

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 20__ р.

«__» _____ 20__ р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: «Культивування *Lecanicillium muscarium* для одержання Вертициліну»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

Пацина Анна Миколаївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Стабніков Віктор Петрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Бондар В.І.
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2021р.

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 «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“28” жовтня 2020 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Пациної Анни Миколаївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Lecanicillium muscarium* для одержання Вертициліну»

керівник роботи Стабніков В. П., проф., д.т.н
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27” жовтня 2020 року № 875

2. Строк подання здобувачем роботи до 31.01.2021

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 2,5 м³,
коефіцієнт заповнення ферментера становить 0,5,

цільовий продукт Вертицилін, виробничий штам *Lecanicillium muscarium*,

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва Вертициліну формату А1- аркушів 2

Апаратурна схема виробництва Вертициліну формату А1 - аркушів 1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 28 жовтня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|----|---|-------------------------------|----------|
| 1 | Опрацювання літератури за темою дипломної роботи | 29.01.20-08.11.20 | |
| 2 | Написання розділу 1. Характеристика цільового продукту | 09.11.20-19.11.20 | |
| 3 | Написання розділу 2. Характеристика біологічного агента | 19.11.20-28.11.20 | |
| 4 | Написання розділу 3. Техніко-економічне обґрунтування | 29.11.20-10.12.20 | |
| 5 | Написання розділу 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми | 10.12.20-16.12.20 | |
| 6 | Написання розділу 5. Специфікація обладнання | 17.12.20-26.12.20 | |
| 7 | Написання розділу 6. Опис технологічної схеми. | 18.12.20-26.12.20 | |
| 8 | Написання розділу 7. Контроль виробництва | 27.12.20-07.01.21 | |
| 9 | Оформлення вступу, змісту та кваліфікаційної роботи | 29.12.20-10.01.20 | |
| 10 | Оформлення графічного матеріалу | 30.12.20-30.01.21 | |

Здобувач _____
(підпис)

Пацина А.М.
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Стабніков В.П.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Дана курсова робота присвячена вивченню мікроорганізму *Lecanicillium muscarium* та сільськогосподарському ентомопатогенному препарату Вертициліну на основі спор вказаного міцеліального гриба.

Було розроблено технологічну схему біосинтезу спор *Lecanicillium muscarium* на новому поживному середовищі; в ході біосинтезу, що триває 120 годин, синтезується $6,8 \cdot 10^7$ спор/л. Порівняно з іншими штамми та середовищами-аналогами обрана комбінація є найбільш економічно доцільною. Технологічна схема включає допоміжні роботи та технологічний процес. Допоміжні роботи включають в себе приготування та стерилізацію поживних середовищ для інокуляторів різних об'ємів. Технологічний процес складається зі стадій підготовки посівного матеріалу (в колбах на качалках, інокуляторах та засівних апаратах різних об'ємів) та виробничого культивування в ферментері об'ємом 1 м^3 .

Для контролю виробництва були використані такі методи: мікробіологічний контроль; метод визначення концентрації амінного азоту; визначення концентрації сахарози.

Курсова робота складається з вступу, п'яти розділів та списку використаної літератури, який складається з 25 літературних джерел. Обсяг курсової роботи – 35 сторінок. Містить 4 рисунка, 7 таблиць та технологічну схему.

Ключові слова: *Lecanicillium muscarium*, вертицилін, біосинтез, виробниче культивування

| | | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|--------------------------|------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докум. | Підпис | Дата | Реферат | Літ. | Арк. | Акришів |
| Розроб. | | Пашина А.М. | | | | | | |
| Перевір. | | Стабніков В.П. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Пирог Т.П. | | | Кафедра БТМ | | | |

ВСТУП

Вертицилін — ентомопатогенний препарат на основі біомаси та спор групи міцеліальних грибів, що попередньо об'єднували у вид *Verticillium lecanii*. Вказаний препарат демонструє ефективність проти ряду шкідників - попелиці, кліщів та трипсів, проте найбільш небезпечним шкідником серед них є оранжерейна білокрилка - *Trialeurodes vaporariorum*, що згубно впливає на майже 200 видів декоративних та сільськогосподарських рослин; найбільш збитковим є ріст білокрилок на огірках, томатах та перцях. В природних умовах шкідник вражає рослини навесні, проте в оранжерейних умовах ріст та розвиток білокрилки може відбуватись безперервно протягом року. За оцінкою USDA, річні втрати, спричинені білокрилкою в бавовняній промисловості, складають до 500 мільйонів доларів. [2] Щороку втрати, спричинені білокрилкою, становлять мільярди доларів. [4] Необхідність виробництва даного препарату зумовлена його високою ефективністю у порівнянні з пестицидами, а також порівняно вузький спектр дії, що поєднує високу летальність для комах-шкідників та нешкідливість для людини та сільськогосподарських тварин на відміну від хімічних методів.

Актуальність роботи: оскільки продуцентами даного препарату є лише кілька споріднених видів, для створення ефективної промислової (комерційної) технології виробництва сільськогосподарських препаратів з максимальним накопиченням кінцевого продукту потрібно мати високопродуктивні штами-продуценти, знайти оптимальні умови культивування і використовувати дешеві та високоефективні субстрати.

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-----------------------|---------------|-------------|---------------------------------|--------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ</i> | | | |
| <i>Змн.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ док.</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | <i>Вступ</i> | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Архів</i> |
| <i>Розроб.</i> | | <i>Пашина А.М.</i> | | | | | | |
| <i>Перевір.</i> | | <i>Стадніков В.П.</i> | | | | | | |
| <i>Реценз.</i> | | | | | | | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Затверд.</i> | | <i>Пирог Т.П.</i> | | | | | | |
| | | | | | | <i>Кафедра БТМ</i> | | |

Новизна роботи. Новизною є використання штаму *Lecanicillium muscarium* МП-4 у поєднанні з новим поживним середовищем, що, на відміну від попередніх, містить сахарозу як найбільш сприятливе джерело вуглецю для даного виду. Даний штам за 120 годин ферментації на середовищі з сахарозою накопичує $6,8 \cdot 10^7$ спор/л, що перевищує продуктивність штамів-аналогів.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Грибний інсектицидний препарат Вертицилін являє собою культуральну рідину, що містить спори та міцелій ентомопатогенного гриба *Lecanicillium muscarium*. Допускаються пастоподібна та порошкоподібна консистенція препарату, що подовжує термін зберігання вказаного препарату. Вертицилін може отримуватись глибинним культивуванням або культивуванням на твердих поживних середовищах. При потраплянні в порожнину тіла *Lecanicillium muscarium* проростає в порожнину тіла комах і виділяє токсини, що зумовлюють



параліч та смерть шкідників. [1]

Рис. 1.1 — Одна з форм випуску цільового продукту

| | | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|--|------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № доким. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ | Літ. | Адк. | Акришів |
| Розроб. | | Пашуна А.М. | | | | | | |
| Перевір. | | Стабніков В.П. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Пирог Т.П. | | | Кафедра БТМ | | | |

Вказаний препарат демонструє ефективність проти ряду шкідників - попелиці, кліщів та трипсів, проте найбільш небезпечним шкідником серед них є оранжерейна білокрилка - *Trialeurodes vaporariorum*, що згубно впливає на майже 200 видів декоративних та сільськогосподарських рослин; найбільш збитковим є ріст білокрилок на огірках, томатах та перцях. [2] Загальні втрати, спричинені білокрилкою, становлять мільярди доларів кожного року. [3]



Рис. 1. 2 Дорослий представник *Trialeurodes vaporariorum* [4]

Існують різні методи боротьби з даним шкідником. Боротьба з оранжерейною білокрилкою за допомогою антагоністичних організмів є більш ефективною за пестициди, а також не становить загрози для людини, тварин, птахів та навколишнього середовища на відміну від хімічних методів. [4] Серед інших переваг також відзначається:

- препарат можна застосовувати у будь-яку фазу розвитку рослин: сходи, цвітіння, збирання врожаю;
 - не накопичується в рослинах та плодах;
 - сумісний зі стимуляторами росту, мікроелементами і деякими пестицидами
- [1]

Вертицилін нетоксичний для людини, теплокровних тварин і корисної ентомофауни, проте в нормах, рекомендованих інструкцією з використання, якою

передбачені запобіжні заходи при роботі з препаратом. Під час виробництва, використанні та випробовуванні препарату слід дотримуватись загальних вимог безпеки за ГОСТ 12.1.003

Спосіб застосовування препарату: гриб *Lecanicillium muscarium* інтенсивно розвивається при високій вологості повітря – 80-100%. Оптимальна температура +20°C..+26°C.

Перед використанням обов'язково струсити до однорідної маси. Необхідну кількість препарату процідити в обприскувач і долити води.

Для захисту огірків, помідорів та інших овочевих культур у період вегетації норма використання становить від 3 до 5 л на гектар.

Норми використання: у період вегетації на 1 гектар використовується не менше 300 літрів робочого розчину. Обробляти після 18 години вечора. Повторні обробітки через 7-10 днів.

Для отримання пасти в концентрат культуральної рідини вводять поліфункціональну добавку, яка складається з наповнювача - картопляного крохмалю, соєвого лецитину або вазелінового масла в якості емульгатору та антиоксиданту, ультрафіолетового протектору - діоксиду титану, консерванту - борної кислоти і антибіотика - стрептоміцину при співвідношенні компонентів, мас. %: картопляний крохмаль 6-8; діоксид титану 2-5; борна кислота 0,01-0,03; стрептоміцин 0,004-0,008; соєвий лецитин 8-14 або вазелінове масло 4-6. [5]

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Вид *Lecanicillium muscarium* не є єдиним продуцентом вертициліну — схожими ентомопатогенними властивостями володіють кілька видів, що попередньо відносили до виду *Verticillium lecanii*. [2] Серед видів-аналогів відзначається схожа ефективність проти шкідників, проте культивування на поживних середовищах різного складу призводить до різного виходу та ефективності продукту.

Таблиця 2.1

| Продуцент | Склад поживного середовища, % | Вихід цільового продукту, спор/г | Ефективність на личинках <i>Trialeurodes vaporariorum</i> , % | Тривалість культивування, год | Особливості культивування | Література |
|--|--|----------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------|------------|
| <i>Lecanicillium muscarium</i> МП-4 | Глюкоза- 20 пептон - 10 KH_2PO_4 - 2 MgSO_4 - 1 | $1 \cdot 10^7$ | 85 | 168 | 24-28°C, рН 6,5. | [3] |
| <i>Lecanicillium lecanii</i> P-81 | пивная барда - 70-90 індуктор (дизельне паливо) - 0,1-0,2 (або Твин-80 - 0,2-0,5 K_2HPO_4 - 0,1-0,2; KNO_3 - 0,1-0,2; MgSO_4 - 0,05; CaCO_3 - 0,05; NaCl - 0,05); | $4,5 \cdot 10^7$ | 70 | 72-120 | 24-28°C, рН 6,5. | [4] |
| <i>Lecanicillium muscarium</i> МП-4 (сахароза) | сахароза- 20 пептон - 10 KH_2PO_4 - 2 MgSO_4 - 1 | $6,8 \cdot 10^7$ | 95-100 | 96-120 | 24-28°C, рН 6,5. | [3, 6] |
| <i>Lecanicillium muscarium</i> | глюкоза – 20 пептон - 10 дріжжевий екстракт - 2 | $10 \cdot 10^6$ | 80 | 120 | РН 6,5 t=27°C | [5] |

| | | | | | | | |
|-----------|----------------|--------|--------|------|---|--|--|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | |
| Змн. | Арк. | № док. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА | | |
| Розроб. | Пашина А.М. | | | | | | |
| Перевір. | Стадніков В.П. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | |
| Затверд. | Пирог Т.П. | | | | Кафедра БТМ | | |

Для порівняння ефективності кожного з вказаних субстратів розглянемо питому вартість компонентів для кожного середовища.

Таблиця 2.2

| Біологічний агент | Компоненти поживного середовища | Вміст компонентів , г/л | Ціна компонентів, грн/кг | Вартість компонентів (грн) на 1 л середовища | Джерело інформації |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|--|--------------------|
| Lecanicillium muscarium МП-4 () | глюкоза | 20 | 10,74 | 0,2148 | [3] |
| | пептон | 10 | 219,85 | 2,1985 | |
| | КН ₂ РО ₄ | 2 | 29,12 | 0,0582 | |
| | MgSO ₄ | 1 | 2,42 | 0,0024 | |
| <i>Lecanicillium muscarium MII-4</i> | сахароза | 20 | 2,95 | 0,059 | [4] |
| | пептон | 10 | 219,85 | 2,1985 | |
| | КН ₂ РО ₄ | 2 | 29,12 | 0,0582 | |
| | MgSO ₄ | 1 | 2,42 | 0,0024 | |
| Lecanicillium muscarium | глюкоза | 20 | 10,74 | 0,2148 | [3, 6] |
| | пептон | 10 | 219,85 | 2,1985 | |
| | дріжжевий екстракт | 2 | 7,99 | 0,0159 | |
| Lecanicillium lecanii (штам Р-81) | пивна барда | 42* | 7 | 0,1667 | [5] |
| | твін-80 | 1 | 1,34 | 0,00134 | |
| | К ₂ НРО ₄ | 1 | 29,12 | 0,05824 | |
| | КНО ₃ | 1 | 18,79 | 0,01879 | |
| | MgSO ₄ | 0,5 | 2,42 | 0,00121 | |
| | СаСО ₃ | 0,5 | 1,33 | 0,0007 | |
| | NaCl | 0,5 | 1,07 | 0,0005 | |

* В перерахунку на суху речовину з урахуванням стандартної концентрації 6%

https://www.alibaba.com/product-detail/refined-icumsa-45-Sugar-for-sale_62003099079.html?spm=a2700.7724838.2017115.165.7d467d72dNwDTi
https://www.alibaba.com/product-detail/Food-grade-kh2po4-price_60450751793.html?spm=a2700.7724838.2017115.33.41bb3c21HRFFG9&s=p
https://www.alibaba.com/product-detail/Food-Grade-Powder-Per-Ton-Glucose_60778875171.html?spm=a2700.7724838.2017115.20.4f12384fHUJDqM&s=p
https://www.alibaba.com/product-detail/SOYA-PEPTONE-75-80-HIGH-NITROGEN_50037796497.html?spm=a2700.7724838.2017115.283.7c2c150abu7yLz
https://www.alibaba.com/product-detail/-Magnesium-Sulfate-Heptahydrate-98-99_60761548382.html?spm=a2700.7724838.2017115.34.51262baaHKKSmi&s=p
https://www.alibaba.com/trade/search?fsb=y&IndexArea=product_en&CatId=&SearchText=kno3
<https://prom.ua/p851162582-karbonat-kaltsiya-izvest.html>
<https://prom.ua/p151932890-natrij-hloristyj-hlorid.html>
<https://prom.ua/p541745028-pislyaspirova-barda-ddgs;wholesale.html>
https://www.alibaba.com/product-detail/Feed-Yeast-Extract-Powder-Brewers-Yeast_319346165.html?spm=a2700.7724838.2017115.23.3afa1837yniRi4&s=p
https://www.alibaba.com/product-detail/Top-quality-Polysorbate-80-tween-80_60416053736.html?spm=a2700.7724838.2017115.70.71334ff7XySVFM

Розглянемо тривалість біосинтезу, що визначає вартість цільового продукту

Таблиця 2.3

| Біологічний агент | Вартість 1л середовища, грн | Концентрація цільового продукту, спор/л*10 ⁶ | Умовна вартість 1г цільового продукту, грн/г | Тривалість культивування, год | Концентрація цільового продукту синтезу за год, спор/л* 10 ⁶ |
|---|-----------------------------|---|--|-------------------------------|---|
| Lecanicillium muscarium МП-4 | 2,47396 | 10 | 0,247396 | 168 | 0,06 |
| Lecanicillium muscarium МП-4 (сахароза) | 2,31816 | 68 | 0,0341 | 120 | 0,566 |
| Lecanicillium muscarium | 2,42928 | 10 | 0,242928 | 120 | 0,083 |
| Lecanicillium lecanii (штам P-81) | 0.24628 | 45 | 0.054728 | 120 | 0,375 |

З наведених таблиць можна зробити висновок, що серед ряду джерел вуглецю найбільша спороносність відзначається при культивуванні продуцента на сахарозі. При використанні цукру як джерела сахарози вказане поживне середовище є найдешевшим. Саме тому отримання препарату на поживному середовищі 2 є більш доцільним, зважаючи кількість та ефективність отриманого препарату порівняно з прототипом. Основними недоліками цільового продукту на основі решти поживних середовищ була порівняно низька кількість отриманого препарату та додаткові втрати на менш ефективне поживне середовище.

2.2. Морфолого-культуральні властивості та фізіолого-біохімічні ознаки

Колонії анаморфні, при вирощуванні штаму при 25°C на агаризованому середовищі Сабуро гриб на 10 добу утворює жовтувато-білі колонії діаметром 18 - 22 мм. Повітряний міцелій добре розвинений, пишний, пухнастий. Насичено-жовтий реверс. Радіальна складчастість і зональність у колоній практично не виражена. Гіфи гриба тонкі, прозорі, септовані, від них відходять конідієносці з фіалід, на яких утворюються конідії. Фіаліди голкоподібні, загострені, 11-30x1,3-1,8 мкм, розташовані поодинокі чи групами до 6 на гіфах міцелію чи на прямих конідієносцях, іноді в якості відгілкувань від інших фіалід. Конідії численні, овальні, видовжені, одноклітинні, безбарвні, зібрані у в слизові широкоеліпсоїдальні симетричні головки в 2,5-4,2x1-1,5 мкм. Перитеції в культурі не зустрічаються. Анаморфи, утворені безпосередньо на міцелії, що вкриває загиблу комаху, оранжеві, флягоподібні. [4]

Штам зростає при температурі 10-30°C, рН середовища 5 - 7,2, оптимальна температура 24-26°C, рН 6 - 6,5. Світло не впливає на зростання і спороношення гриба. Рясне спороношення спостерігається на середовищі Сабуро, сусло-агарі, середовищі Ваксмана. У рідкі поживні середовища бажано додавання крохмалю, сахарози, кукурудзяного екстракту.[6]

2.3 Таксономічний статус біологічного агенту

Домен: Еукаріоти

Царство: Гриби

Відділ: Аскоміцети

Клас: Сордаріоміцети

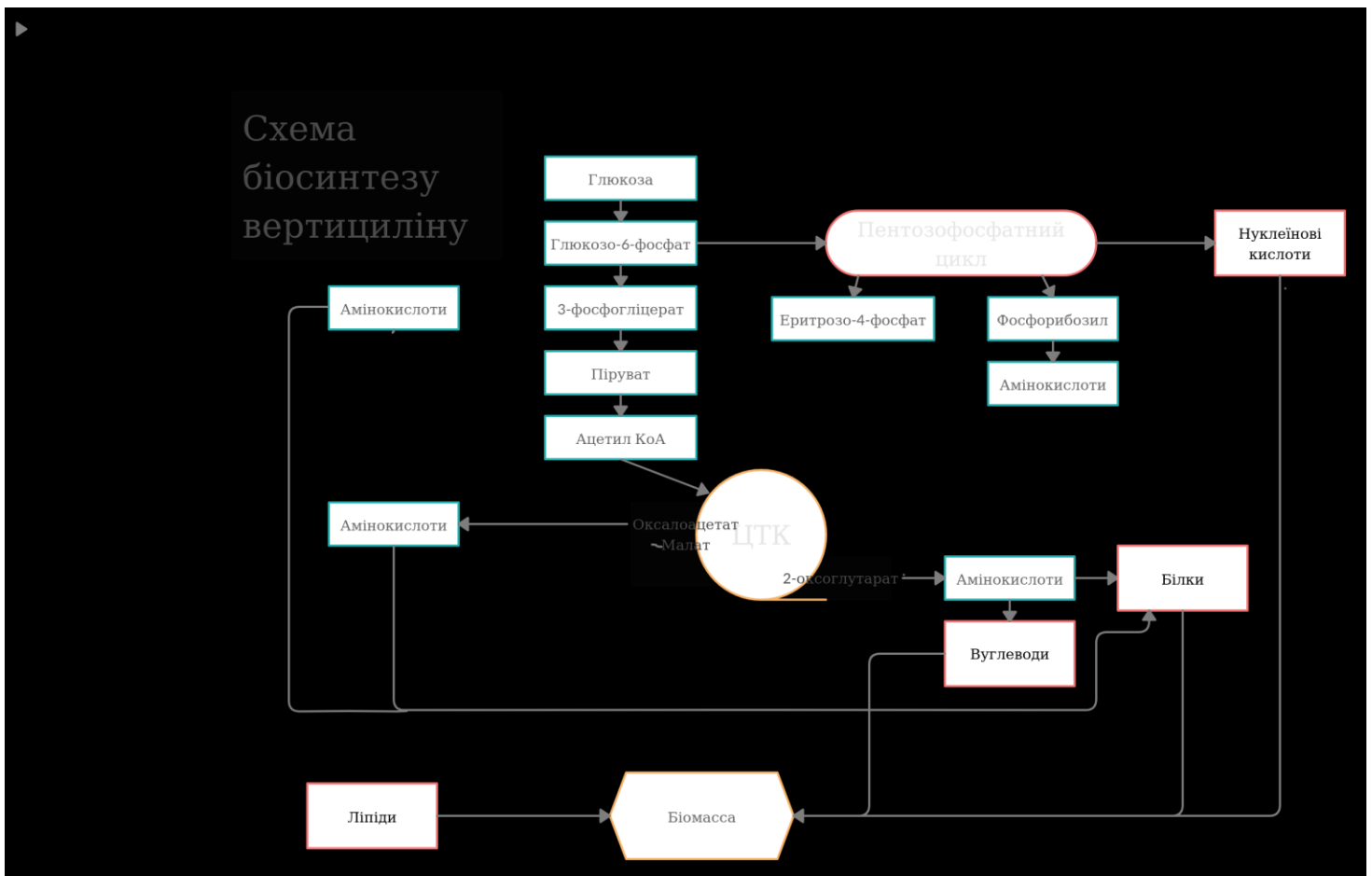
Порядок: Гіпокрейні

Сімейство: Corducipitaceae

Рід: Akanthomyces

Вид: Lecanicillium lecanii

2.4. Схема біотрансформації ростового субстрату



РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Вертицилін — ентомопатогенний препарат на основі біомаси та спор групи міцеліальних грибів, що попередньо об'єднували у вид *Verticillium lecanii*. Вказаний препарат демонструє ефективність проти ряду шкідників - попелиці, кліщів та трипсів, проте найбільш небезпечним шкідником серед них є оранжерейна білокрилка - *Trialeurodes vaporariorum*, що згубно впливає на майже 200 видів декоративних та сільськогосподарських рослин; найбільш збитковим є ріст білокрилок на огірках, томатах та перцях. В природних умовах шкідник вражає рослини навесні, проте в оранжерейних умовах ріст та розвиток білокрилки може відбуватись безперервно протягом року. За оцінкою USDA, річні втрати, спричинені білокрилкою в бавовняній промисловості, складають до 500 мільйонів доларів. [5] Щороку втрати, спричинені білокрилкою, становлять мільярди доларів. [3] Необхідність виробництва даного препарату зумовлена його високою ефективністю у порівнянні з пестицидами, а також порівняно вузький спектр дії, що поєднує високу летальність для комах-шкідників та нешкідливість для людини та сільськогосподарських тварин на відміну від хімічних методів.

| Сільсько-господарська культура | Площі посівів, га | Кількість препарату для однієї обробки 1 га поля, л/га | Кількість обробок за рік, шт | Сумарна кількість препарату для 1 га поля, л/га | Необхідний об'єм препарату для річної обробки поля, м ³ |
|--------------------------------|-------------------|--|------------------------------|---|--|
| Перець | 38,5 | 600 | 6 | 3,6 м ³ | 138,6 |

| | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|--|--|--|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | |
| Змн. | Арк. | № док.им. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування | | |
| Розроб. | | Пашина А.М. | | | | | |
| Перевір. | | Стабніков В.П. | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | |
| Затверд. | | Пироз Т.П. | | | Кафедра БТМ | | |

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Продуцент Вертициліну – *Lecanicilium uscarium* МП-4 сВ експериментальних цілях навчального проекту взято фермерські господарства Херсонської області для розрахунку необхідної річної кількості вертициліну для обробки перцю від білокрилки[4]:

Загальна площа полей для обробки станом на 2019 рік складає 38,5 га. [4]. Згідно з інструкцією даного препарату, передбачається 2-3 обробки рослин раз на два тижні протягом періоду вегетації. Оскільки дозрівання врожаю триває 4-5 місяці, в умовах теплиць можливе отримання до 2 врожаїв на рік. Отже, кількість оброблень протягом року складає:

3 обробки на два сезони = 6 разів.

Препарат розчиняється у воді для поливу із розрахунку 100 мл на 10 л води.

[] На 1 га витрачається 60 м³ робочого розчину на добу або 360 м³ на рік. Необхідна кількість робочого розчину на площу всіх теплиць складає:

$$3600 \times 38,5 = 138600 \text{ м}^3$$

Враховуючи вказане розведення, для отримання такого об'єму робочого розчину необхідно 138,6 м³ культуральної рідини.

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

Для забезпечення фермерського господарства «Панарін-Агро», потрібно одержати (з врахуванням втрат при виділенні) 138,6 м³ культуральної рідини (V_{ГП}).

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 330, тоді кількість продукту на добу (V_д) становитиме:

$$V_{д} = V_{ГП} / \text{Трд} = 138,6 / 330 = 0,42 \text{ м}^3$$

Кількість продукту за цикл (V_{кр}) буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф})/24 = (1,1 \cdot 0,42 \cdot 130)/24 = 2,5 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 2,5 \text{ м}^3$ культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1}/(1-E_{па}) = 2,3/(1-0,10) = 2,5 \text{ м}^3$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5$ розраховують можливий геометричний об'єм інокулятора ($V_{ф}$), що становить:

$$V_{ф} = V_{роб.2}/K_{зап} = 2,5/0,5 = 5 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 5 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап1} = V_{роб.1}/V_{сф} = 2,5/5 = 0,50.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже, геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{пс2} = V_{роб.2}/(1+X_{ф}) = 2,5/(1+0,1) = 2,3 \text{ м}^3$$

де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 2,5 - 2,3 = 200 \text{ л}$$

Для одержання 200 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм3}/(1-E_{па}) = 200/(1-0,10) = 222 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5$ розраховують можливий геометричний об'єм інокулятора ($V_{ф}$), що становить:

$$V_{\phi} = V_{\text{роб.3}}/K_{\text{зап}} = 222/0.5 = 444 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 450 \text{ л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}}/V_{\text{сф}} = 222/450 = 0.50$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже, геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}}/(1+X_{\phi}) = 222/(1+0,1) = 202 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 222 - 202 = 20 \text{ л}$$

Для одержання 20 л інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм4}}/(1-E_{\text{па}}) = 20/(1-0.10) = 22 \text{ л}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0.5$ розраховують можливий геометричний об'єм інокулятора (V_{ϕ}), що становить:

$$V_{\phi} = V_{\text{роб.4}}/K_{\text{зап}} = 22/0.5 = 44 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 45 \text{ л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап4}} = V_{\text{роб.4}}/V_{\text{сф}} = 22/45 = 0.50$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже, геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}}/(1+X_{\phi}) = 22/(1+0,1) = 20 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 22 - 20 = 2 \text{ л}$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм5}} = 2$ л можна одержати культивуванням дріжджів у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}}=0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм5}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 2000 / (750 \cdot 0,2) = 13,3 = 14.$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 14 качалочних колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу ліпази у ферментері об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення $0,5$ буде проходити у чотири етапи.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

4.1 Обґрунтування вибору умов культивування

Для даного видуку можливе як глибинне, так і поверхнєве культивування.

Поверхневий спосіб культивування є менш доцільним, адже його недоліки включають недосконалість конструкції застосовуваного обладнання, малу механізацію технологічних процесів, неможливість забезпечення стерильності культивування. [20]

Перевага глибинного культивування заключається у тому, що цей спосіб не потребує великих площ і громіздкого обладнання, об'єм ферментаторів можна збільшити за рахунок збільшення висоти. Для глибинного культивування також властиві простота обслуговування, можливість автоматизації та зручність видалення непошкодженого цільного продукту із культуральної рідини. [15]

При глибинному способі культивування раціональніше використовуються живильні речовини середовищ, що дають можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого живильного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю. [16] Вказаний ряд переваг у ефективності і зручності даного виду культивування порівняно з поверхневим зумовив його вибір.

Оскільки по відношенню до кисню представники виду *Lecanicillium muscarium* є облігатними аеробами, його глибинне культивування передбачає необхідність у підготовці аераційного повітря та оснащення мішалками.

| | | | | | | | |
|-----------|----------------|----------|--------|------|---|--|--|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | |
| Змн. | Арк. | № док.м. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХ- НОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА | | |
| Розроб. | Пашина А.М. | | | | | | |
| Перевір. | Стадніков В.П. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | |
| Затверд. | Пирог Т.П. | | | | Кафедра БТМ | | |

Глибинне культивування мікроорганізмів здійснюють періодичним і безперервним способами. Цей процес здійснюється у ферментаторах – герметичних вертикальних циліндричних апаратах зі сферичними кришкою і днищем. Ферментатори обладнуються штуцерами для подачі середовища, стерильної води, посівного матеріалу, повітря, пристроями для піногасіння, перемішування і підтримання необхідної температури культивування. Об'єм ферментаторів становить до 100 м³. Для виготовлення ферментаторів великого об'єму найчастіше застосовується нержавіюча сталь.

Конструкція перемішувачів і аеруючих пристроїв, якими обладнаний ферментатор, повинна забезпечувати рівномірний розподіл повітряних потоків по всьому об'єму рідини в апараті та створення максимально розвинутої поверхні фазового контакту. Найпоширеніші аеруючі пристрої барботажного і вихрового типів. У першому випадку у ферментатор повітря надходить через труби з невеликими отворами в нижній частині апарату, в другому – вихор створюється за допомогою подачі повітря через інжектори або форсунки чи керамічні пластини. Для збільшення тривалості перебування бульбашок повітря у об'ємі рідини на стінках ферментатора встановлюються відбійники, які покращують турбулізацію рідини і розчинення повітря. Розміри відбійників повинні становити не більше, ніж 0,1-0,12 діаметру ферментатора. Для перемішування середовища використовують одно- та багатоярусні пропелерні, турбінні, дисково-пропелерні мішалки.

Теплота, що виділяється в процесі культивування, відводиться за допомогою теплообмінних пристроїв. Теплообмінні пристрої можуть бути зовнішніми (сорочки, змійовики) і внутрішніми (змійовики). З технологічного погляду зручніше застосовувати сорочку – це полегшує миття і стерилізацію апарату. В апаратах великої потужності часто поєднують зовнішні та внутрішні теплообмінні пристрої.

Сухі компоненти середовища надходять у змішувач для приготування виробничого живильного середовища. Сюди ж надходять вода і рідкі компоненти через відповідні дозатори та мірники. Для розчинення солей і клейстеризації крохмалю середовище нагрівають. Готове нагріте середовище надходить у нагрівач безперервного стерилізатора живильного середовища і спіральний витримувач для витримування при температурі 140°C. Стерильне живильне середовище охолоджується в теплообміннику і надходить в чистий стерильний ферментатор, який заповнюється на 65-75% залежно від піноутворення під час росту культури. Туди ж надходить посівний матеріал. У процесі культивування здійснюється аерування вирощуваної культури кондиційованим стерильним повітрям.

Отриману біомасу гриба відокремлюють від культуральної рідини, промивають дистильованою водою від залишків поживного середовища і висушують за температури 35°C в сушильній шафі з вентиляцією. Культуральна рідина додатково відокремлюється від спор центрифугуванням 2000 об/хв протягом 2 хв.

Тип ферментерів вибирають з урахуванням специфіки продуцента, зокрема його потреби в аерації. При цьому оцінюють, з одного боку, швидкість надходження кисню з рідиною і його масопередачу від газової фази, з іншого - швидкість споживання кисню мікроорганізмами і його видалення з відпрацьованою рідиною. Швидкість переходу кисню з газової фази в рідку виражають через об'ємну швидкість адсорбції. [14]

Аерація відбувається в результаті подання стерильного, підігрітого до необхідної температури повітря через спеціальні пристосування – барботери – і перемішування культуральної рідини мішалками. При цьому відбувається більше розчинення кисню завдяки його кращому диспергуванню в середовищі. Завдяки наявності відкритих турбінних мішалок та повітря, яке подається через барботер, досягнутий достатній рівень масообміну. [17]

Ферментери діляться на механічні, газо-вихрові та аерліфтні. У механічних перемішування здійснюється спеціальною мішалкою; зустрічаються змішувачі-реактори з пропелерними, рамними, лопатевими, якірними та турбінними мішалками. Їх недоліком є часто нерівномірний розподіл субстанції, а також можливе пошкодження міцелію продуцента.. При газо-вихровому типі перемішування процес відбувається за рахунок дії двох різноспрямованих потоків газу. Аерліфтне перемішування відбувається за рахунок продування газу фази через рідину, що забезпечує оптимальну концентрацію кисню для продуцента-аероба без пошкодження міцелію. Використання даного типу перемішування може привести до зайвого утворення піни. Саме тому є доцільним використання механічних або хімічних піногасників.[19]

4.2 Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Прибирання приміщень проводять вологим способом з подальшою обробкою дезінфекційними розчинами. Для санітарної обробки необхідно застосовувати мийні, дезінфекційні та мийно-дезінфекційні розчини, зареєстровані в Україні та дозволені до застосування. Мийні, дезінфекційні та мийно-дезінфекційні розчини повинні забезпечувати знешкодження об'єктів від патогенних і сапрофітних мікроорганізмів, що можуть бути збудниками захворювань і спричинювати псування сировини, напівпродуктів та готової продукції. Санітарна обробка поверхонь устаткування, комунікацій, внутрішньоцехової тари та інвентаря складається з послідовного проведення таких операцій:

- механічне очищення і миття теплою (30 ± 5 °C) водопровідною водою з мийними засобами. При цьому видаляють з робочих поверхонь залишки сировини, напівпродуктів і готової продукції;
- промивання водопровідною водою з метою видалення з робочих поверхонь залишків мийних засобів;
- дезінфекційну обробку робочим розчином з метою знезараження від патогенних і сапрофітних мікроорганізмів;

- промивання гарячою($60\pm 5^{\circ}\text{C}$) водопровідною водою з метою видалення з робочих поверхонь залишків дезінфекційних засобів. За необхідності проводять наступне промивання водою очищеною. У разі використання для дезінфекційної обробки етанолом 76% промивання водою не проводять;

- при застосуванні мийно-дезінфекційних засобів об'єднують стадії миття і дезінфекції об'єктів водну операцію;

- розчини мийних, дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів для санітарної обробки використовують одноразово. Дезінфекційні антисептичні засоби необхідно чергувати кожні 1-3 міс. з метою недопущення формування і поширення стійких форм мікроорганізмів. Відпрацьовані розчини після санітарної обробки зливають у каналізацію, враховуючи ГДК-компоненти мийних, дезінфекційних і мийно-дезінфекційних засобів у воді водних об'єктів господарсько-питного і культурно-побутового водокористування.

Виробництво ферменту ксиланази здійснюється упродовж 300 днів (див. розділ 1). Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлений ферментер (40 м^3), посівний апарат (4 м^3), інокуляторів (400 л, 40 м^3), збірники, автоклав та інше обладнання становить (1300 м^2). Висота стін двоповерхового приміщення – 6 м. на поверх для виробничого ферментера та 6 м. одноповерхового приміщення для решти обладнання.

Обраховуємо площу стін приміщення для виробничого ферментера:

$$((7\times 2,5) + (8\times 2,5))\times 2 = 75\text{ м}^2$$

Обраховуємо площу стін приміщення для решти обладнання:

$$((10\times 2,5) + (12\times 2,5))\times 2 = 110\text{ м}^2$$

Обраховуємо площу стін приміщення для лабораторії

$$((5\times 2,5) + (4\times 2,5))\times 2 = 45\text{ м}^2$$

Обраховуємо площу стін приміщення з качалками

$$((3\times 2,5) + (4\times 2,5))\times 2 = 35\text{ м}^2$$

Загальна площа стін становить $75+110+45+35=265 \text{ м}^3$. Площа підлоги $56+120+20+12=208 \text{ м}^3$.

Визначаємо площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезинфікувати.

Таблиця 4.1.

Розрахунок загальної площі миття та дезинфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва гедіоміцину

| Об'єкт миття та/або дезинфекції | Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м^2 | Кількість процесів миття та/або дезинфекції за весь період виробництва | Загальна площа (об'єм) миття та/або дезинфекції об'єкту за весь період виробництва, м^2 |
|-----------------------------------|---|--|--|
| Обладнання, інвертар, комунікації | 20 000 | 25 | 500 000 |
| Підлога | 208 | 300 | 62 400 |
| Стіна, двері, вікна | 265 | 10 | 2 650 |

4.3. Обґрунтування вибору мийних та дезинфікувальних засобів.

Щоб обрати мийний та дезинфікувальний засіб, необхідно врахувати його вартість та витримати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м^2 витрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезинфікувального засобу [12].

Каустична сода (їдкий натр, NaOH) добре розчиняється у воді. Водні розчини мають лужну реакцію. Гарячі (1–2) % розчини каустичної соди добре обмилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні

температури розчину мийні властивості засобу падають. Розчини каустичної соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Рекомендується використовувати 0,5% розчини каустичної соди із температурою (45 ± 5) °C для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю, а також 1 та 2 % розчини із температурою (55 ± 5) °C для циркуляційного миття технологічного обладнання та комунікацій [12].

Кальцинована сода у водних розчинах частково розкладається з утворенням їдкого лугу та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості. Гарячі (55 ± 5) °C розчини кальцинованої соди добре обмилюють жирові забруднення на поверхнях та руйнують білки. При зменшенні температури розчинів до (45 ± 5) °C їх мийна здатність різко падає. Розчини кальцинованої соди кородують об'єкти, які виготовлені з алюмінію.

Хлорне вапно. Для виготовлення 1 чи 2% розчину хлорного вапна спочатку готують 10% розчин. У скляній ємкості розчиняють 1 кг хлорного вапна в 10 л води. Воду додають поступово, розмішуючи розчин дерев'яним шпателем. Після розчинення хлорного вапна розчин перемішують ще кілька хвилин і дають відстоятися протягом доби. Після відстоювання розчин фільтрують і виготовляють з нього 1 чи 2% розчин хлорного вапна, взявши відповідно 1000 чи 2000 мл 10% розчину і доводять об'єм до 10 л. Застосовують для поточної дезінфекції поверхонь приміщення, прибирального матеріалу, санітарно-технічного устаткування та комунікацій. Розчин не ушкоджує вироби з нержавіючої сталі, алюмінію, скла, кахлю, полімерних матеріалів.

“Дезактін” – дезінфекційний засіб з мийним ефектом виробництва ТОВ “ДЕЛАНА”. Не кородують об'єкти, котрі виготовлені із металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, деревини, кахлю, порцеляни, фаянсу, а також поверхні технологічного обладнання та устаткування з лакофарбовим, полімерним та гальванічним покриттям, не фіксують білкові та жирові забруднення на оброблених поверхнях, виявляють змочувальні та мийні властивості, добре

змиваються. Дезактін виявляє бактерицидні, туберкулоцидні та фунгіцидні властивості.

Рекомендується використовувати 0,2 % розчини дезактіну для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю, технологічного та санітарно-технічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари [12].

«Гембар» добре розчинний у воді. Не ушкоджує об'єкти, виготовлені з металу, скла, полімерних матеріалів та гуми. Після висихання розчину на оброблених поверхнях утворюється плівка. Гембар виявляє бактерицидні та віруліцидні властивості.

Рекомендується використовувати 5,0 % розчини гембару для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), прибирального інвентарю та санітарно-технічного обладнання [12].

Розчин етанолу 76% Розчин етанолу 76% використовують для дезінфекції устаткування та антисептичної обробки рук персоналу. Для виготовлення 1 кг етанолу 76% змішують 0,735 кг етанолу 96% і 0,264 мл води очищеної. Густина отриманого розчину має становити 870,2 кг/м³. На ємкість з дезінфекційним розчином наклеюють етикетку з зазначенням найменування розчину, дати виготовлення, попередження про небезпеку застосування, прізвища відповідальної особи.

Розчин «Сокрена», виробник — «Боден», Німеччина Реєстраційний номер 6623 від 35.09.95 р. Склад: додецилдиметиламонію хлорид, ПАВ, інгібітор корозії, комплексоутворювачі, піногасники, вода. Використовують для поточної та остаточної дезінфекції приміщень, устаткування, посуду. Виявляє бактерицидну, фунгіцидну, віруліцидну дію. Робочий розчин готують у промаркованій тарі шляхом розчинення у воді до концентрації 2.0% при періодичному перемішуванні протягом 1-2 хв. Розчин виготовляють у захисному одязі (халат, гумові рукавички,

окуляри, респіратор). Розчин використовують для дезінфекції однократно. Термін придатності робочого розчину — 30 днів, концентрату — 3 роки.

Перекис водню – негорюча рідина, сильний окислювач. Розкладається на воду та кисень, змішується з водою в будь-якому співвідношенні. Перекис водню виявляє бактерицидні, віруліцидні та спороцидні властивості.

Рекомендується використовувати 1,0 □ 3,0 та 4,0 % розчини перекису водню для поточної дезінфекції технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари, а також 6.0 % розчини перекису водню для дезінфекції технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари, які контаміновані споровими формами мікроорганізмів [12].

Таблиця 4.2.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва препарату геліоміцину

| Назва мийного/Дезінфікуючого засобу | Об'єкт миття та/або дезінфекції | Концентрація робочого розчину, % | Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л) | Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л | Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн | Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн. |
|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--|--|---|---|
| Кальцинована сода | Приміщення, устаткування, комунікації | 2.0 | 500 000 | 50 000 | 8.50 | 8 500 |

| | | | | | | |
|-------------------------|--|------|---------|--------|-----------------|---------|
| | ї | | | | | |
| Каустична сода | Приміщен ня, устатку- вання, комунікаці ї | 2.0 | 500 000 | 50 000 | 30.00 | 30 000 |
| Гембар | Стіни, підлога, вікна,двері , інвентар. | 0.5 | 56 940 | 5 694 | 275.00 | 7 972 |
| Дезактін | Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар. | 0.2 | 56 940 | 5 694 | 212.00 | 2 392 |
| Розчин «Сокрена», | Приміщен ня, устаткуван ня, тара | 2.0 | 56 940 | 5 694 | 209.00 | 24 000 |
| | | | | | <i>Продовже</i> | |
| Розчин спирту 76% | Устаткуван ня, руки персоналу | 76.0 | 45 500 | 4 500 | 30.00 | 103 000 |
| Перекис водню | Устаткуван ня, комунікаці ї, тара, | 4.0 | 350 000 | 3 500 | 120.00 | 16 800 |

Вартість концентратів мийних та дезинфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведено в табл. 2.2.

Засоби, що мають різну діючу речовину, варто застосовувати з інтервалом в 3 місяці для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

Проаналізувавши дані, наведені у табл. 2.2, можна зробити висновок, щодля миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей доцільно використовувати чотири мийних засоби – Дезактін, Гембар, розчин «Сокрена» та хлорне вапно, а для миття та дезінфекції обладнання, інвентарю, комунікацій, тари, доцільно використовувати кальциновану або каустичну соду, оскільки вони є мийно-дезинфікувальними засобами, мають порівняно невисоку вартість, що дає змогу заощадити кошти.

Миття ферментера (5 м^3), посівного інокулятора ($0,5 \text{ м}^3$) та інокулятора (50 л), збірників для приготування композицій для двох стадій культивування відбуватиметься циркуляційним способом. Об'єм мийного засобу складатиме приблизно половину кожного з відповідних об'ємів обладнання.

Підлогу необхідно мити та дезинфікувати кожного дня (300 разів), стіни, двері та вікна не рідше одного разу на місяць, тобто 10 разів. Для знезараження повітря виробничих приміщень від мікроорганізмів використовують різні бактерицидні лампи — джерела ультрафіолетового випромінювання. Кількість і потужність бактерицидних ламп необхідно підбирати з таким розрахунком, щоб при прямому опромінюванні на 1 м^3 об'єму приміщення припадало не менше $2 \pm 0,5 \text{ Вт}$ потужності випромінювача, а для екранованих бактерицидних ламп — 1 Вт . Неекрановані бактерицидні випромінювачі вмикають на 1-2 год до початку роботи, коли у приміщенні немає людей. Вхід до приміщення дозволяється лише через 15 хв після вимкнення бактерицидної лампи. Оскільки ультрафіолетові випромінювачі утворюють у повітрі токсичні продукти (озон, окиси азоту), під час їх роботи необхідно вмикати вентиляцію. Отже, обираємо періодичність

включення стельових бактерицидних ламп – 1 год після кожного генерального прибирання та 0,5 год кожного робочого дня (під час обідньої перерви) [12].

4.4. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій, повітря

Підготовка обладнання, як основна складова санітарної підготовки виробництва направлена на досягнення необхідного рівня чистоти та асептичності. Наприклад, підготовка інокуляторів, ферментерів та установки для проведення безперервної стерилізації (УБС) включає такі операції [13].

Миття обладнання. Миття обладнання проводять наступним чином. Спочатку миють водою протягом двох хвилин з передачею води у збірник нейтралізації перед скидом рідини у систему каналізування рідких викидів. Миття продовжують розчином лугу 1%, протягом 10 хвилин при 40°C, з поверненням розчину в збірник нейтралізації. Проводиться ополіскування очищеною або пом'якшеною водою, з передачею води в збірник нейтралізації [14].

Якщо в обладнанні (на поверхні) присутні стійкі до видалення забруднення речовини, то миття проводять розчином кислоти 1% при 20°C, з повертанням розчину у збірник нейтралізації. Також проводять ополіскування очищеною або пом'якшеною водою з передачею води в збірник нейтралізації. Процес завершується ополіскуванням очищеною водою, протягом 5 хвилин з повертанням води в збірник рециркуляційної води [14].

Механізовані миючі установки фірми «Керхер» (Германія). Більш довершеною конструкцією є миючі пересувні установки «Керхер». Миючий пристрій представляє собою розбризкуючу голівку, укріплену за допомогою опорного пристосування опускається всередину апарату і під натиском гарячого струменя води в 3—5 МПа швидко та ефективно очищає його внутрішню поверхню. Залежно від конструкції апарату, предмета миття, застосовуються різні опорні пристосування для миючого пристрою. Для миття апаратів малої місткості миючий пристрій кріпиться на короткій вертикальній трубі і занурюється через

люк апарату, що знаходиться на кришці. Опора лягає на фланець кришки апарату, закріплюється, а глибина занурення регулюється [14].

Крім обертання навколо власної осі розбризкуючі сопла обертаються одночасно навколо подовжньої осі миючої головки апарату, завдяки чому струменя миючого розчину досягають всі точки внутрішньої поверхні апарату.

На всмоктуючій стороні насоса температура миючої рідини складає 50–60 °С, на нагнітальній стороні після нагріву в теплообміннику 90–95 °С.

Бак з миючим розчином і регулюючим вентилям для подачі розчину, насос, що створює тиск струменя, необхідний для миття і очищення бака з фільтром, куди стікає миюча рідина із зливного отвору апарату, змонтовані напересувному візку. Рідина для миття може бути використана багато разів завдяки циркуляційному контуру і фільтрації через вбудований фільтр [14].

Внутрішня миюча головка може працювати з двома або чотирма соплами. При двох соплах струмінь довший і сильніший, що необхідне при митті великих або сильно забруднених апаратів.

Миюча установка фірми «Керхер» дозволяє отримувати всі види струменю (паровий, гарячий, теплий і холодний) з автоматичним дозуванням хімікатів. Частота обертання миючого пристрою вибирається залежно від ступеня забруднення апарату і його радіусу. Чим більше радіус і ступінь забруднення, тим менше швидкість обертання [14].

Обов'язковим елементом підготовки є перевірка якості проведених робіт для цього проводять профілактичний огляд та перевірку на герметичність. Як правило, така перевірка проводиться після стерилізації, коли проявляються можливі нещільності у місцях з'єднання елементів обладнання та апаратури.

Перевірка на герметичність ємкісного обладнання, з'єднань, та комунікацій проводиться за допомогою найбільш простого і доступного метода – омилування розчином господарського мила. Саме по виділенню бульбашок виявляють нещільності. Сучасні технології використовують галоїдні течешукачі,

що дозволяють фіксувати галогенопохідні алканів. Тетрахлорметан закачують в герметично закриті обладнання та комунікації до тиску 0,5 МПа та за допомогою датчика-течешукача галогенопохідних проводять огляд всіх з'єднань обладнання та комунікацій. Особливу увагу приділяють фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок міткисного обладнання. У випадку виявлення нещільних з'єднань проводять розбору та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації. Для з'єднань проводять їх підтягування та перепаккування, а для обладнання підтягування кришок, або з'єднань і в випадку необхідності заміну ущільнюючих прокладок люків та кришок. В якості ущільнюючого матеріалу використовують термостійку гуму, пароніт, фторопласт [14].

Одним з факторів, що найістотніше впливає на біосинтез біологічно активних речовин, є забезпечення стерильності виробництва, зокрема стерильності комунікацій та обладнання, що безпосередньо контактує з культуральною рідиною. У біотехнології застосовують різні способи стерилізації, але при цьому контамінуюча мікрофлора повинна бути повністю зруйнована або видалена. Процес дії на контамінанти при якому вони руйнуються або повністю видаляються називають стерилізацією.

Основним визнаним у біотехнології стерилізаційним прийомом є обробка обладнання та комунікацій насиченою водяною парою при $t = 125-145^{\circ}\text{C}$, при цьому існує висока гарантія досягнення необхідного рівня асептичності.

Після закінчення кожного циклу біосинтезу в посівному і основному ферментерах і видаленню з них культуральної рідини ферментери відкривають і миють гарячою водою з брандспойта, миючого пристрою (гідромонітору) очищаючи від залишків біомаси.

Послідовність носить стандартний характер і, як правило, включає такі роботи. Барботер продувають повітрям. Після огляду, а при необхідності і ремонту, ферментер знову миють водою, закривають люк і разом з іншою апаратурою стерилізують гострою та глухою насиченою парою [14].

Перед стерилізацією апаратуру і комунікації промивають водою температурою 100 °С з магістрального трубопроводу.

Стерилізаційну колонку УБС, витримувач УБС, холодильник, комунікації від холодильника до ферментеру і лінію транспортування культуральної рідини, стерилізують при надлишковому тиску 0,15 – 0,18 МПа протягом 2 год, пропускаючи пару в основній ферментер. Стерилізація ферментера продовжується 2 – 3 год під надлишковим тиском 0,12 – 0,15 Мпа.

Одночасно стерилізують фільтри тонкого очищення повітря (стерилізуючи індивідуальні фільтри) і повітряні комунікації. Стерилізують фільтри 1 годину під надлишковим тиском 0,12–0,15 МПа. Вкінці стерилізації пропарюють пробовідбірники, продуктовий штуцер для засіву, зливну лінію від ферментера до трапа протягом 30 хвилин. Пара для стерилізації повинна бути насиченою тасухою. Вологість пари знижує приховану теплоту паротворення, а отже, і ефективність дії на мікроорганізми. Недоцільно застосовувати і перегріту пару, оскільки при температурі, однаковій з насиченою парою, при її охолодженні без конденсації виділяється набагато менше тепла. У присутності повітря температура пари нижча за загальний тиск, тому повітря потрібно повністю задалегідь видаляти. Зазвичай це досягається гравітаційним способом – витісненням парою, що має вищу щільність, ніж повітря. Видалення повітряних пробок дозволяє прогріти всі деталі устаткування і усунути разом з ними можливе джерело інфекції.

Завдяки хорошій теплопровідності металу і обмиванню внутрішньої поверхні ферментера конденсатом пари цим способом досягається надійна стерилізація. Проте перед стерилізацією з ферментера необхідно видалити осаді вимити його, інакше в осаді може зберегтися стороння мікрофлора і надалі бути джерелом інфекції.

Тривалість стерилізації, як правило, дається без урахування часу, що витрачається на видалення повітря і прогрів ферментера.

Слід приділяти більшу увагу тим частинам ферментеру та комунікацій, що визначаються, як важкодоступні: штуцерам, пробовідбірникам, датчикам, втрубопроводах – запорній арматурі, фланцям, фасонним деталям, тупиковиммісцям і відкритим закінченням труб.

Для забезпечення і підтримки асептичності після закінчення стерилізації ферментер через барботер подають стерильне повітря, підтримуючи надмірний тиск 0,02 – 0,03 МПа (щоб уникнути попадання сторонньої мікрофлори) [14].

4.5. Обґрунтування стадії підготовки стерильного аераційного повітря

Основною вимогою, що пред'являється до аеруючого повітря при культивуванні, є стерильність, під якою розуміється повна відсутність мікрофлори [15].

При вирощуванні мікроорганізмів в глибинних умовах потрібна безперервна подача стерильного повітря в ферментери, на аерацію культуральної рідини. Повітря, що подається в ферментер, не тільки постачає зростаючу культуру киснем, а й відводить газоподібні продукти обміну і фізіологічне тепло, що виділяється мікроорганізмом в процесі розвитку [16].

Використовуються методи газової очистки або застосування антисептиків, підвищені або знижені температури, ультрафіолетові випромінювання, іонізуюче випромінювання тощо. Використання цих методів свідчить про їх ненадійність, так як спори та конідії мають високу стійкість до високих температур та іонізуючого випромінювання[16].

У процесах мікробіологічного синтезу повітря, що подається на аерацію, повинен бути очищений на 99,9999 % від домішок і мікроорганізмів розміром до 1 мкм [16].

Стадію підготовки аераційного повітря у разі великих його витрат здійснюють в окремих будівлях, у разі невеликих – в окремих приміщеннях. Підготовка аераційного повітря складається з таких стадій:

Забір атмосферного повітря. Забір повітря потрібно здійснювати зовні приміщення, із затінених і найменш забруднених місць, на висоті не менше 4 м від поверхні землі. Повітряна частина складається з корпусу з шиберам, завихрювача, заслінки і корпусу примусової подачі повітря.

Важливе значення має вибір місця для забору атмосферного повітря. Слід враховувати, що чим нижча температура всмоктуваного повітря, тим менше міститься в ньому вологи і тим вища його щільність [17].

Всмоктуване повітря обов'язково має проходити через пристрої, які очищають його від механічних домішок і вологи. Відносна вологість повітря, що надходить у компресор, не повинна перевищувати 65 %. При більшому вологовмісті всмоктуваного повітря необхідно передбачати його осушення [18].

Очищення повітря від пилу на плоских тканинних фільтрах грубого очищення. Фільтри грубого очищення призначені для уловлювання основної маси забруднення, що потрапили в систему після проходження фільтрів попереднього очищення і компресора, а також для подовження терміну служби фільтрів тонкого очищення, що виконують основний процес стерилізації на стадії фільтрації.

Обираємо фільтр касетного типу продуктивність його становить $550 \text{ м}^3/\text{хв}$. [18]. В якості фільтруючого матеріалу можна використовувати такі матеріали: скловату, скловолокно, бавовна, нетканий волокнистий шар із поліпропіленових або поліетиленових волокон тощо. Як фільтруючий матеріал обираємо скловату, а в верхніх шарах укладаємо ще чесану бавовну. Скловата служить попереднім фільтром і перешкоджає карамелізації бавовни при стерилізації. Такі фільтрувальні матеріали мають високу продуктивність і таким чином здійснюється двоступеневе очищення повітря в одному апараті. Фільтр грубої очистки стерилізуємо гострою парою протягом 2 годин при тиску 0,4 мПа. Після стерилізації проводиться просушування фільтра стерильним нагрітим повітрям [18].

Після проходження повітря через фільтри грубої очистки відбувається його стиснення. Стиснення повітря проходить в компресорі (при цьому повітря нагрівається до температури 120-200 °С) [17].

Після стиснення повітря відбувається його охолодження до температури 25-30 °С, за якої волога повітря конденсується. Для цього використовується водяний теплообмінник типу «труба в трубі» [17].

Далі відбувається видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора в ресивер. Ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря. Цей процес відбувається в ємності великого об'єму [17].

Після видалення вологи відбувається нагрівання повітря

Очищення повітря на фільтрах тонкого очищення. На підприємствах ферментної промисловості використовується фільтр типу ФТО, всередині якого викладається елемент із гофрованої тканини Петрянова. Така тканина характеризується термостійкістю та механічною міцністю. Ступінь очищення з використанням фільтрів ФТО становить 95 %. Обираємо фільтр ФТО-500, його продуктивність становить 500 м³/год, площа поверхні фільтрації 10 м² та витримує температуру 140 °С [18].

Очищення повітря на фільтрах індивідуального очищення. Для очищення повітря використовується індивідуальний мембранний фільтр Microfluor II. Фільтр виготовляються в вигляді фільтропатронів і капсул.

Фільтр встановлюють перед кожним інокулятором, посівним апаратом та виробничим ферментером і забезпечує очистку повітря від часток діаметром 0,2 мкм. Отримуємо стерильне аераційне повітря зі ступенем очищення – 99%.

Стерилізація фільтра проводиться гострою парою в технологічній обв'язці з ферментатором без вилучення фільтруючих елементів з корпусу фільтра [17].

4.6. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інукуляту і виробничого біосинтезу

Для культивування *Lecanicillium muscarium* використовується поживне середовище наступного складу, г/л:

Сахароза – 20

Пептон – 10

KH_2PO_4 – 2

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1

Всі компоненти поживного середовища для вирощування міцеліального гриба виду *Lecanicillium muscarium* мають бути стерилізовані, проте для запобігання псування органічних субстратів та випадання осадів, що унеможливають їх споживання, компоненти поживного середовища стерилізуються окремими групами з відповідними режимами стерилізації:

Композиція А: сахароза (112°C, 20-30 хв, 0,05 МПа)

пептон (120°C, 20-30 хв, 0,075-0,1 МПа).

Композиція Б: KH_2PO_4 (131°C, 40-60 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (131°C, 40-60 хв, 0,15 МПа).

4.7. Розрахунок кількості реакторів - змішувачів для приготування композицій Б, В для інокулятора об'ємом 500 л.

Композицію Б, готують і стерилізують в окремому реакторі з сорочкою. Після стерилізації її подають в інокулятор. Підбираємо геометричний об'єм реактор-змішувача для композиції Б. При заданому $K_{зб} = 0.5$ приблизний об'єм реактора-змішувача становитиме:

$$V_{Бг} = 50 / 0,5 = 100 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор:

$$V_{рт} = 100 \text{ л}$$

Кількість реакторів:

$$N_p = 100 / 100 = 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зр} = 50/100 \cdot 1 = 0,5$$

Отже, приймаємо до установки 1 реактор та 1 запасний.

Композицію В, готують і стерилізують в окремому реакторі з сорочкою.

Підбираємо геометричний об'єм реактор-змішувача для композиції В. При заданому $K_{зб} = 0.5$ приблизний об'єм реактора-змішувача становитиме:

$$V_{БГ} = 50/0,5 = 100 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор:

$$V_{рГ} = 100 \text{ л}$$

Кількість реакторів:

$$N_{р} = 100/100 = 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зр} = 50/100 \cdot 1 = 0,5$$

Отже, приймаємо до установки 1 реактор та 1 запасний.

Композицію Г, готують і стерилізують в окремому реакторі з сорочкою.

Підбираємо геометричний об'єм реактор-змішувача для композиції Г. При заданому $K_{зб} = 0.5$ приблизний об'єм реактора-змішувача становитиме:

$$V_{БГ} = 50/0,5 = 100 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за об'ємом реактор:

$$V_{рГ} = 100 \text{ л}$$

Кількість реакторів:

$$N_{р} = 100/100 = 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зр} = 50/100 \cdot 1 = 0,5$$

Отже, приймаємо до установки 1 реактор та 1 запасний.

РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведена у *табл. 5.1*.

Таблиця .5.1

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

| Позиція | Найменування | Кількість | Технічна характеристика |
|---------|-------------------------------|-----------|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| ПЗ-1 | Пристрій для забору повітря | 2 | Повітрозабірник, обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень. |
| Ф-2 | Фільтр грубої очистки повітря | 3 | Поліестер, швидкість фільтрування – 2 м/с, Е = 80 %. «Технофільтр» ¹ |
| К-3 | Компресор | 1 | Компресор ERC-60UAL. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа. «Elang» ² |
| Т-4 | Теплообмінник-охолоджувач | 1 | Охолоджувач повітря Systemair PGK. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, вихідна температура повітря 20 °С. «Systemair» ³ |
| Р-5 | Ресивер | 1 | Ресивер Р 900.800.01 Об'єм 900 л, робочий тиск 1 МПа. «Пневмо-комплект» ⁴ |
| Т-6 | Теплообмінник-нагрівач | 1 | Повітренагрівач каналний водяний Systemair VBR. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа, при температурі води 100 °С. «Systemair» ³ |

| | | | | |
|----------------------------------|------|----------------|-------------|------|
| НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | | | |
| Змн. | Арк. | № док.м. | Підпис | Дата |
| Розроб. | | Пашина А.М. | | |
| Перевір. | | Стабніков В.П. | | |
| Реценз. | | | | |
| Н. Контр. | | | | |
| Затверд. | | Пирог Т.П. | | |
| РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ | | | Літ. | Арк. |
| | | | Кафедра БТМ | |

Продовження таблиці 5.1

| | | | |
|---|--|---|--|
| Ф-7 | Головний фільтр очистки повітря | 1 | Фільтр (P)–GSL N. Фільтруючий матеріал – поліпропіленове волокно, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 90 «Технофільтр» ¹ |
| P3-8 | Реактор-збірник | 1 | Реактор-збірник об'ємом 100 л. $K_{зап} = 0,5$ з мішалкою, барботером, пробовідбірником. «Sysbiotech» ⁵ |
| Н-9 Н-13 Н-15 Н-19 Н-21 Н-23 Н-27 Н-29 Н-25 | Насос відцентровий | 9 | Насос асептичний відцентровий. «Авіста» ⁷ |
| ІН-10 | Інокулятор | 1 | Ферментер об'ємом 50 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, турбіною мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5$, сталь нержавіюча. «Sysbiotech» ⁵ |
| Ф-11 Ф-17 Ф-25 Ф-37 | Індивідуальний фільтр очистки повітря | 3 | Скловолокно, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, E = 99%. «Технофільтр» ¹ |
| P3 - 12 | Реактор-збірник для приготування композиції В поживного середовища | 1 | Реактор-збірник об'ємом 100 л, $K_{зап} = 0,5$, оснащений сорочкою, перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. ООО «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.» ⁶ |
| P3 - 14 | Реактор-збірник для приготування композиції Г поживного середовища | 1 | Реактор-збірник об'ємом 100 л, $K_{зап} = 0,5$, оснащений сорочкою, перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. ООО «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.» ⁶ |

Завершення таблиці 5.1

| | | | |
|---------|--|---|--|
| ІН-16 | Інокулятор | 1 | Ферментер об'ємом 500 л, оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, турбіною мішалкою (50-500 об/хв), $K_{зап} = 0,5$, сталь нержавіюча. «Sysbiotech» ⁵ |
| РЗ - 18 | Реактор-збірник для приготування композиції Б поживного середовища | 1 | Реактор-збірник об'ємом 1 м ³ , $K_{зап} = 0,5$, оснащений сорочкою, перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. ООО «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.» ⁶ |
| РЗ - 19 | Реактор-збірник для приготування композиції В поживного середовища | 1 | Реактор-збірник об'ємом 1 м ³ , $K_{зап} = 0,5$, оснащений сорочкою, перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. ООО «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.» ⁶ |
| РЗ - 21 | Реактор-збірник для приготування композиції Г поживного середовища | 1 | Реактор-збірник об'ємом 1 м ³ , $K_{зап} = 0,5$, оснащений сорочкою, перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі 12Х18Н10Т. ООО «ГК ЕВРОХИММАШ К.О.» ⁶ |
| ІН-24 | Інокулятор | 1 | Ферментер об'ємом 5 м ³ , оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, аерліфтною мішалкою $K_{зап} = 0,5$, сталь нержавіюча. «Sysbiotech» ⁵ |

Примітка: підбір обладнання здійснювався з використанням наступних джерел:

1. <http://tehnofilter.com.ua>
2. <http://www.elangcompressor.com/>
3. <https://www.systemair.com/ru/CIS/>
4. <http://pnevmo-c.com.ua>
5. <https://en.sysbiotech.at>
6. <http://euromash.kiev.ua>
7. <http://nasos-ru.ru>

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ВЕРТИЦИЛІНУ

Технологічна схема біосинтезу Вертициліну включає допоміжні роботи (анітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез).

Технологічну схему біосинтезу препарату на основі біомаси *Lecanicillium muscarium* наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину каустичної соди

Для миття обладнання та комунікацій необхідно 20 м³ мийного засобу (див. розд. 2). Робочий розчин каустичної соди (2 %) готують в установці СІР-мийка. Для цього зважують за допомогою об'ємно-вагового дозатора 445 кг каустичної соди та додають 19555 л води.

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину Гембару

Зі складу надходить концентрат Гембару (25 %), який розводять водою до потрібної концентрації (0,5 %). Готують у збірнику об'ємом 800 л. Щоб отримати 560 л (0,5 %) розчину Гембару наливають 24 л 25% Гембару та 536 л водопровідної води і включають перемішуючий пристрій

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

| | | | | | | | | |
|------------------|-------------|-----------------|---------------|-------------|--|-------------|-------------|--------------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | | |
| <i>Змн.</i> | <i>Арк.</i> | <i>№ докум.</i> | <i>Підпис</i> | <i>Дата</i> | РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ВЕРТИЦИЛІНУ | <i>Літ.</i> | <i>Арк.</i> | <i>Архів</i> |
| <i>Розроб.</i> | | Пашина А.М. | | | | | | |
| <i>Перевір.</i> | | Стадніков В.П. | | | | | | |
| <i>Реценз.</i> | | | | | | | | |
| <i>Н. Контр.</i> | | | | | | | | |
| <i>Затверд.</i> | | Пирог Т.П. | | | Кафедра БТМ | | | |

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденне прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. Його проводять у виробничих, лабораторних, підсобних і побутових приміщеннях. При проведенні вологого прибирання використовують 0,5 % робочий розчин Гембар (від ДР 1.1.2).

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання приміщень.

Генеральне прибирання проводять раз у місяць 0,5 %-м робочим розчином «Гембар» (від ДР 1.1.2.). Стіни, двері, стелі, та інші поверхні зрошують з гідропульту 0,5 % розчином Гембару з розрахунку 100 мл/м². Після закінчення зрошення приміщення закривають на 30-40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

ДР 1.3. Підготовка технічного обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття обладнання

Для миття ємнісного обладнання використовують станцію СІР – мийки, питну воду і 2 %-й робочий розчин каустичної соди (від ДР 1.1.1.).

ДР 1.3.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування здійснюють водою, протягом 30 хвилин, для виключення можливості нанесення шкоди здоров'ю персоналу розчином лугу.

ДР 1.3.3. Технічний огляд

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

ДР 1.3.4. Перевірка на герметичність

Після проведення миття, ополіскування та ремонтних робіт перевіряють обладнання на герметичність, для цього в апарат вносять невелику кількість легкої галогенвмісної речовини (дифторхлорметан). Далі закривають усю запірну арма-

туру ємнісного обладнання і подають аераційне повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Потім перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Після закінчення часу витримки звіряють покази манометра, якщо різниця менше 0,01 МПа, то апарат вважають герметичним. При більшому відхиленні за допомогою галогенного течієпошукача починають пошук неущільнень шляхом перевірки усіх місць з'єднань. При наближенні щупа течієпошукача до місця нещільності фіксуються пари галогенвмісної речовини, що засвідчує наявність нещільності. При знаходженні усіх таких місць їх усувають шляхом підтягування різьбових з'єднань або замінюють прокладки. Потім апарат знову перевіряють на герметичність.

ДР 1.3.5. Стерилізація обладнання

Для проведення стерилізації в сорочку апарата подають глуху пару і нагрівають його до $80-90^{\circ}$ С. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через нижній спуск, при цьому обов'язково відкривають вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні температури стерилізації ($130-135^{\circ}$ С) всю запірну арматуру, крім парової, закривають і витримують протягом 1 години. Після завершення витримки парову арматуру закривають, подають в апарат стерильне повітря, а в сорочку холодну воду. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури $30-40^{\circ}$ С і надлишкового тиску $P = 0,003-0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють на висоті 2-3 м від найвищого приміщення за допомогою пристрою для забору повітря.

ДР 2.2. Попереднє грубе очищення

Повітря очищується від грубого аерозолію на фільтрі грубої очистки. Ступінь очищення – 90 %.

ДР 2.3. Компресування повітря

Повітря стискають у компресорі до 0,35 МПа, стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250 °С і збільшення вмісту вологи.

ДР 2.4. Охолодження повітря

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря до температури 25 °С для відведення надлишкової вологи.

ДР 2.5. Видалення зайвої вологи

Повітря подають на ресивер для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ($W = 60\%$).

ДР 2.6. Нагрівання повітря Охолоджене повітря підігрівають до 35 °С для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику.

ДР 2.7. Очищення на головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі. Ступінь очищення – 96%. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

ДР 2.8. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 %.

ДР 3. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Для вирощування інокуляту в колбах на качалці необхідно приготувати 2 л поживного середовища. Як джерело вуглецю в середовище вноситься сахароза, як

джерело азоту – пептон. Вміст компонентів для приготування 2 л поживного середовища наведено у *табл. 6.1*.

Таблиця 6.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2 л середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 2 л середовища, г | Композиція | Об'єм композиції, л |
|---|-------------------|--------------------------------------|------------|---------------------|
| сахароза | 20 | 40 | А | 1,5 |
| пептон | 10 | 20 | | |
| KH_2PO_4 | 2 | 2 | Б | 0,25 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1 | 1 | В | 0,25 |

ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 40 г сахарози. Наважку поміщають у колби, добавляють 1 л питної води, перемішують.

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 20 г пептону. Наважку поміщають у колбу, розчиняють у 500 мл води, перемішують. Розчини об'єднують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 120°C 30 хв за тиску 0,1 МПа.

ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Зважують 4 г KH_2PO_4 . Розчиняють у 250 мл питної води, переносять у колбу. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В.

Зважують 2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Розчиняють у 250 мл питної води, переносять у колбу. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.1.4 Змішування композицій

В стерильних умовах об'єднують стерильні композиції А, Б, В.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 22 л поживного середовища для культивування в інокуляторі.

Для культивування в інокуляторі об'ємом 50 л необхідно приготувати 24 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 2 л, загальна кількість поживного середовища, яку потрібно додати для приготування середовища – 22 л. Вміст компонентів для приготування нл поживного середовища наведено у табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 20 л середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 22 л середовища, г | Композиція | Об'єм композиції, л |
|--------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------|---------------------|
| сахароза | 20 | 480 | А | 15 |
| пептон | 10 | 240 | | |
| KH_2PO_4 | 2 | 48 | Б | 2,5 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1 | 24 | В | 2,5 |

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 480 г сахарози. Додавляють 10 л питної води, перемішують. На технічних вагах у відтарованій

ємності зважують 240 г пептону. Додають 5 л питної води, перемішують. Розчини об'єднують. Стерилізують в автоклаві при температурі 120°C 30 хв за тиску 0,1 МПа.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 48 г K_2HPO_4 . Розчиняють у 250 мл питної води, переносять у колбу. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 24 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Розчиняють у 250 мл питної води, переносять у колбу. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.3. Приготування і стерилізація 226 л поживного середовища для культивування в засівному апараті об'ємом 500 л.

Для культивування в засівному апараті об'ємом 500 л необхідно приготувати 226 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 24 л, загальна кількість поживного середовища, яку потрібно додати для приготування середовища – 202 л. Вміст компонентів для приготування поживного середовища наведено у табл. 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 202 л середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 202 л середовища, кг | Композиція | Об'єм композиції, л |
|---|-------------------|---|------------|---------------------|
| сахароза | 20 | 4,52 | А | 152 |
| пептон | 10 | 2,26 | | |
| KH_2PO_4 | 2 | 0,45 | Б | 25 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1 | 0,23 | В | 20 |

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 4,52 кг сахарози. Добавляють 102 л питної води, перемішують. На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 2,26 кг пептону, 0,45 кг KH_2PO_4 , 0,23 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Добавляють 50 л питної води, перемішують. Стерилізацію здійснюють гострою парою, яка подається через штуцер, в збірнику при температурі 120°C 30 хв за тиску 0,1 Мпа.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,45 кг KH_2PO_4 . Добавляють 25 л питної води, перемішують. Стерилізацію здійснюють гострою парою, яка подається через штуцер, в збірнику при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 0,23 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Добавляють 25 л питної води, перемішують. Стерилізацію здійснюють гострою

парою, яка подається через штуцер, в збірнику при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 МПа.

ДР 3.4. Приготування і стерилізація 2,5 м³ поживного середовища для культивування в ферментері об'ємом 5 м³.

Для культивування в інокуляторі об'ємом 5 м³ необхідно приготувати 2526 л поживного середовища.

Враховуючи, що для засіву інокулятора використовують рідкий посівний матеріал об'ємом 226 л, загальна кількість поживного середовища, яку потрібно додати для приготування середовища – 2,3 м³ л. Вміст компонентів для приготування нл поживного середовища наведено у табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,3 м³ середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 2,3 м ³ середовища, кг | Композиція | Об'єм композиції, л |
|--------------------------------------|-------------------|--|------------|---------------------|
| сахароза | 20 | 50,5 | А | 1800 |
| пептон | 10 | 25,26 | | |
| КН ₂ РО ₄ | 2 | 5,05 | Б | 250 |
| МgSO ₄ *7H ₂ O | 1 | 2,53 | В | 250 |

ДР 3.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

За допомогою об'ємно-вагового дозатора зважують 50,5 кг сахарози. Наважку переносять в попередньо простерилізований ферментер, додають 1800 л питної води, перемішують. На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 25,26 кг пептону, додають в розчин. Стерилізацію здійснюють гострою парою в

ферментері, яка подається через нижній патрубок апарату. Процес відбувається при температурі 120°C 30 хв за тиску 0,1 Мпа.

ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 5,05 кг K_2HPO_4 . Розчиняють у 250 л. очищеної води. Стерилізацію здійснюють гострою парою, яка подається через барботер, в збірнику при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 Мпа. Розчин за допомогою насоса перекачують у попередньо простерилізований ферментер.

ДР 3.4.4. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у відтарованій ємності зважують 2,53 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Розчиняють у 250 л. очищеної води. Стерилізацію здійснюють гострою парою, яка подається через барботер, в збірнику при температурі 131°C, 40-60 хв за тиску 0,15 Мпа. Розчин за допомогою насоса перекачують у попередньо простерилізований ферментер.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП 4.1. Підтримання колекційної культури

Вирощену за оптимальних умов культуру міцеліального гриба *Lecanicillium muscarium* зберігають у вигляді спор при +4-8°C.

Для збереження фізіолого-біохімічних властивостей штаму здійснюють пересіви (раз на 2 роки). [18] Всі роботи з колекційною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

ТП 4.2. Одержання робочої культури з колекційної

Колекційну культуру, що зберігається у вигляді вегетативних клітин на скошеному вередовищі, розсівають на чашки Петрі. Змиви розсівають у пробірки зі скошеним середовищем Сабуро. Вирощують при температурі 25-27°C упродовж 24 год.

ТП 4.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 2 л в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 3.1.1), розчин композиції Б (від ДР 3.1.2), та В (від ДР 3.1.3) . Перемішують і розливають в 3 стерильних колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Lecanicillium muscarium*, вирощеною на агаризованому середовищі Сабура, вносять 10 мл стерильної питної води, за допомогою петлі суспендують конідії і піпеткою в асептичних умовах вносять у колбу з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують спори, одержані з однієї пробірки.

Після вирощування грибів у колбах на качалці (240 об/хв) впродовж 24 год при 25-27°C, культуральну рідину в асептичних умовах з колб переносять в засівну колбу об'ємом 2л.

ТП 4.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л.

В інокулятор об'ємом 50 л з попередньо простерилізованою композицією А (від ДР 3.2.1.) в асептичних умовах вносять стерильний розчин композиції Б (від ДР 3.2.2), В (від ДР 3.2.3) та перекачують посівний матеріал із засівної колби через патрубок відкривши вентиль (від ТП 2.3) і вмикають перемішуючий пристрій. Інокулятор обладнаний механічною системою піногасіння. Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 25-27 °С, тривалість – 24 год. Після закінчення культивування культуральну рідину перекачують за допомогою труби перетискання в інокулятор об'ємом 450 л.

ТП 4.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л.

В інокулятор об'ємом 500 л з попередньо простерилізованою композицією А (від ДР 3.3.1) в асептичних умовах за допомогою насоса перекачують стерильного розчину композиції Б (від ДР 3.3.2) та В (від ДР 3.3.3), а за допомогою труби перетискування – посівний матеріал (від ТП 2.4.) і вмикають перемішуючий пристрій. Посівний апарат обладнаний механічною системою піногасіння. Температура вирощування посівного матеріалу в інокуляторі – 25-27 °С,

тривалість – 24 год. Після закінчення культивування культуральну рідину переносять в інокулятор об'ємом 5000 л через трубу перетискання.

ТП 5. Біосинтез

ТП 5.1. Виробниче культивування

В попередньо простерилізований ферментер об'ємом 5 м³, який містить розчин композиції А (від ДР 3.4.1) в асептичних умовах за допомогою насоса перекачують розчин композиції Б (від ДР 3.4.2) та В (від ДР 3.4.2), а за допомогою труби перетискування – посівний матеріал (від ТП 2.6) і вмикають перемішуючий пристрій. Перемішуючим пристроєм слугує аерліфтна мішалка, якою обладнаний ферментер. Ферментер обладнаний механічною системою піногасіння. Тривалість виробничого культивування становить 120 годин при температурі 25-27 °С за рН 4,1 – 5,8, значення якого корегувати не потрібно.

Процес біосинтезу завершують, коли концентрація спор становить $6,8 \cdot 10^7$ спор/л, і культуральна рідина передається на стадію очищення.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю

7.2. Мікробіологічний контроль

Незалежно від способу культивування, з моменту засіву продуцентом стерильного поживного середовища ведеться контроль за ростом культури і спороутворенням [19].

Мікробіологічний контроль передбачає: забезпечення і підтримання умов, необхідних для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів-продуцентів; контроль виробничого процесу та готової продукції; своєчасне виявлення контамінації та встановлення джерела її появи [22].

Протягом вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу відбирають кожні 8 годин проби культуральної рідини для аналізу. Відібрані проби мікроскопіюють і візуально оглядають. З метою виявлення можливих заражень здійснюється періодичний посів проб на чашки Петрі з агаризованими середовищами [19].

Культуральну рідину розсівають газonom (0,1 мл на чашку) до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПа) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) чи агаром Чапека з глюкозою – для виявлення дріжджів і грибів [19].

При відсутності контамінації на агаризованому середовищі Чапека з глюкозою колонії *Lecanicillium muscarium* будуть мати такий вигляд: жовтувато-білі колонії діаметром 18-22 мм. Повітряний міцелій добре розвинений, пишній, пухнастий. Насичено-жовтий реверс. Радіальна складчастість і зональність у колоній практично не виражена.

| | | | | | | | | |
|-----------|------|----------------|--------|------|--------------------------------|------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.02 КР ПЗ | | | |
| Змн. | Арк. | № докum. | Підпис | Дата | РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА | Літ. | Арк. | Акрцшів |
| Розроб. | | Пашина А.М. | | | | | | |
| Перевір. | | Стабніков В.П. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Пирог Т.П. | | | Кафедра БТМ | | | |

Для мікроскопіювання використовують препарати «роздавлена крапля». Для приготування препарату у вигляді «роздавленої краплі» на середину чистого предметного скла нанести маленьку краплю води, перенести в неї невелику кількість культуральної рідини, перемішати, накрити покривним склом і мікроскопіювати. Мікроскопіювання здійснюють зі збільшенням 40х.

В полі зору спостерігають безбарвний, багатоклітинний, розгалужений міцелій. Гіфи гриба тонкі, прозорі, септовані, від них відходять конідієносці з фіалід, на яких утворюються конідії. Фіаліди голкоподібні, загострені, розташовані поодинокі чи групами [11].

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація цільового продукту

Цільовим продуктом є біомаса продуценту. Цей метод широко застосовують для оцінки росту мікроорганізмів в рідких живильних середовищах. Метод не може бути використаний при культивуванні мікроорганізмів на середовищах, до складу яких входять з'єднання, не розчинні у воді. Визначення біомаси складається з трьох послідовних операцій:

- доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення,
- відділення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини,
- визначення їх маси.

Найчастіше визначають масу сухих клітин, хоча іноді можна обмежитися визначенням сирої біомаси. У останньому випадку перший етап відпадає; достатньо тільки зважити центрифужну пробірку (фільтр), але не доводити її масу до постійного значення.

Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення. З цією метою фільтри, заздалегідь встановлені у відкриту чашку Петрі, або центрифужні пробірки поміщують в сушильну шафу і висушують протягом 1—2 год. при температурі 80—85°C і 90—100°C відповідно. Потім чашку Петрі з

фільтрами або центрифужні пробірки виймають з сушильної шафи і переносять в ексикатор з безводним хлористим кальцієм (CaCl_2) або концентрованою сірчаною кислотою. Ексикатор ставлять біля аналітичних вагів, на яких проводитиметься зважування. За годину фільтри (центрифужні пробірки) зважують з точністю до 0,0001 г. Висушування і зважування повторюють, дотримуючи вказану послідовність операцій, поки маса не досягне постійного значення, тобто коливання в її визначеннях не перевищать $\pm 0,0001$ г. Відділення мікроорганізмів від середовища можливе центрифугуванням або фільтруванням. Центрифугуванням відділяють звичайно бактерії. Міцелій актиноміцетів і грибів відділяють фільтруванням. Паперовий фільтр поміщають в скляну воронку і фільтрують через нього точний об'єм культури, від 5 до 10 мл. Осад на фільтрі багато разів промивають підкисленою дистильованою водою. Для відділення бактерій використовують мембранні фільтри. Розміри пор мембранного фільтру повинні бути менше величини клітин, біомасу яких визначають. Мембранний фільтр поміщають на пористу пластинку спеціального утримувача, вставленого в колбу. Щоб прискорити фільтрування, колбу підключають до водоструменевого насоса. Осад кілька разів промивають підкисленою дистильованою водою.

7.3.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Джерелом азоту в середовищі для культивування *Lecanicillium muscarium* є пептон, до складу якого входить азот в амінній формі.

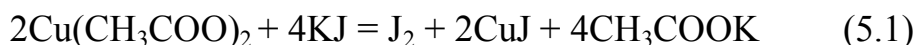
Концентрацію азоту визначають у супернатанті, який одержують центрифугуванням культуральної рідини *Lecanicillium muscarium* при 3000 об/хв протягом 20 хв, для видалення біомаси, мідним методом.

В основі методу лежить здатність амінокислот утворювати розчинні з'єднання з міддю, кількість якої визначають йодометричним титруванням.

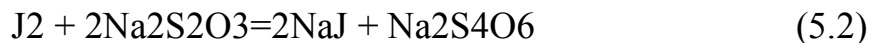
Суть методу полягає в тому, що до слабо лужного розчину амінокислот додають надлишок суспензії ортофосфату міді $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ у боратному буферному

розчині. При цьому утворюються розчинні мідні з'єднання. Для їхнього відділення від нерозчинного ортофосфату міді суміш фільтрують. Потім до фільтрату прибавляють оцтову кислоту, яка відщеплює мідь від комплексного з'єднання і перетворюється в ацетат міді [17].

Для визначення кількості міді, яка брала участь в реакції, до розчину добавляють йодид калію:



В результаті реакції виділяється йод в кількості, еквівалентній кількості міді, а відповідно, і азоту амінокислот, який відтитровують розчином тіосульфату натрію:



1 мл 0,01 н розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного азоту, оскільки один атом міді реагує з двома молекулами амінокислот, утворюючи з'єднання типу $\text{Cu}(\text{RCHNH}_2\text{COO})_2$ [27].

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

10 мл абсолютно прозорого фільтрату піпеткою переносять в фарфорову чашку або конічну колбу, добавляють 0,5 мл 80 %-ї оцтової кислоти (підкислюють) і 10 мл розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують із мікробюретки розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л. В кінці титрування до розчину додають 1-2 краплини розчину крохмалю. Кінець титрування визначають по зникненню синього забарвлення від однієї краплі тіосульфату натрію [17].

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

$$X = \frac{a \cdot 0,28 \cdot 6 \cdot 10 \cdot 100}{50} \quad (5.3)$$

де a – кількість розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, витраченого на титрування, л ; b – об'єм дослідної рідини, взятий на аналіз, л [17].

Джерелом вуглецю в середовищі для культивування *Lecanicillium muscarium* є сахароза.

Концентрацію сахарози визначають у супернатанті полярометричним методом.

Складовими частинами портативного поляриметра П-161М є: джерело світла, світлофільтр, поляризатори, трубка з розчином оптично-активної речовини, аналізатор, шкала, окуляр.

Шляхом переміщення окуляра та освітлювача – лампи потужністю не менше 40 Вт або денного світла — домагаються максимальної і рівномірної освітленості поля зору в окулярі.

Нульовий відлік аналізатора визначають із трубкою, що заповнена дистильованою водою так, щоб не потрапило повітря, бульбашки якого викликають у полі зору появу темних плям. Для цього трубку, тримаючи вертикально, заповнюють так, щоб утворився опуклий меніск, потім обережно збоку насувають сухе покривне скло і нагвинчують притискувальну обойму. Наповнену трубку обтирають ззовні фільтрувальним папером і вміщують у жолобок поляриметра. Обертанням оправ окуляра встановлюють різке зображення лінії поділу поля зору.

Обертанням кільця домагаються рівності освітлення лівої і правої частин поля зору.

Відлік показань по шкалі ведуть за допомогою ноніуса. Якщо при однаковій освітленості поля нуль шкали не збігається з нулем ноніуса, то різниця, тобто відлік за шкалою, у цьому випадку являє собою інструментальну поправку α_{II} . Знак поправки вважають позитивним, якщо нуль ноніуса розташований у позитивному напрямку від нуля шкали. Дійсні кути обертання отримують відніманням інструментальної поправки (з її знаком) із отриманих результатів.

Наповнюють поляриметричну трубку досліджуваним розчином і вимірюють кут обертання.

Після заповнення трубки виміри проводять через 2-3 хвилини, тому що коливання часток рідини заважає дослідженню.

Готують стандартні розчини вуглеводу, наприклад з масовою часткою розчиненої речовини 2,5 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %.

Встановлюють нульове положення у поляриметрі.

Трубку приладу заповнюють стандартним розчином (без пухирів повітря), накривають шліфувальним скельцем, загвинчують щільно, насухо витирають і вміщують в поляриметр. При зміні кольору або інтенсивності освітлення частини поля зору обертанням диска зрівнюють поля і визначають кут відхилення поляризованого променя, що виражається в градусах шкали приладу. За довжини трубки 18,94 см кут відхилення в 1^0 відповідає концентрації з масовою часткою сахарози 1%, якщо довжина трубки 9,47 см, то отримані результати помножуються на 2, якщо довжина 4,73 см, то множать на 4.

За даними вимірів стандартних розчинів будують залежність кута обертання площини поляризації від концентрації вуглеводню.

Готують 2-3 розчини сахарози з відомою концентрацією для відпрацювання методики. Вимірюють кут обертання, за графіком визначають концентрацію розчиненої речовини і знаходять відносну похибку вимірів. Якщо похибки вимірів більше 5%, перевіряють лінійну залежність кута обертання площини поляризації від концентрації сахарози.

Наповнюють поляриметричну трубку досліджуваним розчином, вимірюють кут обертання і за графіком визначають концентрацію. [24]

7.4. Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1.

| Номер контрольної точки та назва стадії | Об'єкт контролю та показник, що визначається | Засоби та методи контролю | Періодичність перевірки та відбору проб | Нормативні значення показника, що визначається |
|---|---|---|--|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Кх 1.2.1. Приготування розчину Соліклору | Розчин «Соліклору»: концентрація | Йодометричне титрування | Одразу після приготування | C = 0,06% |
| Кх 1.2.2. Приготування розчину каустичної соди | Розчин каустичної соди: концентрація | Фотоколориметр | Одразу після приготування | C ₁ = 0,5%; C ₂ = 2% |
| Кх, Кт 1.4.1. Миття обладнання | Робочий розчин: концентрація, температура; час миття | Термометр технічний, годинник | Температура визначається безперервно | C = 2%; T = 55±5 °C; τ = 20 хв |
| Кх 1.4.2. Ополіскування | Чистота обладнання | Хімічний метод | Одразу після завершення процедури | Відсутність залишків м'якого розчину |
| Кт, Км 1.4.3. Стерилізація обладнання | Чистота обладнання та комунікацій: температура тиск та час стерилізації | Манометр, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль. | Тиск та температура визначаються безперервно, мікробіологічний контроль після завершення процедури | P = 0,12-0,18 МПа; τ = 2 год; T = 100 °C; відсутність мікробіоти |
| Кт 1.4.4. Перевірка на герметичність | Герметичність обладнання, тиск, час перевірки | Манометр, годинник | Тиск визначається безперервно під час перевірки | P = 0,05-0,07 МПа; τ = 30 хв |

Продовження табл. 7.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--|--|--|---|
| Кт, Км 3.1.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 30$ хв; $P = 0,05$ МПа; $T = 120$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції В | Композиція В: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 30$ хв; $P = 0,05$ МПа; $T = 120$ °С; відсутність мікробіоти |

Продовження табл. 7.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--|--|--|---|
| Кт, Км 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції В | Композиція В: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.3.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 30$ хв; $P = 0,05$ МПа; $T = 120$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |

Продовження табл. 7.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--|--|--|---|
| Кт, Км 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції В | Композиція В: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції А | Композиція А: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 30$ хв; $P = 0,05$ МПа; $T = 120$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б | Композиція Б: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції В | Композиція В: температура, тиск, час стерилізації, стерильність | Термометр технічний, манометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після завершення стадії | $\tau = 50$ хв; $P = 0,15$ МПа; $T = 131$ °С; відсутність мікробіоти |

Продовження табл. 7.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--|--|--|--|
| Кт, Км 4.1. Підтримання колекційної культури | Посівний матеріал: температура, мікробіологічна чистота, частота пересівів | Термометр, мікробіологічний контроль | Температура контролюється безперервно під час вирощування; мікробіологічний контроль після кожного пересіву | $T = 3-4^{\circ}\text{C}$; відсутність сторонньої мікробіоти; $\tau = 3-4$ місяці |
| Кт, Км 4.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах | Посівний матеріал, температура, тривалість культивування, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура контролюється безперервно під час культивування; мікробіологічний контроль після завершення стадії | $T = 30^{\circ}\text{C}$; $\tau = 48$ год; відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кт, Км 4.3. Вирощування культури в колбах на качалках | Посівний матеріал, температура, час культивування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль | Температура і швидкість обертання контролюються безперервно під час культивування; мікробіологічний контроль після завершення стадії | $T = 30^{\circ}\text{C}$; $\tau = 18$ год; $\omega = 220$ об/хв; відсутність сторонньої мікробіоти |

Продовження табл. 7.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--|---|---|--|
| Кх, Кт, Км 4.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 50 л | Поживне середовище, посівний матеріал, рН, температура, час культивування, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, рН-метр, годинник, тахометр, витратомір, мікробіологічний контроль | Температура, рН, швидкість обертання мішалки контролюються безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після завершення стадії | T = 30 °C; рН = 5,4; τ = 20 год; ω = 400 об/хв; L = 40 л/хв; відсутність сторонньої мікробіоти |
| Кх, Кт, Км 4.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,5 м ³ | Поживне середовище, посівний матеріал, рН, температура, час культивування, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, рН-метр, годинник, тахометр, витратомір, мікробіологічний контроль | Температура, рН, швидкість обертання мішалки контролюються безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після завершення стадії | T = 30 °C; рН = 5,4; τ = 20 год; ω = 400 об/хв; L = 400 л/хв; відсутність сторонньої мікробіоти |

Продовження табл. 7.1

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|--|---|---|---|
| Кх, Кт, Км 5.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 5 м ³ | Поживне середовище, посівний матеріал, рН, температура, час культивування, частота обертів мішалки, кратність подачі повітря, мікробіологічна чистота культури | Термометр технічний, рН-метр, годинник, тахометр, витратомір, мікробіологічний контроль | Температура, рН, швидкість обертання мішалки контролюються безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після завершення стадії | T = 30 °C; рН = 5,4; τ = 40 год; ω = 400 об/хв; L = 40 л/хв; відсутність сторонньої мікробіоти |

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вертицилін [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://cherkasybiozakhyst.com/vertitsilin/p93>
2. Тепличная белокрылка (*Trialeurodes vaporariorum*) — Экокультура [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://ecoculture.biz/trialeurodes-vaporariorum.html>
3. Why the whitefly is such a formidable threat to food security [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://phys.org/news/2016-12-whitefly-formidable-threat-food.html>
4. Whitefly Damage and Control [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.cannagardening.com/whitefly_damage_and_control
5. Whitefly management in Tomato: Training course guide [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://avrdc.org/download/publications/manuals/Whitefly-management-in-tomato_South-Asia.pdf
6. Scientists unraveling secrets of the whitefly [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.farmprogress.com/crop-disease/scientists-unraveling-secrets-whitefly>
7. *Lecanicillium muscarium* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/lecanicillium-muscarium>
8. Патент RU 2598251: Штамм гриба *lecanicillium muscarium*, обладающий инсектоакарицидной и антибиотической активностью для борьбы против сосущих вредителей, грибных и бактериальных болезней [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.findpatent.ru/patent/259/2598251.html>
9. Патент RU 2651487: Способ получения биопестицидного препарата [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.findpatent.ru/patent/265/2651487.html>

10. Патент RU 2035144: Способ получения энтомопатогенного препарата [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.freepatent.ru/patents/2421995>

11. Рост штаммов *Lecanicillium Muscarium* на агаризованных средах с различными источниками углеводов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://moluch.ru/archive/89/18385/>

12. Способи культивування мікроорганізмів [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/5193874/page:14/>

13. Оптимізація складу живильних середовищ для культивування продуцентів біологічно активних речовин, способи культивування. Мікробіологічний контроль ефективності методів стерилізації. Методи очищення кінцевих продуктів біотехнологічних виробництв. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://knowledge.allbest.ru/biology/3c0b65625a2bc78a5d43a88521216c27_1.html

14. Патент RU 2120756: Штамм гриба *verticillium Iecanii* для получения акарицидного и энтомопатогенного препарата [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://findpatent.ru/patent/212/2120756.html>

15. Глибинне культивування мікроорганізмів у виробничих умовах [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://studopedia.org/6-21632.html>

16. Синицын А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. / А. П. Синицын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов – М. :Изд-во МГУ, 1995. – 224с.

17. *Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е.* Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.

18. Про затвердження Порядку одержання, обліку, зберігання та утримання тест-штамів мікроорганізмів для проведення контролю якості лікарських засобів за мікробіологічними показниками [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0473-04>

19. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вик. лаб. практикуму студ. заоч. форми навчання напряму підготовки 6.051701 «Харчові

технології та інженерія» спец. «Технологія продуктів бродіння і виноробства» / Укл.: А.М. Куц, М.В. Бондар, Ю.В. Булій. – К.: НУХТ, 2011. – 53 с

20. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів : Метод. Рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. / Уклад.: *Т. П. Пирог, А. П. Софілканич*, – К.: НУХТ, 2011. – ст 1-23.

21. *Пирог Т.П.* Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. І перероб.- К.: НУХТ., 2010. – 632с.

22. *Пирог Т.П , Софілканич А.П. , Конон А.Д.* Загальна мікробіологія і вірусологія : Метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. Напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден.форм.навч.- К.: НУХТ,2011-26с.

23. *Пирог Т. П.* Загальна біотехнологія: К.: НУХТ, 2009. – 336 с.

24. Поляриметричний метод аналізу [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://studfiles.net/preview/5064260/page:13/>

25. Перец – технологія вирощування [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://agrolife.ua/blog/perets-tekhnologiya-vyrashchivaniya/>

26. Методичні вказівки до лабораторних робітз дисципліни «Промислова та екологічна біотехнологія» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/5-8-lb11.pdf>