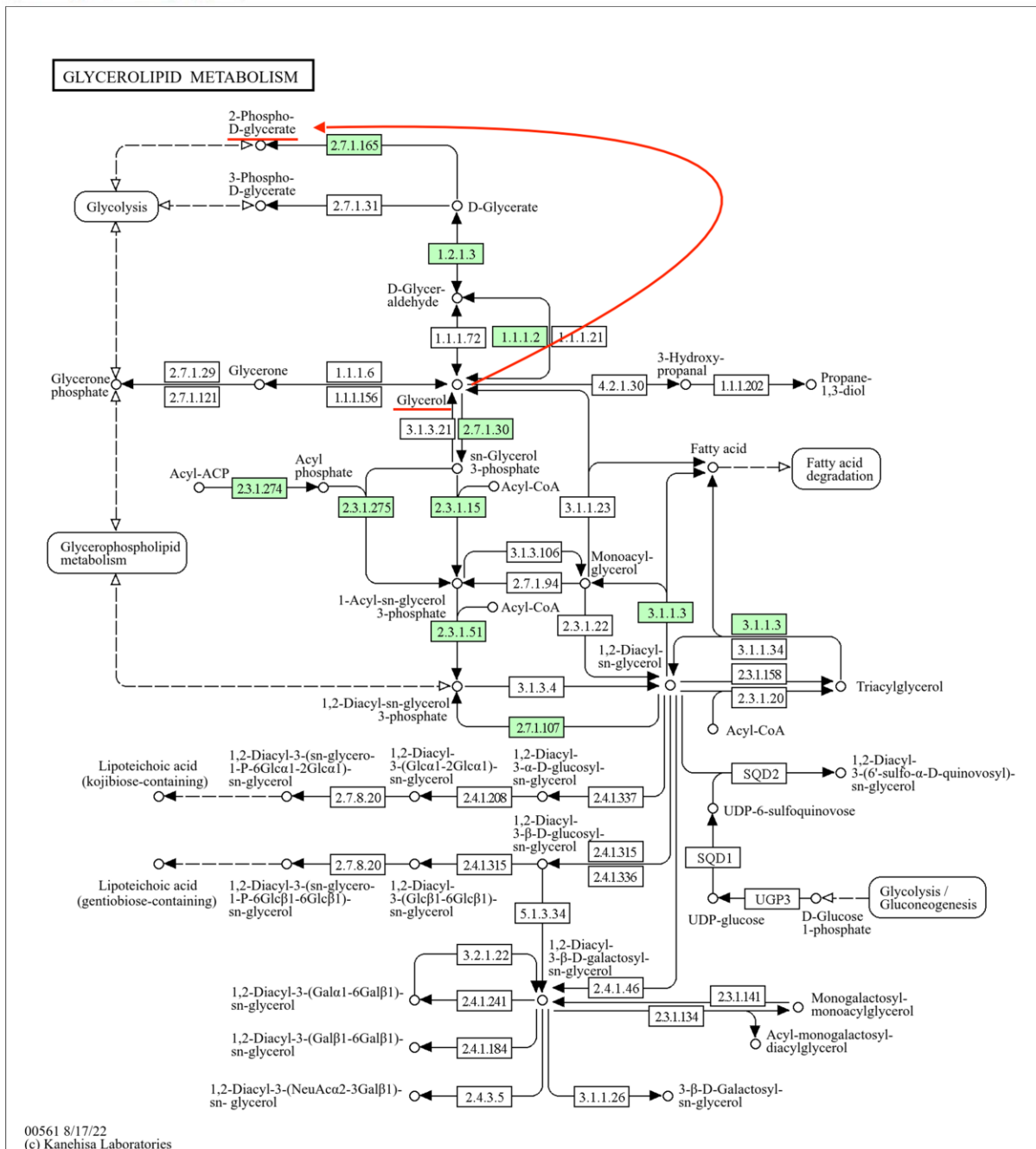
ДОДАТОК 1



Glycerolipid metabolism - *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

[Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Download | Help]

Change pathway type



НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат
Розроб.	Дука К.Г.			
Перевір.	Буценко Л.М.			
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.	Стабніков В.П.			

ДОДАТОК 1

Лім.	Арк.	Аркуші
	108	118
Кафедра БТМ		

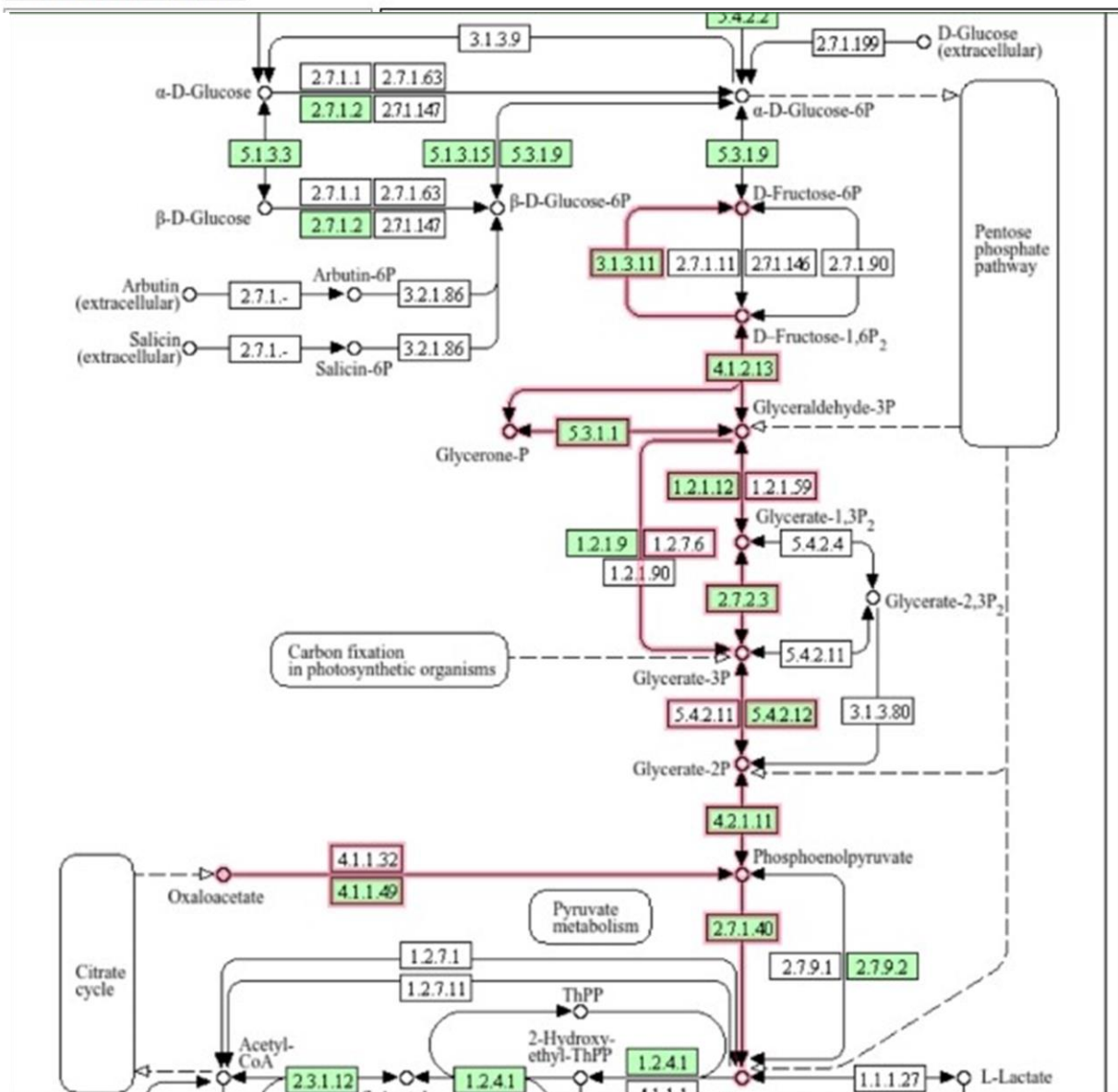
ДОДАТОК 2



Glycolysis / Gluconeogenesis - *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

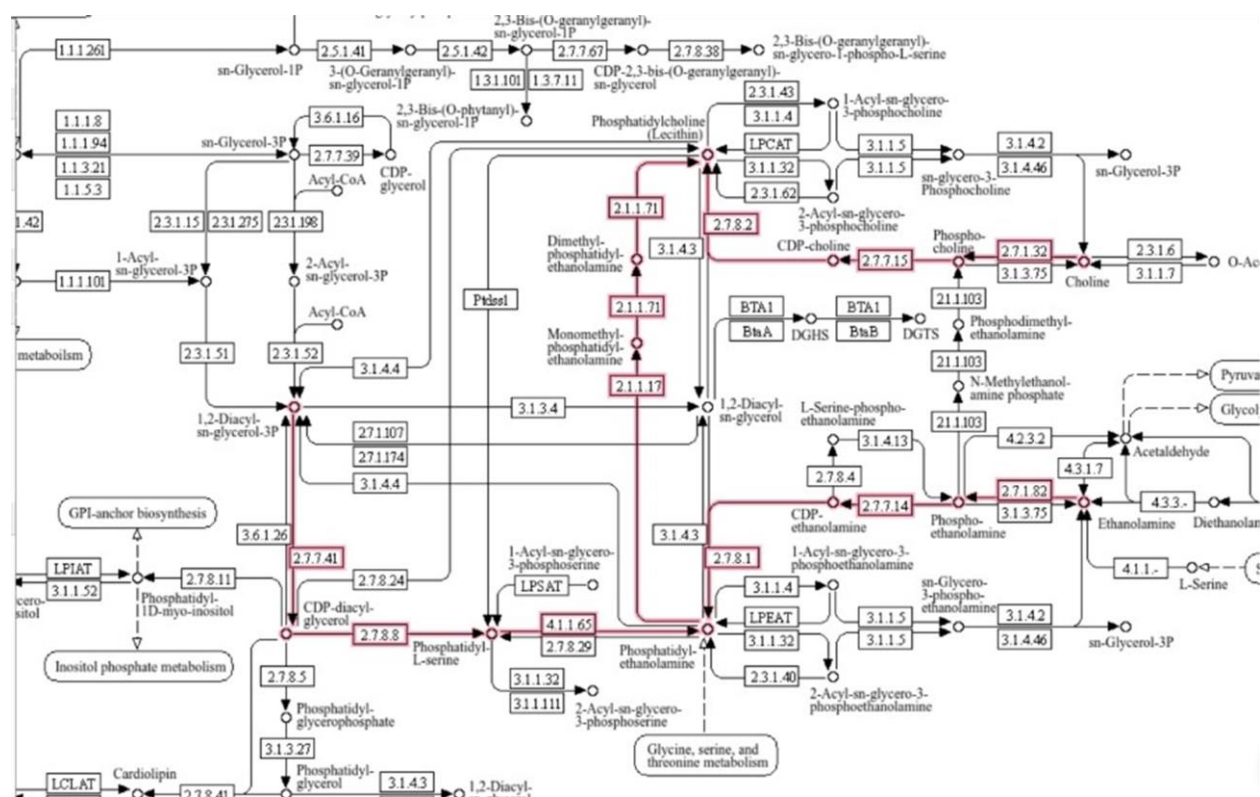
[Pathway menu | Organism group | Pathway entry | Show description | Download | Help]

Change pathway type



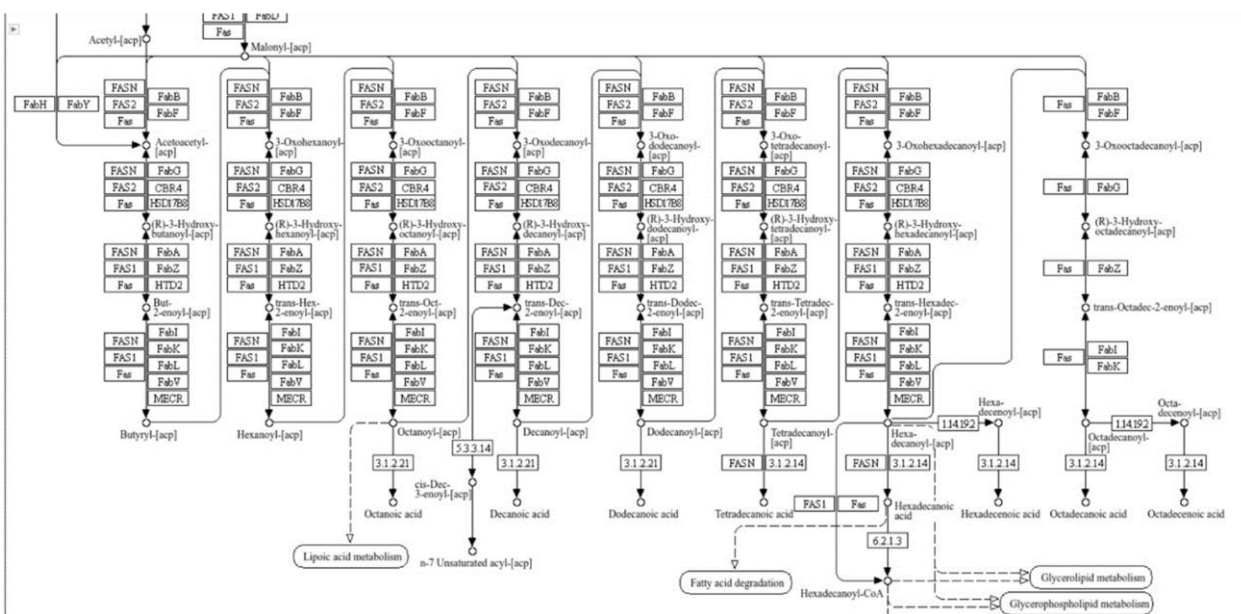
					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК 2		
Розроб.	Дука К.Г.						
Перевір.	Буценко Л.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Лім.	Арк.	Аркушів
						109	118

ДОДАТОК 3



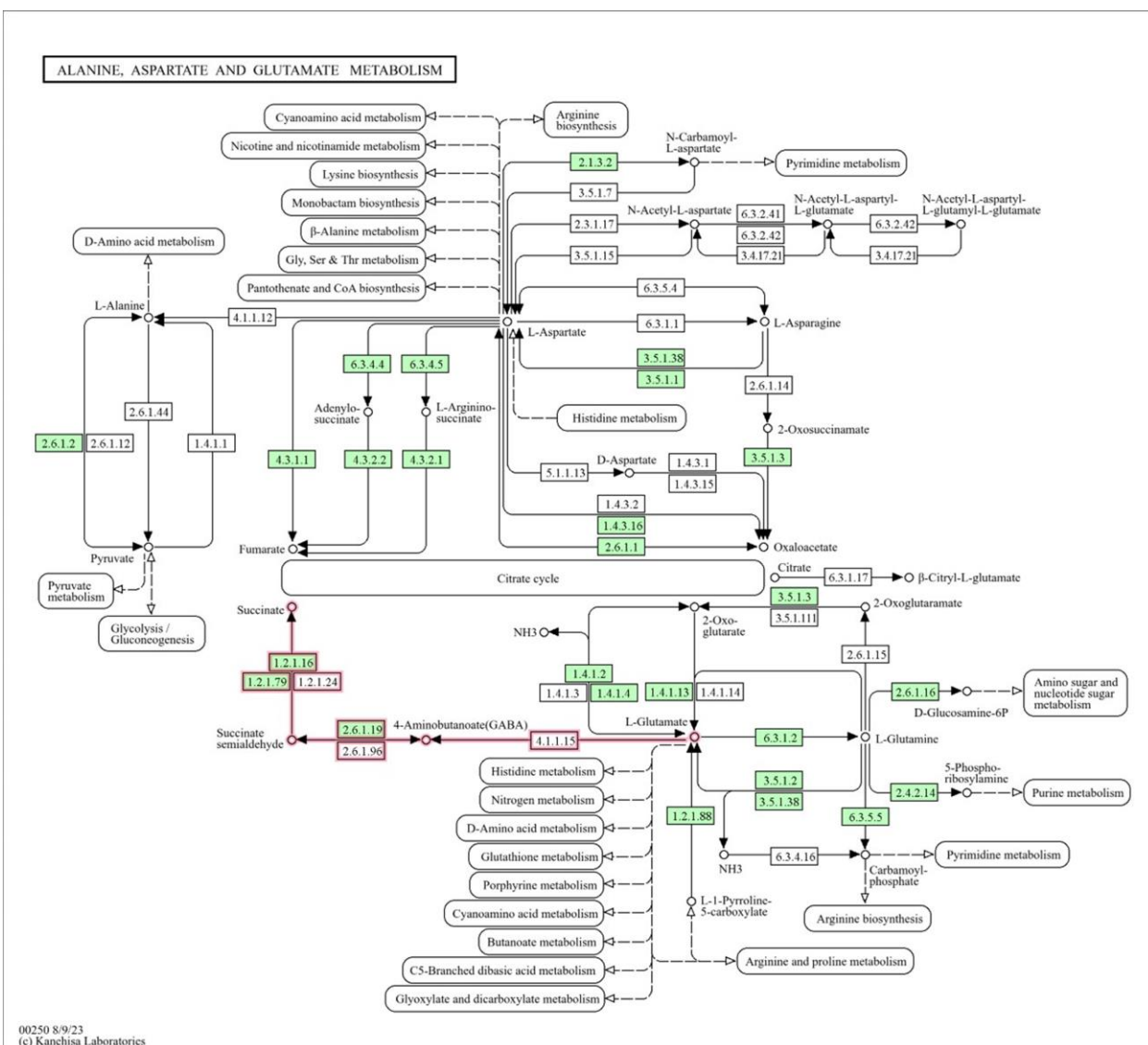
					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК 3 Кафедра БТМ		
Розроб.	Дука К.Г.						
Перевір.	Буценко Л.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Лім. Арк. Аркуші 110 118		

ДОДАТОК 4



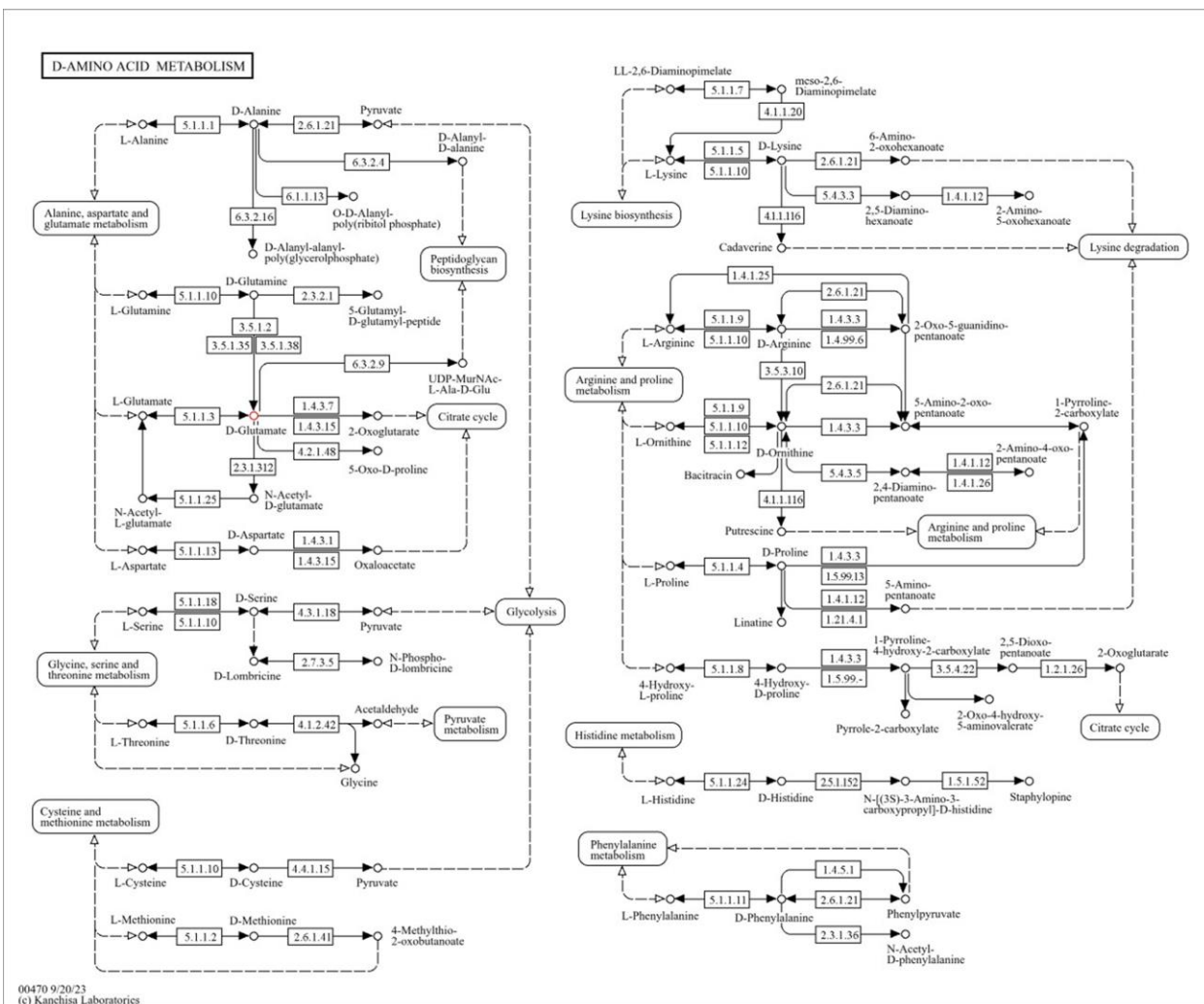
					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК 4 Кафедра БТМ		
Розроб.	Дука К.Г.						
Перевір.	Буценко Л.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						
					Лім.	Арк.	Аркушів
						111	118

ДОДАТОК 5



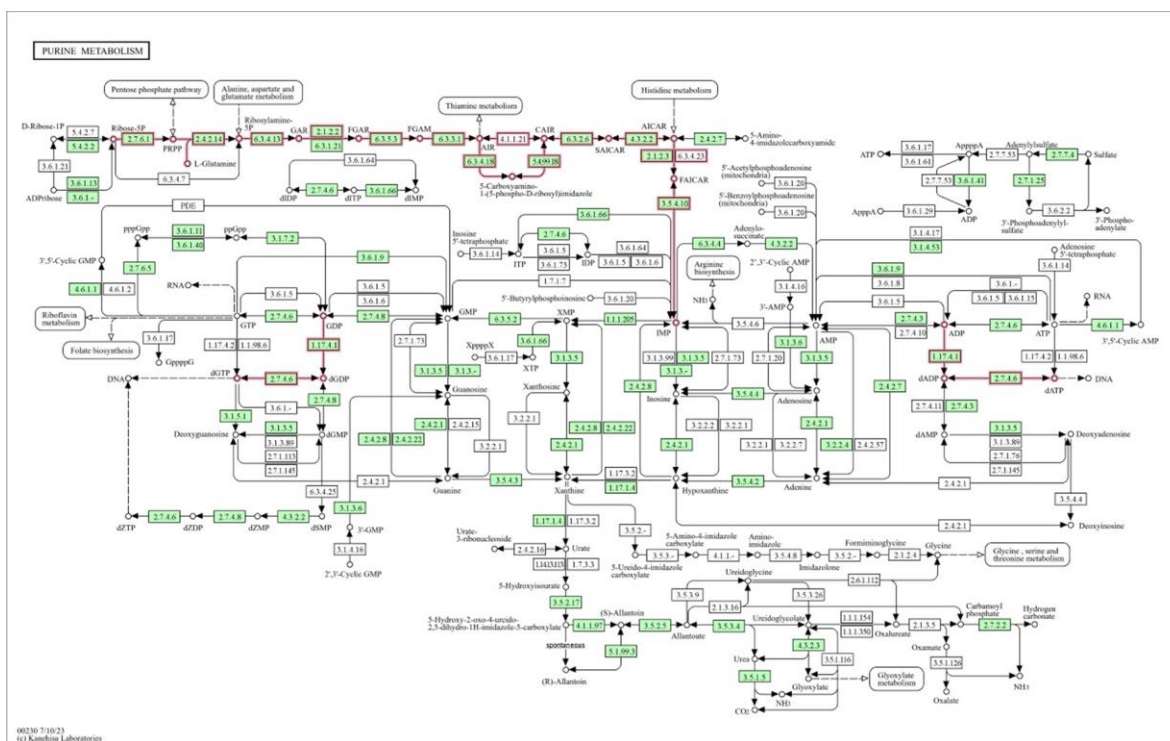
					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК 5		
Розроб.	Дука К.Г.						
Перевір.	Буценко Л.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Лім.	Арк.	Аркуші
						112	118

ДОДАТОК 6



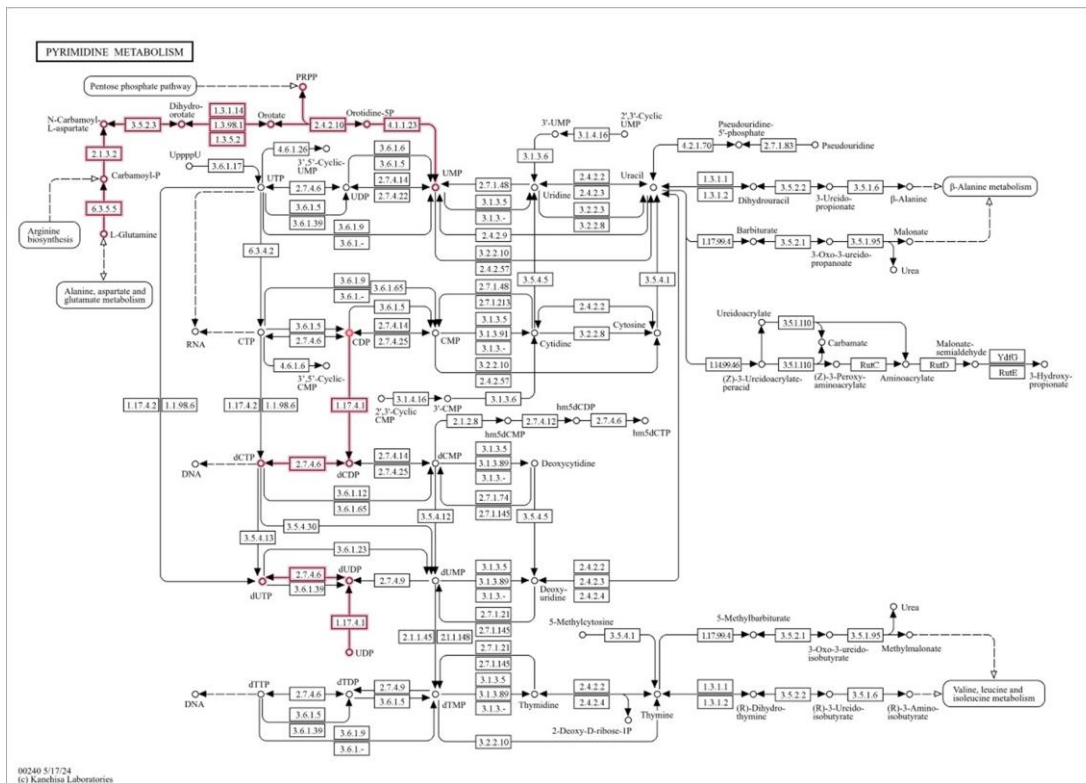
					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК 6			Лім.	Арк.	Аркуші	
Розроб.	Дука К.Г.										
Перевір.	Буценко Л.М.									113	118
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.	Стабніков В.П.										

ДОДАТОК 7



					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК 7		
Розроб.	Дука К.Г.						
Перевір.	Буценко Л.М.						
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
					Лім.	Арк.	Аркушів
						114	118

ДОДАТОК 8



					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ								
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК 8				Лім.	Арк.	Аркушів		
Розроб.		Дука К.Г.										115	118
Перевір.		Буценко Л.М.							Кафедра БТМ				
Реценз.													
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В.П.											

ДОДАТОК Б

Про забезпечення хімічної безпеки та управління хімічною продукцією

Документ 2804-IX, чинний, поточна редакція – Прийняття від 01.12.2022

(Остання подія – Введення в дію, відбулась 29.06.2024 [Появитися в історії?](#))

ІнформаціяЗберегтиКартка документаЗміст документаПошук у текстіТекст для друку



ЗАКОН УКРАЇНИ

Про забезпечення хімічної безпеки та управління хімічною продукцією

(Відомості Верховної Ради (ВВР), 2023, № 55, ст.161)

Цей Закон визначає правові, організаційні та економічні засади у сфері забезпечення хімічної безпеки та управління хімічною продукцією, спрямовані на запобігання небезпечному впливу хімічної продукції на довкілля та здоров'я людини, встановлює вимоги до діяльності суб'єктів господарювання галузі хімічної промисловості, регулює відносини, що виникають у сфері забезпечення хімічної безпеки та управління хімічною продукцією, з урахуванням міжнародних зобов'язань України.

Розділ І. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Стаття 1. Визначення термінів

1. У цьому Законі наведені нижче терміни вживаються в такому значенні:

15. Підставою для прийняття рішення про відмову в державній реєстрації хімічної речовини є:

1) подання суб'єктом господарювання документів не в повному обсязі, що додаються до заяви про проведення державної реєстрації хімічної речовини згідно із встановленим цим Законом переліком;

2) невідповідність результатів аналітичних досліджень, проведених з метою ідентифікації хімічної речовини, відомостям про хімічну речовину, які були додані до заяви про проведення державної реєстрації хімічної речовини, або якщо такі аналітичні дослідження були проведені за невалідними методами, які відрізняються від методів, зазначених у [статті 37](#) цього Закону.

16. **Термін дії** рішення про державну реєстрацію хімічної речовини є безстроковим.

17. У разі зміни інформації, зазначеної у документах, що додаються до заяви про проведення державної реєстрації, суб'єкти господарювання повинні подати оновлену інформацію до центрального органу виконавчої влади, що реалізує державну політику у сфері забезпечення хімічної безпеки, з урахуванням правил спільного подання інформації для ідентичних хімічних речовин відповідно до [частини десятої](#) цієї статті.

18. За проведення державної реєстрації хімічної речовини справляється плата. Базовим нормативом плати за проведення державної реєстрації хімічної речовини є розмір прожиткового мінімуму для працездатних осіб, що діє на день подання заяви про проведення державної реєстрації хімічної речовини.

					НУХТ БТЕК 04.02.12 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дат	ДОДАТОК Б	Лім.	Арк.	Аркушів	
Розроб.		Дука К.Г.							
Перевір.		Буценко Л.М.					116	118	
Реценз.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							



ПП "ОМЕГА-БРОКЕРС"

ЧП "ОМЕГА-БРОКЕРС"

65490 Одеська обл., м. Теплодар, вул. Хімічна 62
р/р 26004311268701 в АБ «Південний» МФО 328209
Код за ЄДРПОУ 34553358

65490 Одесская обл., г. Теплодар, ул. Химическая 62
р/с 26004311268701 в АБ «Пивденный» МФО 328209
Код ОКПО 34553358

брокерс

Технічний опис мийного засобу

ТМ «LIV»

Засіб мийний лужний із пониженням піноутворенням «LIV Актив 113»

Дата складання: 15.01.2019

Версія 2

Нормативний документ: «Технічний регламент мийних засобів»

ТУ У 24.5-30914218-030:2010 «Засіб мийний універсальний для
промислового використання. Технічні умови»

Система управління якістю: ДСТУ ISO 9001-2015 (ISO 9001:2015)

Призначення.

Продукт призначений тільки для професійного використання.

Концентрований лужний низькопінний мийний засіб для проведення миття закритих систем на підприємствах харчової промисловості всіма способами ручного та машинного миття. Цільове призначення - безрозбірна мийка (СІР-мийка) харчового обладнання методом циркуляції, рециркуляції, розпилення (трубопроводи, фільтри, резервуари, змішувачі, стерилізатори, пастеризатори, сепаратори, розливні машини, підігрівачі, випарювачі, варочні та вакуум-варочні апарати, бродильні та лагерні танки, КЕГи, морозильне обладнання, та ін.).

Засіб рекомендований для - генерального, періодичного та повсякденного використання на підприємствах молочної, пивобезалкогольної, кондитерської, крохмало-паточної, дріжджової промисловості; на підприємствах по виробництву майонезів, соусів, кетчупів; на молочних фермах.

Засіб ефективний при видаленні органічних забруднень – жирів, білків, масел, залишків овочевої та фруктової продукції, пригорівших цукру та патоки, пігментних плям, дріжджів, молочного та винного каменів та інших різноманітних нашарувань.

Технічний опис інгредієнтів

Загальна хімічна назва кожного інгредієнта	Назва згідно INCI	Тип речовини	CAS №
Вода деіонізована	Water	Розчинник	7732-18-5
Гідроксид натрію	Sodium hydroxide	Лужний інгредієнт	1310-73-2
Гідроксид калію	Potassium hydroxide	Лужний інгредієнт	1310-58-3
Суміш етоксильованих спиртів і алкілглюкозида	C6 Alkyl glucoside	Неіоногенна ПАВ	54549-24-5
	2-Ethylhexanol ethoxylate		26468-86-0
	Water		7731-18-5

Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів

Документ 717-2008-п, чинний, поточна редакція – Редакція від 26.12.2023, підстава - 1370-2023-п

Інформація Зберегти Картка документа Зміст документа Пошук у тексті Текст для друку

26.12.2023

Пошук у тексті: на виному



КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ

ПОСТАНОВА

від 20 серпня 2008 р. № 717
Київ

Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів

Публікація технічного опису інгредієнтів

6. Виробники мийних засобів розміщують **на** веб-сайті технічний опис інгредієнтів, крім інформації про:

діапазони масової частки;

компоненти ароматизаторів, ефірних олій та барвників.

Для промислових мийних засобів така інформація **заз****на**чається у довідкових листках технічних даних.

{Додаток 2 в редакції Постанови КМ [№ 408 від 12.06.2013](#); із змі**на**ми, внесеними згідно з Постановою КМ [№ 575 від 02.06.2021](#)}

21. Виробник або його уповноважений представник зберігає комплект технічної документації протягом п'яти років після виготовлення останньої партії мийного засобу і **на**дає його для проведення перевірки в установлених законодавством випадках.