



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

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

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 04 ” квітня 2022 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВОДЯНИЦЬКА Анастасія Андріївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Rhizobium meliloti* для виробництва Різобіну

керівник роботи БУЦЕНКО Людмила Миколаївна, к.б.н.  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент – *Rhizobium meliloti*, цільовий  
продукт – різобін, розраховано та вибрано ферментаційне обладнання  
номінальним об'ємом 1 м<sup>3</sup> та з коефіцієнтом заповнення 0,6

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

Підібрати ефективний штам *Rhizobium* для виробництва різобіну.

Запропонувати склад поживного середовища для культивування обраного  
штаму для зниження ризику контамінації при тривалому зберіганні  
препарату.

Оптимізувати метод отримання сухої форми препарату.

Розробити принципову технологічну та апаратурну схеми виробництва  
препарату сухого різобіну.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва Різобіну – 2 аркуші формату А1,

Апаратурна схема виробництва різобіну – 2 аркуші формату А1,

## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022	
2	Характеристика біологічного агенту	15.04.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування	28.04.2022	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	08.05.2022	
5	Специфікація обладнання	20.05.2022	
6	Опис технологічної схеми	27.05.2022	
7	Контроль виробництва	01.06.2022	

**Здобувач** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Анастасія ВОДЯНИЦЬКА**  
(ім'я та прізвище)

**Керівник роботи** \_\_\_\_\_  
(підпис)

**Людмила БУЦЕНКО**  
(ім'я та прізвище)

## **ЗМІСТ**

<b>РЕФЕРАТ</b>	6
<b>ВСТУП</b>	7
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</b>	9
<b>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</b>	12
2.1. Морфолого-культуральні ознаки	14
2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки	14
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	15
2.4. Поширення в природі	15
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ</b>	18
3.1. Потреба в цільовому продукті	18
3.2. Розрахунок річної потреби	19
3.3. Розрахунок потужності виробництва Різобіну	19
3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері	21
3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 1 м <sup>3</sup>	22
3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 100 л	22
3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л	23
3.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці	24
<b>РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	25
4.1. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	25
4.1.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання	26
4.1.2. Виділення цільового продукту з супернатанту	27
4.1.3. Вибір способу сушіння та сушарки	29

4.2. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	33
4.3. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря	34
4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	34
4.5 Особливості підготовки та стерилізація поживного середовища	40
<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b>	<b>42</b>
<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</b>	<b>47</b>
<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</b>	<b>53</b>
7.1. Визначення ефективності штаму	53
7.2. Визначення концентрації біомаси	54
7.2.1. Визначення кількості життєздатних клітин продуцента	54
7.3. Визначення біомаси	55
<b>ВИСНОВОК</b>	<b>57</b>
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ</b>	<b>58</b>

## РЕФЕРАТ

Робота присвячена удосконаленню типової технології виготовлення препарату ризобіну для збільшення ефективності його використання. запропоновано в якості продуцента використовувати *Rhizobium meliloti*, отриманий у результаті селекції найбільш ефективних варіантів популяції із культури *Rhizobium meliloti*, що характеризується високим рівнем азотфіксації.

Запропоновано оптимізоване середовище культивування та спосіб отримання сухого препарату ризобіну, що забезпечують підвищення ефективності його використання.

Розраховано та вибрано ферментаційне обладнання номінальним об'ємом 1000 л та з коефіцієнтом заповнення 0,6, що дозволяє забезпечити необхідні параметри культивування та розраховану річну продуктивність препарату на рік. Наведено технологічний, конструктивний та гідравлічний розрахунки ферментаційного апарату з механічним перемішуючим пристроєм та барботером. В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

Ключові слова: бактеріальні добрива, ризобін, асоціативні азотфіксатори, *Rhizobium meliloti*, азотфіксація, поживне середовище, ферментаційний апарат, процес біосинтезу.

## ВСТУП

Україна є одним з головних постачальників зернових культур на світовий ринок. Цьому сприяють природно-кліматичні умови країни та розвиток сільського господарства. На сьогодні біологічне землеробство є невід'ємною частиною аграрного сектору нашої держави.

Застосування препаратів на основі корисних мікроорганізмів покращують живлення рослин, сприяють засвоєнню азоту та фосфору, що впливає на урожайність культур та якість продукції. Азотофіксуючі мікроорганізми як основа біопрепаратів є важливим чинником поліпшення азотного живлення рослин та азотного фону ґрунту в цілому. Діазотрофи можуть замінити частину азоту мінеральних добрив, а отже, ми отримуємо на порядок дешевший і екологічно безпечний біологічний азот.

Вивчення впливу азотофіксувальних мікроорганізмів на мікробний ценоз ризосфери інокульованих рослин дозволить більш широко уявляти і розуміти закономірність взаємодії аборигенної мікрофлори з біоагентами мікробних препаратів. Важливим аргументом на користь застосування біопрепаратів є те, що вони екологічно безпечні та мають порівняно низьку вартість, проте їх ефективність значною мірою залежить від культури землеробства.

Біологічний захист рослин ґрунтується на системному підході і комплексній реалізації двох основних напрямків: збереження і сприяння діяльності природних популяцій корисних видів (ентомофагів, мікроорганізмів), самозахисту культурних рослин в агробіоценозах та поновлення агробіоценозів корисними видами, яких не вистачає або які відсутні. Принциповою відміною біологічного методу захисту рослин від будь-якого іншого, є використання саме першого напрямку, який здійснюють, застосовуючи біологічні препарати, способами сезонної колонізації, інтродукції та акліматизації зоофагів і мікроорганізмів. Розмноженню й ефективності діяльності корисних видів сприяють

агробіотехнічні заходи, та деякі способи обробітку ґрунту за допомогою яких, можна створювати сприятливі умови для життєдіяльності зоофагів.

Вирощування стійких до шкідливих організмів сортів культурних рослин сприяє формуванню мало-життєздатних популяцій шкідників.

Фіксація молекулярного азоту з повітря біологічним шляхом – процес зв'язування і засвоєння азоту мікроорганізмами. Цей процес має важливе практичне значення, оскільки промислове виробництво хімічних азотних добрив потребує значних затрат енергоресурсів і є небезпечним з екологічної точки зору. Створення і використання біопрепаратів на основі азотфіксуючих мікроорганізмів – найефективніший спосіб підвищення продуктивності рослин та якості урожаю, що дозволяє зберегти приподну родючість ґрунту та екологічну рівновагу довкілля.

Тому метою роботи є удосконалення типової технології виготовлення препарату різобіну для збільшення ефективності його використання. У відповідності до мети були визначені наступні задачі:

1. Підібрати ефективний штам *Rhizobium* для виробництва різобіну.
2. Запропонувати склад поживного середовища для культивування обраного штаму для зниження ризику контамінації при тривалому зберіганні препарату.
3. Оптимізувати метод отримання сухої форми препарату.
4. Розробити принципову технологічну та апаратурну схеми виробництва препарату сухого різобіну.

Новизною даного проєкту є удосконалення типової технології за рахунок модифікації складу поживного середовища та оптимізації методу отримання сухого препарату різобіну, що дозволяє підвищити життєздатність бактерій при висушуванні, а, отже, і збільшити його ефективність. Також обґрунтування самого препарату, який можна було б застосовувати для підвищення врожайності сільськогосподарських культур і водночас запобігати забрудненню навколишнього середовища синтетичними сполуками.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Різобін – високоефективний бактеріальний препарат на основі комплементарних симбіотичних азотфіксувальних бактерій роду *Rhizobium* [1], *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* [2] та *Bradyrhizobium* [3] нешкідливих для людини і тварин. Вперше мікроорганізм з корневих бульбочок бобових виділив і отримав в культурі нідерландський учений Бейерінк в 1888 році. Він назвав його *Bacillus radicolica*, і зараз, в Довіднику Берджи з бактеріологічної систематики він відноситься до роду *Rhizobium*.

Ефективність препарату визначається здатністю бактерій, на основі яких він виготовлений, фіксувати азот атмосфери, покращувати мінеральне живлення рослин, забезпечувати їх біологічно активними речовинами (вітамінами, фітогормонами, амінокислотами та ін.), підвищувати урожайність і якість рослинницької продукції.

Бактерії роду *Rhizobium* колонізують клітини кореня рослини, утворюючи кореневі бульби. В умовах зі зниженим вмістом кисню, вони перетворюють атмосферний азот в аміак, забезпечуючи рослині доступ до органічного азоту в формі глутаміну або уреїдів. В обмін рослина постачає бактеріям цукор, який утворився в ході фотосинтезу, і тим самим забезпечує їм анаеробні умови.

Препарат призначений для передпосівної обробки насіння бобових культур (сої, гороху, люцерни, люпину, козлятника, лядвенця, буркуна, вики, кормових бобів, конюшини).

Випускають Різобін у рідкому вигляді - розфасованим у пляшки, а також на торфї та інших носіях у сухому вигляді - розфасованим у поліетиленові пакети. Термін зберігання - 1-2 місяці при температурі 5-15 °С.

ЗМ	Арк.	№	Підп	Дата	НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ		
Розробник	Водяницька	18			Літ.	Аркуш	Аркушів
Керівник	Буценко					9	60
Н. кантр					Кафедра БТМ		
Консульт							
Заб. каф.	Лтадніков						

В даній роботі розглядається сухий різобін – препарат бактерій штаму *Rhizobium meliloti*, що підвищує урожайність зеленої маси люцерни. Така форма препарату є зручною та ефективною.

Сухим різобіном насіння опилують, тобто цей процес можна механізувати. Також при отриманні препарату сухого різобіну використовують ліофільний спосіб висушування бульбочкових бактерій, що дозволяє довгий час зберігати життєздатність клітин.

Кінцевий продукт виробництва – біомаса бактерій, адсорбована на носії – бентоніті. Готовий препарат має вигляд однорідного порошку від світло-сірого до коричневого кольору.

За сучасною класифікацією біотехнологічної продукції, товарів та послуг нітрагін можна віднести до продуктів агробіотехнології, а саме до групи біодобрив.

В свою чергу, хочу додати, що здатність бактерій з роду *Rhizobium* фіксувати атмосферний азот і утворювати стійкий симбіоз з рослинами давно привертав увагу вчених. Зараз активно ведуться дослідження зі створення нових видів рослин, здатних вступати в симбіоз з цими бактеріями. Таке відкриття допомогло б підвищити продуктивність рослин без використання азотних добрив. У дослідження включається генетичне картування різних видів *Rhizobium* і їх рослин-господарів, таких як соя та люцерна посівна

Передпосівну обробку насіння бобових культур Різобіном здійснюють напередодні або в день посіву. Насіння обприскують, перемішують (вручну або в машинах для протруювання, очищених від ядохімікатів) і злегка підсушують на повітрі, уникаючи прямої дії сонячного проміння. Гектарна порція препарату становить 100-200 мл. Для обробки відповідної партії насіння вказану дозу препарату розводять водою кімнатної температури до загального об'єму 1,5-2,0 л. При виконанні правил застосування бактеріального добрива і технології вирощування бобових Різобін забезпечує збільшення урожаю зерна на 10-20 % при одночасному підвищенні білку у зерні [4].

## РОЗДІЛ 2

### ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Різобін - високоефективний препарат на основі комплементарних симбіотичних азотфіксуючих бактерій. родів *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* – види яких наведено в порівняльній таблиці 2.1.

*Rhizobium meliloti* – даний мікроорганізм зв'язує молекулярний азот. Має найпростіший склад поживного середовища але на відміну від інших має найбільшу концентрацію біомаси. Також умови культивування складають всього 2 години, що свідчить про порівняно дешеву вартість поживного середовища.

*Sinorhizobium meliloti* - також як і *R. Meliloti* зв'язує молекулярний азот, але має дорожчий склад поживного середовища, найбільшу концентрацію біомаси та довші умови культивування.

*Bradyrhizobium japonicum* – має показник умов культивування – 2 доби, але умови культивування при найбільшій температурі в порівняно з *R. Meliloti* та *S. Meliloti*.

					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ		
ЗМ	Арк.	№	Підп	Дата			
Розробник	Водяницька	ІС			Літ.	Аркуш	Аркушів
Керівник	Буценко					12	60
Н. контр					Кафедра БТМ		
Консульт							
Заб. каф.	Стадніков						
РОЗДІЛ 2							
11							

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Умови культивування	Література
<i>Rhizobium meliloti</i>	Триптон - 10; NaCl – 8; Дріжджовий екстракт 10; Глюкоза – 1; MgCl - 50; CaCl <sub>2</sub> – 20.	6	2 год, 12°C	Клонирование генома <i>Rhizobium meliloti</i> в векторах различного типа Т. Б. Румянцева, В. Н. Ерко\ Б. В. Симаров Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии 189620, Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> — 0,5; MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O — 0,2; NaCl — 0,1; CaCO <sub>3</sub> — сліди, казамінокислоти, або гідролізат лактоальбуміну — 0,1 %; маніт — 10,0; агар — 17,0; дистильована вода.	7	5 діб, 25°C	ISSN 2308-7099. Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 6 Н.А Воробей, С.Я. Коць 576.871.155.557
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	глюкози – 10; порошкових дріжджів - 0,8; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - 0,2; K <sub>2</sub> HPO- 0,8; NaCl - 0,1; CaCl <sub>2</sub> - 0,01; 4 мл/л розчину Rh.	6	2 доби, 28 °C	Liu Baoping, Zhou Junchu.Study on rhizobium inoculant. Hubei Agricultural Sciences. 2006; 45(1): 57–60.

## 2.1. Морфолого-культуральні ознаки

*Rhizobium meliloti* – грамнегативна, азотофіксувальна бактерія.

Штам *Rhizobium meliloti* - це дрібні грамнегативні палички розміром від 0,6-0,7 до 1,3-1,6мкм, у молодому віці цей штам є дуже рухливим, але при старінні втрачає свою рухливість, має перитрихіальні джгутики, утворюють бактероїди. Культура швидкоросла, не спороносна. Бактерії пігмент не продукують. Колонії помірно-випуклі, слизисті, з часом розростаються і можуть розтікатись по поверхні агаризованого середовища. Запропонований штам є мікроаерофілом. Температурний діапазон його росту становить 25-28°C. Діапазон рН - 6,5-7,4 [5].

Щодо генетичних особливостей - прототроф, стійкий до антибіотиків. У геномі клітин штаму *R. meliloti*, присутній фрагмент транспозону Tn5 довжиною 517н. п. (результати аналізу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР аналіз) ДНК), що відрізняє його від вихідного (батьківського) штаму 425a *R. meliloti* і забезпечує стійкість до сульфату канаміцину в концентрації 200мкг/мл. Штам непатогенний, нетоксичний та цілком безпечний для людини [5].

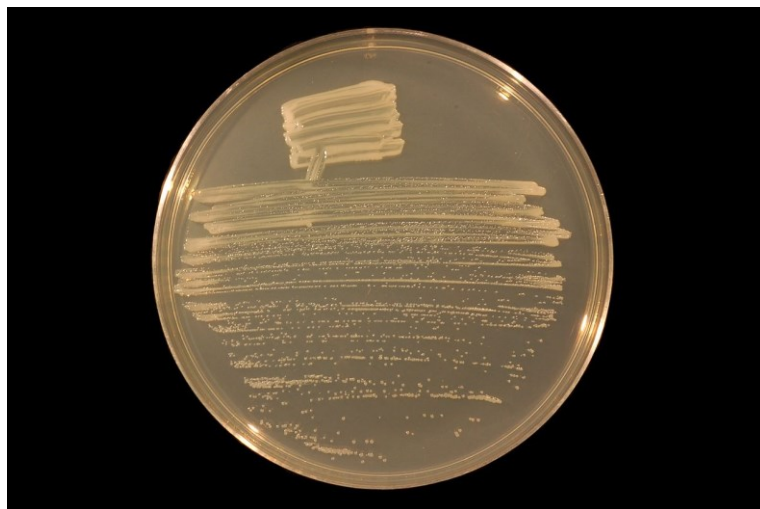


Рис.2.1. Штам бактерії *Rhizobium meliloti* окремі колонії на агарі з триптон-дріжджовим екстрактом

## 2.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Аероб. Оптимум температури – 25-28°C. Коефіцієнти швидкості росту бактерій при 15°C зменшуються в половину, в порівнянні з температурою оптимуму. Всі ризобії мають приблизно однакову толерантність до кислотності середовища, але *Rhizobium meliloti* є найбільш чутливими до кислого середовища (рН 5,0). Тому для оптимального росту необхідно підтримувати рН 6,5-7,5 при культивуванні. Хемоорганотроф. Тип енергетичного метаболізму – дихання. Росте на середовищах з вуглеводами з підкисленням середовища. Активно використовує глюкозу, сахарозу, лактозу, галактозу, ксилозу, рамнозу, менш активно використовує сорбіт, маніт. Декстрини не засвоює.

Ферменти шляху Ентнера-Дудорова має більшість вивчених видів ризобій, що обумовлює їх здатність засвоювати С-6 вуглецеві сполуки. Ріст клітин *Rhizobium meliloti* на середовищі з глюкозою показує значну індукцію ферментів цього шляху, в порівнянні з іншими джерелами карбону.

*Rhizobium meliloti* також мають повний набір ферментів окиснювального пентозофосфатного шляху. В клітинах *Rhizobium meliloti* виявлені деякі ферменти шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнаса – фосфоглюкоізомераза, фруктозобісфосфат альдолаза, триозофосфатізомераза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, 3-фосфогліцераткіназа, фосфогліцератмутаза та енолаза. Фосфофруктокіназа не виявлена в безклітинних екстрактах. Вважається, що шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса використовується для глюконеогенезу, а не для катаболізму вуглецевих сполук.

Здатність утилізувати галактозу та лактозу пов'язана з активністю β-галактозидази. Здатність утилізувати сахарозу пов'язана з активністю ферменту інвертази. Метаболізм ксилози відбувається шляхом ізомеризації в ксилулозу за допомогою фермента ксилозоізомерази. з наступним фосфорилуванням з отриманням ксилулозо-5-фосфату. Ксилулозо-5-фосфат може переходити у фруктозо-6-фосфат і гліцеральдегід-3-фосфат через

альдолазу і транскетолазу. Фруктозо-6-фосфат потім ізомеризується в глюкозо-6-фосфат, що метаболізується у шляху Ентера-Дудорова, а гліцеральдегід-3-фосфат метаболізується до пірувату.

В *Rhizobium meliloti* були ідентифіковані два ферменти з поліолдегідрогеназною активністю. Один з них діє на сорбіт, інший – на маніт. Завдяки цим ферментам сорбіт і маніт окислюються до фруктози, що далі метаболізується шляхом зазначеним раніше [5].

### 2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *R. Meliloti* наведена згідно другого видання Керівництва Берджі з систематики бактерій.

За науковою класифікацією належить до класу Альфа-Протеобактерій, порядок *Rhizobiales*, родина *Rhizobiaceae*. Систематичне положення мікроорганізму за Берджі:

- Царство – Бактерії
- Підцарство - Протеобактерії
- Категорія – Грамнегативні еубактерії, що мають клітинні стінки
- Група – Грамнегативні, аеробні/мікроаерофільні палички та коки
- Підгрупа – Аероби
- Рід – *Rhizobium*
- Вид – *R. Meliloti*

### 2.4. Поширення в природі

Ризобії можуть потрапляти в ґрунт як в складі комерційних інокулянтів, так і поширюватися разом з насінням або поширюватися повітрям. При штучній інокуляції кількість ризобій, що потрапили у ґрунт, сильно варіює.

Високоякісні інокулянти забезпечують потрапляння  $2,0 \times 10^3$  –  $1,0 \times 10^6$  клітин на одну насінину. Тому внесені штами часто домінують при нодуляції в перший рік використання нової культури. Число клітин ризобій при цьому швидко зростає за рахунок виходу з відмираючих бульбочок. Часто це

забезпечує домінування штамів-інокулянтів перших 5-10 років після першої інокуляції.

*Rhizobium meliloti* у природі формують азотфіксуючий симбіоз з рослинами роду *Medicago*, *Melilotus* та з *Trigonella foenumgraecum*. При цьому на коренях рослин розвиваються спеціалізовані структури - бульбочки, що надають бактеріям екологічну нішу і умови для фіксації атмосферного азоту.

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

У даному курсовому проекті описано культивування *Rhizobium meliloti* для одержання Різобіну.

Різобін – високоефективний бактеріальний препарат, який виготовлений на основі комплементарних симбіотичних азотфіксувальних бактерій роду *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, нешкідливих для людини і тварин.

Різобін має післядію, яка проявляється у покращенні екологічного стану ґрунтів за рахунок збагачення їх азотом і підвищення структурованості. Препарат відповідає санітарно-гігієнічним нормам, не викликає забруднення навколишнього середовища [6].

Щодо технології виробництва: клітини бактерій від середовища відділяють шляхом сепарування, після чого до них додають захисне середовище (20 % меласи, 1 % тіосечовини) і висушують під вакуумом при температурі 30–35 °С. Суху біомасу (вологість 2–5 %) розмелюють, змішують з наповнювачем (бентоніт) і фасують у вологозахистні мішки. В 1 г препарату має міститись не менше 9 млрд. життєздатних бульбочкових бактерій [7].

Обґрунтування необхідності застосування азотфіксаторів для поліпшення родючості ґрунтів.

*Rhizobium meliloti* - рід бактерій із сімейства *Rhizobiaceae* класу альфа-протобактерій, що входять до групи бульбочкових бактерій. Це грамнегативні ґрунтові бактерії, здатні до фіксації азоту. Бактерії роду колонізують клітини кореня рослини, утворюючи кореневі бульби; тут, в умовах зі зниженим вмістом кисню, вони перетворюють атмосферний азот в аміак, забезпечуючи рослині доступ до органічного азоту в формі глутаміну

або уреїдів.					НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ						
ЗМ	Арк.	№	Ліди	Дата							
Розробник	Водяницька	ІС			РОЗДІЛ 3			Літ.	Аркуш	Аркушів	
Керівник	Буценко								18	60	
Н. контр								Кафедра БТМ			
Консульт											
Заб. каф.	Стадніков										

В обмін рослина постачає бактеріям цукри, що утворилися в ході фотосинтезу, і забезпечує їм аеробні умови [8].

Актуальним завданням сьогодення у сфері біологічної азотфіксації є розробка препаратів для стимулювання росту, розвитку бобових рослин, посилення їх продуктивності в результаті використання симбіотрофного азоту. Ефективність препарату визначається здатністю бактерій, на основі яких він виготовлений, фіксувати азот атмосфери, покращувати мінеральне живлення рослин, забезпечувати їх біологічно активними речовинами (вітамінами, фітогормонами, амінокислотами та ін.), підвищувати урожайність і якість рослинницької продукції. Препарат призначений для передпосівної обробки насіння бобових культур (сої, гороху, люцерни, люпину, козлятника, лядвенця, буркуна, віки, кормових бобів, конюшини) [6].

### 3.2. Розрахунок річної потреби

В Україні станом на 2020 рік налічується 1,8 млн га люцерни [9]. Але враховуючи, що на ринку добрив для люцерни дуже велика конкуренція серед органічних добрив, слід прийняти площу люцерни, коли відома площа, а саме 4500 га [9], зможемо дізнатись кількість обробленого насіння даним препаратом. Площа яка буде оброблятися лише біодобривом на основі *R. meliloti*, далі наступним етапом буде розрахунок кількості препарату, яка необхідна для обробки. Відомо, що на кормові цілі люцерну рекомендовано висівати у нормі 16–18 кг/га [10]. Отже, на 4500 га припадає 72 000 кг насіння.

Встановлено, що на 500 кг насіння необхідно 4 кг сухого інокулянту препарату Різобін [11]. Отже, для 72 000 кг необхідно

$$(72\ 000 \times 4) / 500 = 576 \text{ кг препарату}$$

### 3.3. Розрахунок потужності виробництва Різобіну *Rrhizobium meliloti*

Концентрація біомаси - 1.36 г/л, час культивування - 72 годин.

Необхідна кількість сухого інокулянту Різобін для обробки 72 000 кг насіння складає:

$$(72\ 000 \times 4)/500 = 576 \text{ кг препарату}$$

Для одержання ризобіну культуральну рідину після вирощування ризобій піддають сепарації, в результаті одержують біомасу у вигляді пасти з вологістю 80%.

Визначаємо об'єм культуральної рідини, необхідний для отримання 576 кг сухого інокулянту:

$$V_{кр0} = 576000 \text{ г} / 8 \text{ г/л} = 72000 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (20%), необхідна кількість культуральної рідини складає :

$$V_{кр} = 72000 \text{ л} / (1-0,20) = 90\ 000 \text{ л}$$

Прийmemo кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) 50, тому що даний біопрепарату є сезонним продуктом і немає необхідності випускати його протягом всього календарного рокує. Тоді кількість продукту на добу ( $V_{д}$ ) становитиме:

$$V_{д} = V_{кр}/T_{рд} = 90\ 000 / 50 = 1800 \text{ л}$$

Інші 280 днів виробництво буде працювати для синтезу інших сполук.

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф})/24) = 90\ 000 / ((1800 \times 78)/24) = 15,3 = 15 \text{ циклів,}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 78 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ( $V_{крц}$ ):

$$V_{крц} = K1 \times V_{д} \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 1800 \times 78 / 24 \approx 6435 \text{ л}$$

де  $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій Геометричний об'єм ферментера для отримання 6435 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{г} = V_{крц}/K_{зап} = 6435/0,6 = 10725 \text{ л} = 10,72 \text{ м}^3,$$

де  $K_{зап}$  – коефіцієнт заповнення ферментера.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері

За виробничий цикл отримують  $V_{кр} = 6435$  л культуральної рідини.

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

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1-E_{\phi}} = \frac{6435}{1-0,1} \approx 7150 \text{ л}$$

де  $E_{\phi}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1} = 7150$  л.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зан} = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{\phi.1} = 7150/0,6 = 11917$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 10\ 000$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зан.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{7150}{10000} = 0,71$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1+X_{\phi}} = \frac{7150}{1+0,1} = 6500 \text{ л}$$

де  $X_{\phi}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 7150 - 6500 = 650 \text{ л}$$

#### 3.4.1. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 1 м<sup>3</sup>

Для одержання 650л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з

урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{650}{1 - 0,1} = 722 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{\text{ін.}} = 722/0,6 = 1205 \text{ л}$ .  
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{сф}} = 1000 \text{ л}$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{722}{1000} = 0,72$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{722}{1 + 0,1} = 656 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 722 - 656 = 66 \text{ л}$$

### **3.4.2. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 100 л**

Для одержання 66 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{66}{1 - 0,1} = 73 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{\text{ін.}} = 73/0,6 = 121 \text{ л}$ .  
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{сф}} = 100 \text{ л}$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{66}{100} = 0,6$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{66}{1 + 0,1} = 60 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 66 - 60 = 6 \text{ л}$$

### 3.4.3. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 10 л

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

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{6}{1 - 0,1} = 6,6 \text{ л}$$

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

$$K_{\text{зап.4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{6,6}{10} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{6,6}{1 + 0,1} = 6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 6,6 - 6 = 0,6 \text{ л}$$

### 3.4.4. Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для одержання 0,6 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,15$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = \frac{V_{\text{пм4}}}{V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}} = \frac{600}{750 \times 0,15} = 5 \text{ шт}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 5 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу препарату Різобіну у ферментері об'ємом  $1 \text{ м}^3$  з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

## РОЗДІЛ 4

### ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

#### 4.1 Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

В процесі отримання бактеріального добрива Різобін з бактерій роду *Rhizobium meliloti* здійснюється технологічний процес, а саме: вирощування ризобій, етап якого виробляє безпосередньо культуральну рідину, яка піддається сепарації, і в результаті чого одержують біомасу у вигляді пасти з вологістю 70-80%.

Бактеріальні клітини та разом з тим, органічні і неорганічні речовини, білки як у розчиненому, так і в колоїдному стані містяться в культуральній рідині. Отже, щоб почати процес виділення, спочатку потрібно відокремити культуральну рідину від біомаси. Оскільки планується вироблення цільового продукту в якості біодобрива Різобін. Далі інші домішки можна вилучати такими способами як осадження, ультрафільтрація.

Для виробництва посівного матеріалу вихідну культуру ризобій, призначену для певного виду бобової рослини, вирощують на агаризованому середовищі, що містить відвар бобового насіння, 2% агару і 1 % сахарози. Культуру розмножують в колбах на рідкому поживному середовищі.

Основна ферментація здійснюється у аеробний процес. Готову культуральну рідину сепарують, отримуючи біомасу у вигляді пасти з вологістю 70-80%. Для отримання різобіну пасту змішують із захисним середовищем, що містить тіомочевину і мелясу (1:20), і направляють на сублимаційні висушування. Висушену біомасу розмелюють, змішують з наповнювачем (бентоніт) та фасують в герметичні поліетиленові пакети, які зберігаються при температурі 15°C не більше 6 місяців; насіння перед посівом опудрюють.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>ЗМ</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підп</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Водяницька</i>	<i>ІС</i>			<i>РОЗДІЛ 4</i>	<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Буценко</i>						25	60
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>								
<i>Заб. каф.</i>	<i>Лтадніков</i>							

В 1 г прaparату повинно бути не менше 9 млрд життєздатних бульбочкових бактерій. Слід пам'ятати, що різобін має відносну термолабільність. Тому сушіння у вакуумно-сушильної шафи є найкращим варіантом.

Виділення і очищення різобіну включає такі етапи:

1. Сепарування
2. Ультрафільтрація
3. Осадження
4. Висушування
5. Подрібнення
6. Пакування.

#### **4.1.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання**

**Відокремлення біомаси.** Для отримання супернатанту потрібно спочатку відділити клітини від біомаси. Для цього можемо застосувати методи фільтрування, центрифугування або сепарування.

- *Фільтрація.*

Процес проходження розчину чи суспензії через пористу перегородку (мембрану) за різницею тиску з обох боків мембрани, причому розмір профільтрованих часточок обмежується діаметром пор.

Суспензія характеризується досить високою ступеню в'язкості та має велику кількість домішок, тому при застосуванні вакуум фільтрів потрібно брати до уваги попередню обробку суспензії, з метою максимально можливої коагуляції клітин і домішок в більші частинки, що легко фільтруються. Але реологічні властивості різобій значно знизяться. Якщо не брати до уваги попередню обробку, метод відокремлення за допомогою вакуум – фільтрів буде громіздким та економічно не вигідним.

- *Сепарування.*

Процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок або краплинок в газі.

Є більш доцільним методом, оскільки відсутній негативний вплив фізичних та хімічних факторів на властивості, а також сепарація має більше переваг, такі як: менші втрати культуральної рідини порівняно з фільтруванням; можливість автоматизувати процес; високий фактор розділення; високий ступінь розділення високодисперсних систем.

- *Центрифугування*

Це примусове осадження частинок (речовин) за рахунок швидкості зростання відцентрованих сил.

Цей метод по перевагам схожий на метод сепарування, але фактор розділення є меншим. Хоча такий спосіб дає можливість отримати середовище і клітини, незабруднені фільтратом. Недоліками є високі витрати на електроенергію, профілактичний і капітальний ремонт.

#### **4.1.2. Виділення цільового продукту з супернатанту**

**Фільтрація.** Для вилучення наступних домішок можна застосувати ультрафільтрації або фільтрації під впливом тиску за допомогою друк-фільтрів.

- *Фільтрування, що працює під тиском.*

За рахунок конструкції таких фільтрів з'являється можливість формування в них високого тиску, який буде необхідним для забезпечення максимально високої швидкості фільтрації.

Переваги використання друк-фільтрів: можливість здійснювати фільтрацію в інертній атмосфері; відсутність контакту зовнішнього середовища і оператора з речовиною – робота в стерильних умовах, з чутливими і токсичними речовинами; можливість обігріву або охолодження фільтруючої ємності через парову сорочку під дією пари або води; більш висока продуктивність за рахунок збільшення рушійної сили процесу за

допомогою підвищення тиску; широкий діапазон застосування робочих температур і тиску; швидка і ефективна сушка осаду.

Недоліком є громіздке обладнання, що займає велику територію на виробництві, при цьому, що кількість продукції під час виробництва є невеликою. Тому даний метод є економічно не вигідним.

- *Ультрафільтрація.*

Це технологія мембранної очистки, яка завдяки маленьким розмірам пор (0,02 - 0,03 мкм) здатна затримувати велику кількість домішок при низькому робочому тиску.

Переваги: висока ефективність, низький робочий тиск, тривалий термін служби мембранних елементів, компактне розташування в порівнянні з традиційними схемами, повна автоматизація.

Недоліки: необхідність регулярного промивання, висока вартість обладнання.

Після здійснення процесу ультрафільтрації, розчин осаджують органічним розчинником, промивають очищеною водою і знову пускають на ультрафільтрацію.

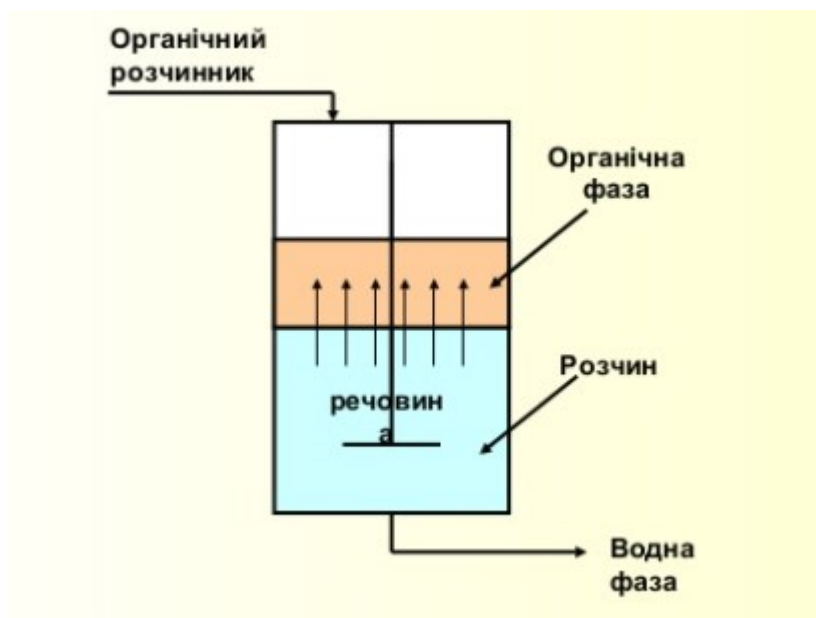
Отже, після ультрафільтрації, потрібно отримати тверду фазу із домішок, для того, щоб їх видали. Для цього можна використати метод екстракції або осадження.

- *Екстракція.*

Процес отримання однієї або кількох речовин (компонентів) зі складних систем (рідких або твердих) селективним розчинником, який називається екстрагентом.

Переваги: порівняно з іншими процесами розділення рідких сумішей є низька робоча температура, зазвичай кімнатна.

Недоліки: велика кількість механічного й пневматичного устаткування, повільність досягнення рівноваги, складність в підборі екстрагенту, дороговартість екстракторів.



**Рис.4.1 Структура методу екстракції**

- *Осадження.*

Виділення цільового продукту шляхом додавання до рідини реагенту, який взаємодіє з розчиненим продуктом, переводячи його в тверду фазу.

Переваги: простота методу, дешевий спосіб устаткування, процес можна провести в звичайному змішувачі.

Недоліки: необхідність в дорогій наступній стадії дистиляції великих обсягів розчинника.

В якості осаджувачів використовуються такі розчинники як ацетон, метанол, етанол і пропанол. Етиловий спирт вимагає близько 24 годин для якісного осадження, в той час як метиловий спирт діє практично відразу після додавання, але являється дуже токсичним. Діетиловий ефір і ацетон також добре працюють, але вимагають більше 24 год. і також мають великий ступінь токсичності. Тому оптимальним розчинником обираємо етанол.

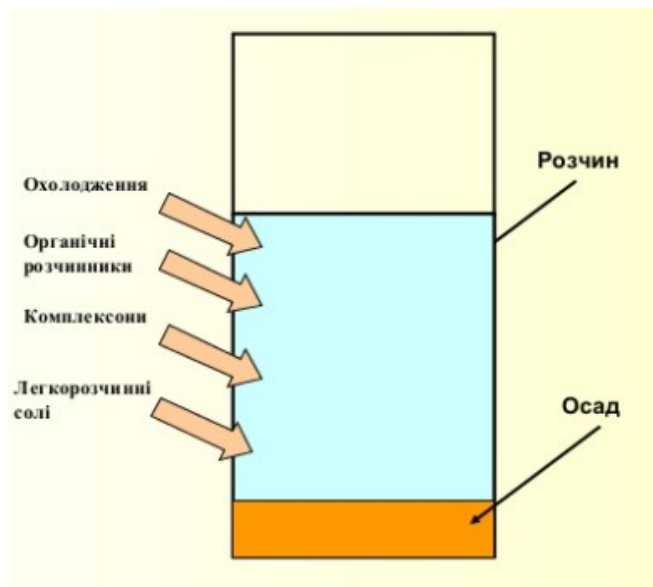


Рис.4.2. Структура методу осадження

Після осадження культуральну рідину вдруге піддають процесу *ультрафільтрації*, в кінці промивають очищеною водою.

#### 4.1.3. Вибір способу сушіння та сушарки.

Різобін характеризується відносною термолабільністю. Тому методи сушіння за високих температур використовувати недоцільно. Як варіанти, можна розглянути 2 типи сушіння: сушіння сублімацією або вакуумне сушіння.

2) *Вакуум-сушильна шафа*. Сушарка працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної або прямокутної форми та закривається герметично.

Для зниження втрат теплоти корпус і кришку вакуум-сушильної шафи теплоізолюють. При подачі теплоносія в плити матеріал, що висушується, на полицях нагрівається й з нього випаровується волога. Для зниження температури сушіння процес проводять під вакуумом, пари вологи відводять у конденсатор. При необхідності в процесі сушіння шар матеріалу, що висушується, періодично перемішують.

Перевагою вакуумних сушарок є можливість сушіння матеріалів при невисоких температурах, менша витрата тепла, можливість уловлювання

пари цінних компонентів (наприклад, пари спиртів та органічних рідин), кращі санітарні та безпечні умови роботи обслуговуючого персоналу.

Недоліками таких сушарок є низька продуктивність, необхідність застосування ручної праці, більші витрати часу на сушіння, завантаження й вивантаження матеріалу.

### **Подрібнення**

Висушену біомасу розмелюють, змішують з наповнювачем (бентоніт), далі відбувається фасування.

### **Фасування та пакування**

Упаковка повинна бути відповідною до специфіки та призначення. Відтак і матеріали для виготовлення слід обирати відповідним чином. Встановлено, що критеріями якості є: нешкідливість матеріалу, з якого вона виготовлена, і його сумісність з бактеріальним добривом; здатність забезпечити неушкодженість продукції; зручність у вжитку; стійкість до хімічних і фізичних впливів; наявність на ній достатньої інформації про добриво (назва, тип, склад, номер партії, кількість, дозування, спосіб застосування, умови зберігання, дата випуску і т. д.); міцність і стійкість; світлонепроникність; бар'єрна стійкість до мікроорганізмів; забезпечення відповідного часу зберігання.

Бактеріальне добриво Різобін повинно зберігатися в сухому, прохолодному місці, упаковка має бути запакований герметично та вологонепроникним.

Пакувальний матеріал щодо вимог даної субстанції повинен бути:

За призначенням: для сипких речовин.

За матеріалами: поліетиленовий.

За видами: герметичний, плівковий.

Різобін повинен зберігатися при температурі 15°C, не більше 6 місяців. Бажано використовувати тришарову плівку. Задля того, щоб запезпечити вологонепроникність найкращим варіантом буде металізований пакет, головне він повинен бути герметичним.

## **Маркування**

Маркування наносять на кожну одиницю споживчої упаковки або на ярлик із зазначенням:

- найменування підприємства-виробника та / або його товарного знаку;
- найменування препарату;
- номера партії;
- маси нетто;
- дати виготовлення;
- гарантійного терміну зберігання.

Маркують різобін із зазначенням маніпуляційних знаків "Боїться вологості", "Боїться нагріву", "Гаками безпосередньо не брати".

## **Транспортування**

Продукцію перевозять залізничним і автомобільним транспортом з дотриманням правил, що діють на транспорті даного виду в критих транспортних засобах. По залізницях упаковану продукцію транспортують вагонними відправками в критих вагонах або в універсальних контейнерах. Не допускається спільне транспортування продукції з продуктами харчування. Не допускається використовувати для транспортування транспортні засоби, які використовувалася для перевезення отрутохімікатів. Транспортні засоби повинні бути сухими і чистими. Гарантійний термін зберігання нітрагіну - 9 місяців з дня виготовлення. Зберігають препарат при температурі природних умов, але не вище 15°C і не нижче мінус 30°C.

**Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.**

Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

1. Зберігання культуральної рідини
2. Відокремлення культуральної рідини від біомаси
3. Ультрафільтрація
4. Фільтрація

5. Осадження
6. Висушування
7. Подрібнення

Також фасування, пакування, маркування, транспортування цільового продукту.

#### **4.2. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера**

Існує два основних типи культивування, періодичне культивування і безперервне культивування.

При періодичному культивуванні всі необхідні поживні компоненти вносять до початку процесу, при цьому в ході ферментації додаткове харчування не вводиться, метаболіти не відводяться і фізичні параметри процесу не змінюються. Коли утворюється достатня кількість цільового продукту – процес зупиняють, продукт очищають і звільняють ферментер для продовження циклу культивування.

При промисловому виробництві препаратів бульбочкових бактерій використовують періодичне культивування, що пов'язано з простотою апаратного оформлення.

Штами бульбочкових бактерій отримують методом глибинного культивування в ферментерах місткістю від 10 до 1 м<sup>3</sup>. Оскільки вибір конструкції здійснюється серед ферментерів місткістю до 1 м<sup>3</sup>, енергетичні затрати на процеси ферментації не є визначаючим фактором. Особливості сировини, що використовується, і також властивості культури мікроорганізмів є вирішальними факторами у виборі способу перемішування і аерації середовища. Найбільш поширеними конструкціями апаратів такого об'єму є ерліфтні апарати, барботажні колони та апарати з механічним перемішуванням.

В барботажних колонах повітря подається під високим тиском в нижню частину біореактора; по мірі підйому маленькі пухирці повітря об'єднуються, що приводить до нерівномірного розподілення повітря.

Крім того подача повітря під високим тиском може призвести до значного піноутворення. Все це обмежує універсальність даних конструкцій і звужує діапазон технологічних умов.

В ерліфтних установках газ подається в нижню частину вертикального каналу. Піднімаючись, він захоплює за собою рідину в верхню частину каналу, і тут частково виходить. Більш щільна неаерована рідина опускається по іншому вертикальному каналу до дна реактора, і процес повторюється. Таким чином, культуральна рідина разом з клітинами безперервно циркулює в реакторі. Ерліфтні біореактори бувають двох основних типів. В першому випадку ферментер – це ємність з центральною трубкою, яка забезпечує циркуляцію рідини (реактори з внутрішньою циркуляцією). В другому випадку культуральна рідина проходить через окремі, незалежні канали (реактор з зовнішньою циркуляцією). Конструкція ерліфтних простіша, але в них обмежена регуляція швидкості циркуляції. В біореакторах з зовнішньою циркуляцією можна модифікувати умови ферментації.

Для виготовлення різобіну використовують ферментери з механічним перемішуючим пристроєм. В реакторах такого типу газ потрапляє через газорозподілювач (барботер). Для рівномірного розподілення газу по всьому об'єму біореактора використовуються мішалки – одна або декілька. Лопатеві та турбінні мішалки є найбільш часто застосовуваними в конструкціях ферментерів у поєднанні з барботерами.

#### **4.3. Обґрунтування стадій підготовки аераційного повітря**

Різобін являється аеробом, тому потрібна підготовка стерильного аераційного повітря при культивуванні штаму *Rhizobium meliloti*.

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи (опромінення ультрафіолетовими променями).

Повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування стерилізують за допомогою фільтрів грубої очистки (головні фільтри) та індивідуальних фільтрів (фільтрів високої ефективності). Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед кожним ферментером. Головні фільтри заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється близько 98 % мікроорганізмів контамінантів. Використання ж індивідуальних фільтрів, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, дає змогу отримати повітря з ступенем очистки 99,9999%.

#### **4.4. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів**

Дезінфекція – сукупність способів повного, часткового або селективного знищення потенційно патогенних для людини мікроорганізмів на об'єктах зовнішнього середовища з метою розриву шляхів передачі збудників інфекційних захворювань від джерел інфекції до сприйнятливих людей [12].

Для санітарної обробки об'єктів підприємства допускається застосування дезінфікуючих та мийних з дезінфікуючим ефектом засобів, які в установленому порядку внесені в “Обліковий перелік дезінфекційних засобів в Україні”, з метою миття або дезінфекції об'єктів фармацевтичної промисловості.

Порядок миття та дезінфекції

**Етап 1:** *Загальне очищення мийним засобом*

Даний етап полягає в загальному очищенні поверхні або обладнання за використання відповідного мийного засобу для видалення видимого бруду,

частин харчових продуктів, жиру та сміття. Цей етап необхідно завжди розпочинати та завершувати полосканням, забезпечуючи усунення всіх залишків видимого забруднення миючого розчину з поверхні.

### **Етап 2: Дезінфекція**

Другий етап проходить для забезпечення зниження будь-яких присутніх бактерій до нормованого рівня. Дезінфікуючий засіб повинен використовуватися за призначенням. Важливо пам'ятати, що дезінфекція буде ефективною лише тоді, коли вона здійснюється на чистій поверхні. Як і з першим етапом дезінфекцію необхідно завершити полосканням чистою водою, якщо дезінфікуюча речовина не є розчином, що не потребує полоскання [13].

Персонал є одним з основних джерел забруднення готового продукту мікроорганізмами. Для миття рук використовують рідке або туалетне мило, миють руки під краном. Витирають руки досуха стерильною серветкою. Потім персонал обробляє руки розчином дезінфікуючого засобу, призначеного для обробки рук, для цього можна використати розчин дегміну 1 %; 2,4 % розчин рецептури "С-4" (суміш розчину перекису водню і мурашиної кислоти).

### **Дані щодо розрахунку миття**

Виробництво різобіну здійснюється упродовж 50 днів. З метою забезпечення чистоти виробничих приміщень, миття підлоги проводиться щодня, тобто 50 разів. Також, раз на місяць здійснюється генеральне прибирання (оброблюються стіни, підлога, вікна тощо), тобто 2 рази. Оптимальна площа виробничого приміщення, в якій встановлено ферментер на 10 м<sup>3</sup>; інокулятор на 100 л; реактори – змішувачі, а також бокс та лабораторне устаткування: автоклав, холодильник, термостат, апаратура для проведення різних видів контролю становить 96 м<sup>2</sup> (12 x 8). Відстань між апаратами складає 1 м; відстань від стін до апаратів становить 1,5 м. Висота стін становить 5 м.

Загальна площа стін становить:

$$((12 \times 5) + (8 \times 5)) \times 2 = 200 \text{ м}^2.$$

Площа підлоги становить 96 м<sup>2</sup>. Визначаємо площу поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати (табл. 1.1).

Кількість виробничих циклів 15. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 16 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$10,62 \times 16 = 169,92 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції за весь період виробництва наведено у *табл. 4.1*.

*Таблиця 4.1*

**Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції  
оброблюваного об'єкту за весь період виробництва різобіну**

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/ або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м <sup>2</sup> (м <sup>3</sup> )
Обладнання, інвентар, комунікації	10,62	15	169,92
Підлога	96	50	480
Стіни, двері, вікна	200	5	1000

Для того, щоб обрати мийний (для обладнань та комунікацій) і дезінфікувальний (для підлоги, стін, вікон, дверей) засіб, необхідно

врахувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м<sup>2</sup> затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезинфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Концентрація відіграє неабияку роль у процесі очищення та дезінфекції, адже це впливає на кількість використання миючого розчину, а також на вплив миючого розчину на персонал/обладнання.

Використання дуже великої кількості миючого засобу призводять до більш високих виробничих витрат, також можливі проблеми зі зливами, адже хімікати повинні бути правильно нейтралізовані. Невірна концентрація миючого розчину може пагубно вплинути на здоров'я персоналу та на стан обладнання.

Таблиця 4.2.

## Порівняльна характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва Різобіну

Назва мийного/дезінфікувального 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 <sup>2</sup> (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
Хлорантоін [1]	Обладнання, інвентар, комунікації	0,2	169,92	84,96	405	856
Біомой [2]	Обладнання, інвентар, комунікації	0,5	169,92	84,96	194	259
Дезактин [3]	Обладнання, інвентар, комунікації	0,2	169,92	84,96	380	682
Дезосепт Форте [4]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,15	1480	222	104	145
Гембар [5]	Стіни, підлога, вікна, двері, інвентар	0,2	1480	296	275	491

1. <https://prom.ua/p276027906-hlorantoin.html?&primelead=NS4xMg>
2. <https://prom.ua/ua/p1193047158-biomoj.html?&primelead=M141>
- 3.

[https://rozetka.com.ua/163029420/p163029420/?gclid=Cj0KCQIAqbyNBhC2ARIsALDwAsAibISD3yjK0CEI7mf\\_39q\\_B3TkqVaAhvncFihYfjI3OXJ93IvgGgaAiftEALw\\_wcB](https://rozetka.com.ua/163029420/p163029420/?gclid=Cj0KCQIAqbyNBhC2ARIsALDwAsAibISD3yjK0CEI7mf_39q_B3TkqVaAhvncFihYfjI3OXJ93IvgGgaAiftEALw_wcB)

4. <https://biovet.ua/ru/dezinfitsiruushchee-sredstvo-dezosept-forte/>
5. <https://flagma.ua/uk/dezsredstvo-gembar-o2193560.html>

#### **4.5. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища**

В якості поживного середовища в стандартній технології використовується середовище на основі бобового відвару. Таке середовище дозволяє отримати потрібний титр бактерій в препараті, проте препарати, отримані на бобовому відварі, через 2-3 міс після початку зберігання втрачають свою якість через розвиток в них сторонньої мікрофлори.

Тому в даній технології використовується напівсинтетичне середовище. Напівсинтетичні середовища готують з хімічно чистих мінеральних солей і концентрованих органічних компонентів, таких як дріжджовий екстракт, в точно відміряних концентраціях.

До реактора-змішувача вноситься вода питна та дозуються компоненти поживного середовища зі складу. Готується середовище складу (г\л):  $K_2HPO_4$ — 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,8;  $NaCl$  — 0,2;  $FeCl_3$  — 0,01 маніт — 10,0; дріжджовий екстракт – 1,0; дистильована вода.

Гомогенізація середовища відбувається при числі обертів мішалки 90 об/хв та при нагріванні 50°C. рН середовища має становити 3,0 для попередження утворення аміноцукрів при сумісній стерилізації азотовмісних компонентів та глюкози. Регуляція рН відбувається внесенням розчину 1н HCl.

Стерилізація поживного середовища здійснюється термохімічним способом. Стерилізація при кислих значеннях рН не супроводжується руйнуванням органічних компонентів і не приводить, при подальшій нейтралізації, до зниження швидкості росту культури продуцента. При рН 3,0 повна стерилізація поживного середовища досягається при 90°С протягом 40 хв.

**РОЗДІЛ 5**  
**СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ**

*Таблиця 4.1*

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика	Джерела
1	2	3	4	5
ПЗ-1	Повітрозабірний пристрій	1	Повітрозабірний пристрій АІИ 020.000-01 Прилад обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Робочий тиск: до 0,6 МПа (6 кгс/см <sup>2</sup> ) та до 1,2 МПа (12 кгс/см <sup>2</sup> ). Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент».	1
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G3(ФВК-65-600-6-G3/25). Фільтруючий матеріал – синтетичне поліестерове хімволокно. Продуктивність - 2800 м <sup>3</sup> /год. Виробник: Компанія «Luxfilter», Росія.	2
К-3	Компресор	1	Компресор Inversys 5 Plus. Продуктивність: 0.91 м <sup>3</sup> /хв. Максимальний робочий тиск 0,75 мПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина)	3
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря CWK 250-3-2,5 (Systemair).	4

			Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), вихідна температура повітря 17-18 ° С. Виробник: «Systemair»	
P-5	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 230/10 фірми «В-compressor» (Росія), об'єм 230 л, робочий тиск до 1,6 МПа, продуктивність 1200 л/хв. [5]	5
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повіронагрівач водяний VBC 315-2 (Systemair). Вихідна температура 35-40° С. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), робоча температура 150 ° С. Виробник: «Systemair» (Швеція)	4
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Панельний осередковий фільтр класу F9. Фільтруючий матеріал мікроскловолокно. Максимальна робоча температура: 80 °С.Продуктивність: 3400 м³/год. Ступінь очищення становить 90- 99 %	6
Ф-11 Ф-15 Ф-20	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтр повітряний <i>Ultradept II P-SRF</i> . Фільтруючий матеріал - боросилікат, діапазон температур від -20 до 200 °С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %	7
P-8	Реактор для приготування хлоридної кислоти	1	Реактор-змішувач об'ємом 6 л, оснащений сорочкою нержавіюча сталь AISI 304	8

P-9	Реактор для приготування та стерилізації натрій гідроксиду	1	Реактор-змішувач об'ємом 6 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (до 450 об/хв), нержавіюча сталь AISI 304.	9
I-12	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), матеріал : нержавіюча сталь AISI 304. Габарити(В*Ш*Д),мм:1355*515*515 [10]	10
H-13	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Sprut TTDF 55-71 Продуктивність :917 л/хв , потужність: 11 кВт. Габарити(В*Ш*Д),мм:1370*280 [11]	11

I-16	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), матеріал : нержавіюча сталь AISI 304.	10
H-17	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Sprut TTDF 55-71 Продуктивність :917 л/хв , потужність: 11 кВт. Габарити(В*Ш*Д),мм:1370*280 [11]	12
P-19	Реактор-змішувач для приготування композиції Б для інокулятора об'ємом 1 м <sup>3</sup>	1	Реактор-змішувач об'ємом 100 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (до 450 об/хв), робочий тиск :0,05-0.25 МПа нержавіюча сталь AISI 304. [8]	13
Ф-21	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 1 м <sup>3</sup> , оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (1000-2600 об/хв), нержавіюча вуглеводнева сталь AISI 316L. Робочий тиск : 35 МПа. Виробник: Acometi, № 8511.[19].	14
H-22	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Sprut TTDF 55-71 Продуктивність :917 л/хв , потужність: 11 кВт. Габарити(В*Ш*Д),мм:1370*280 [11]	12

**Примітка\*:** пошук і підбір обладнання здійснювався з використанням наступних електронних джерел:

1. <http://condvent.ru/vozduhosborniki.html>
2. <http://www.luxfilter.ru>
3. <http://www.dalgakiran.com.ua>
4. <http://www.systemair-ukraine.com/pdf/accessories.pdf>
5. <https://b-compressor.ru/resiver-rv-230-10>
6. <https://ventfilter.kiev.ua/>
7. <https://barrens.ru/>
8. <https://alibaba.com/>
9. <https://alibaba.com/>
10. <https://shopbarn.ru/>
11. <https://trudovik.com.ua//>
12. <https://shopbarn.ru/>  
<https://tpp-fidera.prom.ua>
13. <https://agro-teh.com.ua/>
14. <https://tehnolog.com.ua>
15. <https://www.phxequip.com/>

## РОЗДІЛ 6

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

#### ДР 1. Підготовка та стерилізація аераційного повітря

##### ДР 1.1. Забір повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою турбокомпресора через забірну шахту, яка розташована на висоті 20 м. Повітрозабірник (ПЗ1) обладнаний металевою сіткою для зменшення кількості забруднення, яке може попасти у систему повітязабору.

##### ДР 1.2. Попередня очистка повітря

Здійснюється на фільтрах попередньої очистки, що дозволяють видалити частки більше 5 мкм. Ефективність очистки – 50-60%

##### ДР 1.3. Стиснення повітря

Із фільтра грубої очистки (Ф 2) повітря потрапляє у турбокомпресор (К 3) та стискається до тиску у 0.35-0.5 Мпа. Стиснення повітря приводить до підвищення його температури до 120-250°C і збільшення вмісту вологи.

##### ДР 1.4. Охолодження повітря та виділення зайвої вологи

Повітря охолоджують та конденсують за допомогою теплообмінника-охолоджувача (Т4). Щоб забезпечити випадання вологи повітря переохолоджують до температури 25-45°C та концентрації W= 60-70% за допомогою теплообмінника (Т4).

##### ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи фільтрів другого та третього рівнів, повітря переохолоджують за допомогою теплообмінника (Т 6) до температури 70-90°C та вмісту вологи W= 50%

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>ЗМ</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підп</i>	<i>Дата</i>				
<i>Разрабник</i>	<i>Водяницька</i>	<i>ис</i>			<i>РОЗДІЛ 6</i> 45	<i>Лит.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Буценко</i>						47	60
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Заб. каф.</i>	<i>Стадніков</i>							
						<i>Кафедра БТМ</i>		

## **ДР 1.6. Осушення повітря**

На даному етапі необхідно згладити пульсації у тиску при роботі компресійного обладнання та видалити крапельну вологу. Охолоджене повітря потрапляє у ресивер, де уловлюється волога, що утворилася під час охолодження, при багатократній зміні напрямку руху повітря під час контакту з насадкою ресивера. Конденсат направляється до ЗВ12. Вологість повітря на виході – 60%

## **ДР 1.7 Очистка на головному фільтрі**

Із теплообмінника (Т 6) повітря потрапляє на головний фільтр (Ф 7), який має ступінь очистки у 97%

## **ДР 1.8 Очистка на індивідуальних фільтрах**

Здійснюється на фільтрі тонкої очистки, що встановлюється безпосередньо перед входом аераційного повітря у ферментер. В якості індивідуального фільтру використовується патронний фільтруючий елемент. Ефективність очистки повітря – 99,9999999%

## **ДР 2. Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів**

### **ДР 2.1.1. Приготування поживного середовища**

В даній технології використовується напівсинтетичне середовище. Напівсинтетичні середовища готують з хімічно чистих мінеральних солей і концентрованих органічних компонентів, таких як дріжджовий екстракт, в точно відміряних концентраціях.

До реактора-змішувача вноситься вода питна та дозуються компоненти поживного середовища зі складу. Готується середовище складу (г\л):  $K_2HPO_4$ – 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,8;  $NaCl$  — 0,2;  $FeCl_3$  — 0,01 маніт — 10,0; дріжджовий екстракт – 1,0; дистильована вода.

### **ДР 2.1.2. Стерилізація поживного середовища**

Стерилізація здійснюється термохімічним способом. Стерилізація при кислих значеннях рН не супроводжується руйнуванням органічних компонентів і не приводить, при подальшій нейтралізації, до зниження швидкості росту культури продуцента. При рН 3,0 повна стерилізація поживного середовища досягається при 90°C протягом 40 хв.

### **ДР 2.1.3. Нейтралізація середовища**

Охолоджене середовище нейтралізують стерильним розчином NaOH зі складу до рН 6,8-7,0.

### **ДР 2.2. Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживних середовищ**

### **ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH**

## **ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища**

Для отримання посівного матеріалу розмножену культуру *Rhizobium meliloti* з лабораторії культивують в інокуляторі об'ємом 10 л на середовищі складу (г/л):  $K_2HPO_4$ — 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,8; NaCl — 0,2;  $FeCl_3$  — 0,01 маніт — 10,0; дріжджовий екстракт — 1,0; дистильована вода. Режим культивування: рН=6,5-7,5; аерація повітрям від ДР 3.5; перемішування  $n=200$ об/хв;  $\tau=24-48$  год,  $t=25-28^\circ C$ . Культивування здійснюють до титру клітин 2 млрд/мл.

### **ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А**

На технічних вагах зважують 0,36 г дріжджового екстракту та 9,6 г маніту. Компоненти поміщають в колбу об'ємом 2 л, додають 546мл питної води та перемішують. Потім проводять стерилізацію в автоклаві при  $t = 112^\circ C$  (30 хв, 0,05 МПа).

### **ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б**

На технічних терезах зважують 0,8 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 г NaCl, 0,014  $FeCl_2$ . Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 645 мл питної води, перемішують та закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при  $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$  (40 хв).

#### **ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В**

На технічних терезах зважують 0,6  $KH_2PO_4$ . Наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл, додають 80 мл питної води, перемішують та закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при  $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$  (40 хв).

### **ТП 5. Підготовка посівного матеріалу**

#### *ТП 5.1. Підтримання колекційної культури*

Колекційну культуру *R. meliloti* зберігають у пробірках зі середовищем складу (г\л):  $K_2HPO_4$ – 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,8; NaCl — 0,2;  $FeCl_3$  — 0,01 маніт — 10,0; дріжджовий екстракт – 1,0; дистильована вода.

#### *ТП 5.2. Отримання робочої культури*

Культуру із ТП 3.1 пересівають петлею в чашки Петрі із середовищем складу(г\л):  $K_2HPO_4$ – 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,8; NaCl — 0,2;  $FeCl_3$  — 0,01 маніт — 10,0; дріжджовий екстракт – 1,0; дистильована вода і 16,0 бактеріологічного агару та вирощують протягом 48 годин при температурі  $30^\circ\text{C}$ .

#### *ТП 5.4. Вирощування в колбах на качалках*

У 8 колб об'ємом 750 мл вносять композиції А (ДР 2.1.1), Б (ДР 2.1.2), В (ДР 2.1.3) Г (ДР 2.1.4) та ретельно перемішують. У чашки Петрі з культурою вносять 5 мл фізіологічного розчину та змивають клітини. Потім відбирають піпеткою суспензію клітин та переносять у колби з поживним середовищем і вирощують при  $t=31\text{ }^\circ\text{C}$  протягом 24 годин.

### *ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л*

У інокулятор об'ємом 10 л з композицією А (ДР 2.2.1) через засівну колбу додають композицію Б (ДР 2.2.2), композиції В (ДР 2.2.3). Потім засівною колбою додають 24 мл розчину NaOH (ДР 1.2.1).

Після підлужнення в середовище вносять посівний матеріал (ТП 3.3), включають перемішуючий пристрій (200-250 об/хв), аерацію та подають глуху пару в сорочку інокулятора. Культивування проводять при 31 °С протягом 24 годин.

### *ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 100 л*

У посівний апарат з композицією А (ДР 2.3.1) переносять композицію Б (ДР 2.3.2) із реактора. Потім засівною колбою додають 240 мл розчину NaOH (ДР 1.2.2).

Після підлужнення в середовище вносять посівний матеріал (ТП 3.4), включають перемішуючий пристрій (200-250 об/хв), аерацію та подають глуху пару в сорочку інокулятора. Культивування проводять при 31 °С протягом 24 годин.

## **ТП 6. Виробничий біосинтез**

### *4.1. Промислове культивування R. Meliloti в ферментері об'ємом 1000 л*

У ферментер з композицією А переносять 48 л композицію В із реактора та 48л композиції Б яка також переноситься з реактора. Потім із збірника додають 2400мл розчину NaOH. Після підлужнення в середовище вносять посівний матеріал, включають перемішуючий пристрій, аерацію та подають глуху пару в сорочку інокулятора для підтримки температури росту культури. Культивування проводять при 30<sup>0</sup>С протягом 24годин, рН тримають в межах 7.5.

## **ТП 7. Відділення маси мікроорганізмів від культуральної рідини**

### *ТП 7.1. Осадження біомаси шляхом відстоювання*

Для попереднього відділення біомаси та адсорбції бактерій на бентоніті культуральну рідину після виробничого біосинтезу подають у збірник, що допомагає забезпечити більшу виживаність бактерій в умовах сушки. До культуральної рідини додається розчин бентоніту 3 % у пропорції 1:1. Суміш відстоюють протягом 3 год.

#### *ТП 7.2. Центрифугування осаду*

Осад від стадії ТП 8.1 центрифугують при 3000 об/хв протягом 30 хв. При цьому отримують біомасу бактерій, адсорбованих на бентоніті, вологістю 70-80%.

### **ТП 8. Висушування біомаси бактерій**

#### *ТП 8.1. Додавання захисного розчину*

Отриману біомасу бактерій у збірнику змішують з захисним розчином, що містить 20% меляси і 1% тіосечовини, у співвідношенні 1:5.

#### *ТП 8.2. Вакуум-висушування біомаси бактерій*

Висушування здійснюється під вакуумом 10-13 кПа при 30-35°C до 2-5% залишкової вологості.

### **ТП 9. Стандартизація висушеної біомаси.**

Висушену біомасу стандартизують бентонітом до вмісту бактеріальних клітин 5 млрд КОЕ/г.

### **ПМВ 10. Фасування та пакування продукту**

Фасування здійснюється на фасувальних апаратах. Готовий продукт сухий Різобін фасується в поліетиленові пакети.

## РОЗДІЛ 7

### КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Кожні 4 години на виробництві відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси та кількості живих клітин (в КУО). Також відбирають проби для визначення вмісту джерел вуглецевого та азотного живлення.

#### 7.1. Визначення ефективності штаму

Ефективність штамів ризобій визначають за допомогою двох кількісних показників - конкурентна здатність та симбіотична ефективність.

Конкурентна здатність – це здатність досліджуваного штаму ризобій формувати бульбочки на коренях рослини-хазяїна в присутності інших штамів бактерій. Конкурентну здатність можна оцінити за допомогою серологічного методу. Окремі штами або групи штамів ризобій мають свою специфічну антигенну структуру. Ця властивість штамів використовується для їх серологічної ідентифікації.

Широке застосування в серологічних дослідженнях з бульбочковими бактеріями знаходить метод преципітації в агарі, який є найбільш зручним і надійним. Для цього здійснюють посів інокульованого насіння в ґрунт, що містить спонтанні раси бульбочкових бактерій того ж виду, що і досліджуваний штам, або здійснюють інокуляцію насіння штамами різної антигенної структури. Сформовані бульбочки стерилізують, роздавлюють в фізіологічному розчині та здійснюють посів на чашки Петрі. Змив з цих чашок використовують як антигени для серологічної ідентифікації культури. При позитивній реакції між штамом та антитілом на агарі формується лінія преципітації. Кількісно показник визначається відношенням між кількістю бульбочок, утворених досліджуваним штамом, та загальною кількістю

бульбочок.				<i>НУХТ БТЕК 04.01.11 КР ПЗ</i>				
<i>ЗМ</i>	<i>Арк.</i>	<i>№</i>	<i>Підп</i>	<i>Дата</i>				
<i>Разродник</i>	<i>Водяницька</i>	<i>ІС</i>			<i>Літ.</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Керівник</i>	<i>Буценко</i>					<i>53</i>	<i>60</i>	
<i>Н. контр</i>					<i>Кафедра БТМ</i>			
<i>Консульт</i>								
<i>Заб. каф.</i>	<i>Гладніков</i>							
<i>РОЗДІЛ 7</i>								

Також конкурентну здатність оцінюють методом генетичного маркування. Досліджувані штами ризобій культивують на середовищах з підвищеними концентраціями антибіотиків. При цьому відбувається адаптація штамів до підвищених доз антибіотику. При виділенні таких мутантів з бульбочок їх можна порівняно легко відрізнити від інших штамів за рахунок їх росту на середовищах з підвищеними дозами антибіотику.

Симбіотична ефективність – здатність створювати ефективний симбіоз і підвищувати продуктивність бобових культур. Цей показник можна оцінювати за допомогою польових методів, аналізуючи кількість та масу бульбочок, приріст наземної маси та коренів рослин, урожайність та якість зерна. Для статистичної обробки даних використовують стандартні методи дисперсного аналізу та аналізу параметрів генеральної сукупності.

Проте найбільш показовою характеристикою симбіотичної активності є їх нітрогеназна активність. Цей показник дає можливість отримати відносно об'єктивні показники активності бульбочкових бактерій. На даний момент для визначення активності азотфіксації широко використовують ацетиленовий метод. Для визначення азотфіксуючої активності даним методом культури бульбочкових бактерій інкубують в присутності ацетилену в герметично закритих посудинах і періодично визначається кількість утвореного етилену за допомогою газової хроматографії[14].

## **7.2. Визначення концентрації біомаси**

### **7.2.1. Визначення кількості життєздатних клітин продуцента**

КУО/мл визначали шляхом послідовних розведень 1:10 з NaCl 0,85%, культивували у твердому середовищі NFB з Конго-червоним при  $30 \pm 2$  °C протягом 48 год. Тверде середовище з Конго-червоним містить (г/л): 5,0 яблучна кислота; 0,5  $K_2HPO_4$ , 0,2  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 NaCl, 0,015  $FeCl_3$ , 0,3 дріжджового екстракту і 16,0 бактеріологічного агару. Кінцеві КУО / мл

визначали шляхом множення кількості колоній в чашці Петрі на коефіцієнт розведення[15].

### 7.3. Визначення біомаси

Оптичний (нефелометричний) метод визначення біомаси знайшов широке застосування в лабораторних мікробіологічних дослідженнях, оскільки дозволяє швидко і досить точно визначити концентрацію клітин в суспензії або культуральній рідині.

У основі методу лежить вимірювання зменшення кількості світла при його проходженні через суспензію клітин. У певних межах воно обумовлене переважно розсіянням світла клітками і пропорційно їх концентрації. Величина цього показника залежить від багатьох чинників (форми і розмірів клітин, оптичних властивостей культурального середовища, довжини хвилі падаючого світла і т. д.). Тому нефелометричний метод придатний лише для тихий мікроорганізмів, зростання яких викликає рівномірне помутніння середовища і не супроводжується помітною зміною форми і розмірів клітин, утворенням міцелію, плівок або інших скупчень. Живильне середовище для культивування мікроорганізмів, в якій передбачається визначати число клітин по світорозсіюванню, повинне бути оптично прозорим. Якщо каламутність середовища пов'язана з випаданням в осад деяких солей, найчастіше фосфатів, то перед вимірюванням світорозсіювання її підкисляють декількома краплями концентрованої соляної кислоти. Зміну інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі (звично в інтервалі 540—650 нм), при якій поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. Так, розсіяння світла, що викликається суспензією клітин в м'ясо - пептонному бульйоні або суслі, найбільш зручно вимірювати з червоним фільтром, при якому оптична густина таких середовищ мінімальна. При високих концентраціях клітин в культуральному середовищі відбувається вторинне розсіяння світла, що

приводить до отримання занижених результатів. Тому суспензії великої густини перед, вимірюванням світлорозсіювання слід розводити середовищем або водою. Розбавлення проб однієї і тієї ж культури різними рідинами неприпустимо, оскільки набухання і стиснення клітин впливає на величину світлорозсіюванні.

Правила роботи на фотоелектроколориметрі і порядок вимірювання величини світлорозсіювання детально висловлені в інструкції, прикладеній до приладу. У деяких випадках густину клітинної суспензії виражають в свідченнях нефелометра. Проте частіше будують калібрувальні криві залежності між величиною світлорозсіювання і числом клітин або сухою біомасою в одиниці об'єму. Для побудови калібрувальної кривої поступають таким чином. Вимірюють величину світлорозсіювання суспензій з різним змістом клітин і в кожній з їх визначають одним з вживаних методів кількість кліток або біомасу. Одержану залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат свідчення ФЕК, а на осі абсцис — кількість кліток, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л [16].

Біомасу визначали за оптичною густиною на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 600 нм з наступним перерахунком за калібрувальним графіком.

## ВИСНОВОК

1. Різобін – високоефективний бактеріальний препарат на основі комплементарних симбіотичних азотфіксувальних бактерій роду *Rhizobium* нешкідливих для людини і тварин.

2. *Rhizobium meliloti* – грамнегативна, азотофіксувальна бактерія. Колонії помірно-випуклі, слизисті, з часом розростаються і можуть розтікатись по поверхні агаризованого середовища. Штам є мікроаерофілом. Температурний діапазон його росту становить 25-28°C. Діапазон рН - 6,5-7,4. Катаболізм проходить гліколітичним шляхом.

3. Оптимізовано метод отримання сухого препарату за рахунок адсорбції бактерій на бентоніті перед сушінням, що дозволяє підвищити життєздатність бактерій при висушуванні, а, отже, і збільшити його ефективність.

4. Обрано ферментаційний апарат об'ємом 1000 л з механічним перемішуючим пристроєм та барботером, що дозволяє забезпечити необхідну річну продуктивність та забезпечує необхідні параметри культивування: рН=6,5-7,5; рівень аерації 0,8-1,2 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup>·хв; перемішування n=300-400 об/хв; τ =22-25 год, t=25-28°C.

5. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва сухого препарату різобіну в поліетиленових пакетах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Клонирование генома *Rhizobium meliloti* в векторах различного типа Т. Б. Румянцева, В. Н. Ерко\ Б. В. Симаров Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии 189620, Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
2. ISSN 2308-7099. Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 6 Н.А Воробей, С.Я. Коць 576.871.155.557
3. Liu Baoping, Zhou Junchu. Study on rhizobium inoculant. Hubei Agricultural Sciences. 2006; 45(1): 57–60.
4. Национальная академия наук Украины институт микробиологии и вирусологии ИМ. Д.К. Заболотного Д03680
5. Патент № UA (11)55432 (13)U ШТАМ БАКТЕРІЙ *SINORHIZOBIUM MELILOTI* T17 (ІМВ В-7282) ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД ЛЮЦЕРНУ
6. Национальная академия наук Украины институт микробиологии и вирусологии ИМ. Д.К. Заболотного Д03680.
7. М.В. Кривцова, М.В. Ніколайчук: «Екологія мікроорганізмів». Навчальний посібник. – 2011. – 184 с.
8. Клонирование генома *Rhizobium meliloti* в векторах различного типа Т. Б. Румянцева, В. Н. Ерко Б. В. Симаров Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии 189620, Институт физиологии растений и генетики НАН Украины.
9. Вирощування люцерни. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://agro-business.com.ua/agro/ahronomiia-sohodni/item/11982-osnovni-pytannia-vyroshchuvannia-liutserny.html>
10. Вирощування люцерни та її кормова цінність П. Ковбасюк, канд. с.-г. наук, доцент, НУБіП України. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://propozitsiya.com/ua/viroshchuvannya-lyucerni-ta-yiyi-kormova-cinnist>

11. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kyiv.agrotorg.net/ru/board/m-408689/inokulyant-rizofiks-lyutserna/>
12. Зеленая Л.Б., Коваленко Н.К., Полтавская О.А. Внутривидовое разнообразие бифидобактерий, колонизирующих желудочно-кишечный тракт человека // Микробиологічний журнал – 2011. – № 3. – С. 9-13.
13. Методичні настанови з дотримання вимог законодавства України щодо безпечності харчових продуктів у закладах ресторанного господарства. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.vosst.vn.ua/19-normatyvni-akty/182-metodychni-nastanovy-z-dotrymannia-vymoh-zakonodavstva-ukrainy-shchodo-bezpechnosti-kharchovykh-produktiv-u-zakladakh-restorannoho-hospodarstva-ukrkoopspilka>.
14. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
15. Симбіотичні властивості *Rhizobium meliloti* та продукування етилену рослинами люцерни на ранніх етапах формування симбіозу за різного водозабезпечення та обробки насіння лектином Л.М. Михалків, С.Я. Коць, А.В. Жемойда, Т.А. Коць *Інститут фізіології рослин і генетики НАН України*
16. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Промислова та екологічна біотехнологія" для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 51 с. Укладач: Корнієнко І. М.