

**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)

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

(підпис)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Віктор СТАБНИКОВ

(прізвище та ініціали)

« _____ » _____ 2024 р.

« _____ » _____ 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Біосинтез целовіридину культивуванням *Trichoderma viride*»

Виконала: здобувачка ЗБТ-5-1

АНТИПЕНКО Влада Вадимівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник: ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Людмила РЕШЕТНЯК

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь **бакалавр**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“30” жовтня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

АНТИПЕНКО Влади Вадимівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез целовіридину *Trichoderma viride*
керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, к.т.н., доц.,
затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-кс 2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Trichoderma viride*, цільовий продукт: целовіридин, геометричний об'єм ферментеру 10 м³, коефіцієнт заповнення – 0,6.
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)**РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ №3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ №4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ №5. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ №6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ №7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ №8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ №9. Автоматизація ділянки виробництва. РОЗДІЛ №10. Охорона довкілля.**
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема виробництва - 1 аркуш А2
Апаратурна схема виробництва – 1 аркуші формату А2

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| № | Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Строк виконання етапів роботи | Примітка |
|----|---|-------------------------------|----------|
| 1 | <i>Характеристика цільового продукту</i> | 30.10.2023-07.11.2023 | |
| 2 | <i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i> | 08.11.2023-12.11.2023 | |
| 3 | <i>Техніко-економічне обґрунтування</i> | 13.11.2023-23.11.2023 | |
| 4 | <i>Біосинтез цільового продукту</i> | 24.11.2023-30.11.2023 | |
| 5 | <i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i> | 01.12.2023-06.12.2023 | |
| 6 | <i>Специфікація обладнання</i> | 07.12.2023-11.12.2023 | |
| 7 | <i>Опис технологічної схеми</i> | 12.12.2023-24.12.2023 | |
| 8 | <i>Контроль виробництва</i> | 24.12.2023-07.12.2023 | |
| 9 | <i>Автоматизація ділянки виробництва.</i> | 07.12.2023- 15.01.2024 | |
| 10 | <i>Охорона довкілля</i> | 15.01.2024 - 22.01.2024 | |

Здобувач

_____ (підпис)

Влада АНТИПЕНКО

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ

РЕФЕРАТ

У даній роботі розглядається розробка технічної схеми культивування *Trichoderma viride* як продуцента целюлолітичного ферменту.

Основними моментами даної дипломної роботи є вибір продуцентів целюлолітичних ферментів і розробка технічної схеми культивування; було встановлено, що *Trichoderma viride* Rut C30 є найкращим продуцентом целюлолітичного ферменту. Описано характеристики бпродукту та його застосування, визначено склад середовища (г/л) для *T. reesei* Rut C30: висівки - 60; NaNO₃ - 2; K₂HPO₄ - 2; MgSO₄·7H₂O - 0,5; FeSO₄·7H₂O - 0,01; KCl - 0,5.

Технічний процес і його опис подано в цій роботі. Процес складається з допоміжних робіт (приготування титраційного розчину, приготування посівного матеріалу, приготування поживного середовища) та основних технічних завдань (приготування поживного середовища, біосинтез продукту).

Дипломний проект складається із 68 сторінок друкованого тексту, в тому числі 12 таблиць та 16 літературних джерел.

Ключові слова: *Trichoderma viride*, Целовіридин, культивування, біосинтез, технологічна схема, контроль виробництва.

ЗМІСТ

ВСТУП

| | |
|---|-----------|
| РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту | 7 |
| РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристик біологічного агента | 10 |
| 2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування | 10 |
| 2.2. Морфолого-культурні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента | 13 |
| 2.3. Таксономічний статус біологічного агента | 17 |
| РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування | 18 |
| 3.1. Потреба у цільовому продукті | 18 |
| 3.2. Розрахунок потужності виробництва | 20 |
| 3.3. Розрахунок об'єму ферментатора та кількості виробничих циклів | 20 |
| 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу | 21 |
| 3.5. Біосинтез цільового продукту | 22 |
| 3.5.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента | 22 |
| 3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт | 23 |
| РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми | 24 |
| 4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментатора | 24 |
| 4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря | 26 |
| 4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів | 29 |
| 4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища | 33 |
| РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання | 34 |
| РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми | 37 |
| РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва | 49 |
| 7.1. Карта постадійного контролю деферментаційних процесів | 49 |
| 7.2. Мікробіологічний контроль | 52 |
| 7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 7.3.1. Концентрація біомаси | 52 |
| 7.3.2. Концентрація цільового продукту | 53 |
| 7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту | 56 |
| РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля | 59 |
| 8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцях емісії твердих, рідких та газоподібних відходів | 59 |
| 8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва | 60 |
| 8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів | 60 |
| 8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів | 60 |
| 8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів | 62 |
| 8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів | 62 |
| ЛІТЕРАТУРА | 67 |

ВСТУП

Біотехнологія є одним з пріоритетних напрямів науково-прикладного розвитку суспільства в 21 столітті і визначається як сукупність технологій, що використовують живі клітини і біологічні молекули для вирішення проблем і виробництва корисних продуктів.

Виявлення нових продуцентів кормових і харчових білків та різноманітних біологічно активних речовин і розробка наукових основ їх культивування на організмовому та клітинному рівнях є актуальним завданням сучасної біотехнології. Дослідження в галузі експериментальної мікології, зокрема фізіології та біохімії вищих грибів, дозволили віднести гриби до перспективних біотехнологічних мішеней. Багато з них відомі не лише як продуценти харчових білків, але й біологічно активних речовин з широким спектром дії (протиракові, антимікробні, фібринолітичні, фітотоксичні, коагулюючі молоко).

Біотехнологічні процеси за участю мікроорганізмів і ферментів вже широко використовуються в харчовій промисловості на сучасному рівні розвитку технологій. Промислове культивування мікроорганізмів, тваринних і рослинних клітин використовується для виробництва багатьох цінних сполук, таких як ферменти, гормони, амінокислоти, вітаміни, антибіотики, метанол і органічні кислоти. Багато промислових технологій замінюються ферментами та мікроорганізмами [9].

Ферменти як біокаталізатори багатьох біохімічних реакцій і процесів в цілому знаходять застосування в різних галузях промисловості, сільському господарстві, медицині та побутовому обслуговуванні.

Потенціал широкого використання ферментів для покращення багатьох технологічних процесів та важлива роль ферментів у метаболізмі організмів зумовлюють необхідність організації промислового виробництва ферментних препаратів.

| | | | | | | | | |
|-----------|------|--------------|--------|------|--------------------------|------------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР | | | |
| | | | | | | | | |
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | | Антипенко В. | | | Вступ | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Воронцов О. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В. | | | | | | |
| | | | | | | 6 Кафедра БТМ | | |

Актуальність. Ферменти широко використовуються як добавки до кормів для тварин і птахів, преміксів і комбікормів. Використання ферментів для покращення перетравлення кормів набуває все більшого значення в останні роки. Важливість використання целюлозолітичних ферментних препаратів у тваринництві зумовлена низькою активністю травних ферментів у тварин різного віку та їх нездатністю розщеплювати целюлозовмісні частини корму.

Ферментний препарат Целовіридин Г10х може бути використаний для розщеплення целюлози та інших складних полісахаридів соломи до простих цукрів, які легко засвоюються організмом тварин. В результаті підвищується продуктивність, збільшується фактична поживність корму, знижуються витрати корму на одиницю продукції та швидко збільшується маса тіла.

Тому виробництво целюлозолітичних ферментів має особливе значення для сільського господарства, як і ферментний препарат Целловіридин G10х, про який мова піде нижче [4].

Новизна роботи. Даний продуцент, може бути використаний для виробництва ферментного препарату Целовіридин. Ферментний препарат, отриманий на основі штаму *T. reesei* Rut C30 [5], є більш економічно ефективним у промисловому виробництві [6].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Церовіридин Г10х - це препарат, отриманий шляхом глибинного культивування *Trichoderma viride*. Він містить комплекс ферментів, включаючи целюлазу, ксиланазу, глюканазу та глюкоамілазу. Однак основою препарату є целюлаза. Залежно від її целюлозолітичної активності розрізняють три види цього препарату: 2000 од/г, 1000 од/г і 200 од/г [4].

Целюлази дуже специфічні і їхня дія проявляється в деполімеризації молекули целюлози. Целюлази зазвичай використовуються у вигляді комплексів, які гідролізують целюлозу до глюкози. Вони використовуються в медичній промисловості для виділення стероїдів з рослин, в харчовій промисловості для поліпшення якості рослинних олій і в сільському господарстві як добавка до кормів для жуйних тварин.

Згідно з номенклатурою ферментів, до целюлаз, які беруть участь у розщепленні целюлози, належать

1) 1,4- β -D-глюкан-4-глюканогідролаза (КФ 3.2.1.4) - ендоглюканаза, яка безладно гідролізує целюлозу зерна, риценін і β -глюкан.

Це ендоглюканаза, яка може гідролізувати зернові β -1,4-зв'язані β -глюкани у невпорядкований спосіб і може утворювати в реакційному розчині глюкозу і целотреозу на додаток до целюлози і целотреози;

2) 1,4- β -D-глюканглюкогідролаза (КФ 3.2.1.74) - екзо-1,4- β -глюкозидаза, яка гідролізує 1,4-зв'язки 1,4- β -D-глюкану, послідовно відщеплюючи залишки глюкози;

3) 1,4- β -D-глюканцелобіогідролаза (КФ 3.2.1.91) - целобіогідролаза, яка відщеплює целобіозу з невідновного кінця целозоолігосахаридів;

4) β -D-глюкозидглюкогідролази (КФ 3.2.1.21) - β -глюкозидази або целобіази, які гідролізують кінцеві невідновлювальні залишки β -D-глюкозиду і целобіози.

| | | | | | | | | |
|-----------|--------------|----------|--------|------|--|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР | | | |
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | Антипенко В. | | | | ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | Воронцов О. | | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Конгр. | | | | | | | | |
| Затверд. | Стабніков В. | | | | | Кафедра БТМ | | |
| | | | | | | 8 | | |

Процес ферментативної дії целюлаз до кінця не вивчений. У літературі існує кілька варіантів, що відрізняються лише деталями.

Суть процесу ферментативної деструкції целюлози можна звести до трьох основних стадій:

1) Перетворення нерозчинної целюлози в розчинну (C1-фактори і, в деяких випадках, C2-ферменти);

2) гідроліз розчинної целюлози до целодекстринів і целобіози (C3- або Cx-ферменти); і

3) розщеплення низькомолекулярних сполук до глюкози (екзоглюконази, β -глюкозидази) [6].

Основна ферментативна активність ксиланаз полягає у специфічному руйнуванні структурних компонентів клітинної стінки, таких як розчинні та нерозчинні арабіноксилани, вперше виявлені у пшениці, житі та побічних продуктах переробки цих зерен. Ксиланози можуть витримувати звичайні умови старіння за умови, що продукт не піддається впливу високих температур протягом тривалого періоду часу, наприклад, при кондиціонуванні. Якщо при виробництві кормів використовуються високі температурні умови, рекомендується обприскувати гранули, щоб уникнути значної втрати активності [2].

Глюканаза (β -глюканаза) - фермент, який розщеплює полісахариди, глюкани, що входять до складу клітинних стінок рослин. Глюкан належить до групи геміцелюлаз. Глюканози використовуються у виробництві пива для швидкого і повного руйнування глюканів у ячмені. Ячмінь містить власні глюканози, але їхньої кількості недостатньо для повного руйнування власних глюканів рослини. Глюканози входять до складу багатьох кормових добавок для поліпшення перетравлення рослинної їжі в шлунково-кишковому тракті тварин.

Глюкоамілаза або β -амілаза (α -1,4-глюкан-глюкогідролаза) сприяє гідролізу 1,4-глюкану в молекулах крохмалю, олігосахаридів і навіть дисахаридів (наприклад, мальтози) і невідновленого кінця молекули (вільні альдегідні або глікозидні гідроксильні групи не включаються) послідовно відщеплювати залишки глюкози. Якщо в молекулі полісахариду є розгалуження, дія амілази призупиняється. Шокоамілаза сприяє гідролізу глікогену, а також крохмалю [4].

Гістологічні, фізико-хімічні та мікробіологічні показники ферментного препарату визначають згідно з ГОСТ 20264.1-89 [28].

Табл. 1.

Органолептичні показники Целовіридину Г10х

| Назва показника | Характеристика |
|------------------|---|
| Зовнішній вигляд | Порошок |
| Запах | Чистий, без запаху міцелію. |
| Колір | Від світло-кремового до світло-коричневого. |

Табл. 1. 2.

Фізико-хімічні показники препарату

| Назва показника | Характеристика |
|-----------------|----------------------|
| Вологість | 10 -12% |
| Активність | 2000, 1000, 200 од/г |

Табл. 1. 3.

Мікробіологічні показники препарату

| Назва | Норма, КУО/г |
|-------------------------------------|-------------------|
| Загальна бактеріальна обнасіненість | $0,7 \times 10^5$ |
| Спори грибів | Не допускається |

Товарна форма: мішки паперові.

Маса нетто: 15 кг.

Умови зберігання: зберігають в закритій тарі, уникаючи потрапляння прямих сонячних променів, при температурі $-25 \dots +25^\circ\text{C}$.

Термін придатності: – 12 місяців.

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Ферментні препарати використовуються для покращення біодоступності кормів для тваринництва. Існує велика різноманітність ферментних препаратів для кормів для тварин, починаючи від препаратів з однією активністю і закінчуючи препаратами зі змішаною активністю.

У тваринництві в основному використовуються ферменти, що належать до класу гідролаз, такі як амілолітичні, протеолітичні та пектолітичні ферменти. Лікарські препарати стандартизуються відповідно до активності основних ферментів.

На відміну від гормонів і біостимуляторів, ферменти не накопичуються в організмі або в продуктах тваринного походження і не стають частиною кінцевого продукту через різні механізми дії на організм тварин [20, 22]. Травний тракт тварин і птиці виробляє власні ферменти, які використовуються для перетравлення поживних речовин корму. Травні залози виробляють достатню кількість пепсину, трипсину, амілази, ліпази та інших травних ферментів, але дорослі тварини можуть перетравлювати лише до 60-70% поживних речовин у кормі. Відомо, що молоді тварини народжуються з недорозвиненою травною ферментною системою [30]. Основними концентратами, що використовуються у тваринництві, є ячмінь, овес, жито, неїстівна пшениця та продукти їх переробки. Овес і ячмінь містять 9-12% і 4-7% клітковини відповідно, але при луценні зерна вміст клітковини зменшується до 2,5-3,5% в ячмені і 4-4,5% в вівсі.

В таблиці наведений опис різних мікроорганізмів, що застосовуються для створення біопрепаратів.

| | | | | | | | | |
|-----------|--------------|----------|--------|------|---|---------------------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР | | | |
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | Антипенко В. | | | | ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | Воронцов О. | | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | Стабніков В. | | | | | | | |
| | | | | | | Кафедра БТМ ¹¹ | | |

Характеристика продуцентів та їх поживних середовищ

| Штам | Склад поживного середовища, г/л | Особливості культивування | Кількість ферменту | Тривалість процесу | Використана література |
|---|--|--|--------------------|--------------------|------------------------|
| <i>T. reesei</i> Rut C30 | Висівки-60; NaNO ₃ -2; K ₂ HPO ₄ - 2; MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,5; KCl -0,5; FeSO ₄ *7H ₂ O - 0,01 | Вирощування здійснюється в колбах на качалці при 220об/хв впродовж 72 годин при температурі 26 °С. | 21,8 | 96 год | 12 |
| <i>T. reesei</i> ZU-02 | Пептон – 3; Сахароза – 5; Кукурудзяний екстракт – 10; NaNO ₃ -2 Висівки-25; | Культивування здійснюється при аеруванні в об'ємному співвідношенні 1:3. Температура культивування 28° С | 22,2 | 72 год | 5 |
| <i>T. veride</i> Pers ex S.F.Gray 16 | Сірчаноокислий гідролізат БВК - 70 мл; Гліцерин - 30 мл Двозаміщений фосфат калію - 0,5 г Однозаміщений фосфат калію - 0,5г Сірчаноокислий магній 7-водний - 0,25 г Сірчаноокислий амоній - 3,0 г | Культивування здійснюється в глибинним способом за температури 30 °С. | 8 | 40 год | 2 |

За наведеними в таблиці 2.1 даними, можна зробити висновок, що різниця виходу по целюлази різна.

Найвищий показник по кількості ферменту спостерігається у гриба роду *T.*

reesei Rut C30, тривалість культивування 96 годин, а сам склад поживного середовища є коштовнішим за використання інших штамів [5].

Гриб *T. reesei* ZU-02 синтезує лише 21 од/л даного ферменту при тривалості культивування 72 години [9].

Гриб *T. veride* Pers ex S.F.Gray 16 утворює 8 г/л ферменту.

Таблиця 2.2.

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

***T. reesei* Rut C30 та *T. reesei* ZU-02**

| Продуцент | Компонент поживного середовища, г/л | Ціна компонента, грн./кг | Вартість компонента (грн) на 1 л середовища | Джерело інформації * |
|---|---|--------------------------|---|--|
| <i>T. reesei</i> Rut C30 | Висівки-60; | 15 | 0,75 | www.flagma.ua www.prom.ua www.himprom.com.ua www.prom.ua www.himprom.com.ua www.nevareaktiv.ua |
| | NaNO ₃ -2; | 6,7 | 0,4 | |
| | K ₂ HPO ₄ – 2; | 15,6 | 0,08 | |
| | MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,5; | 30,6 | 0,18 | |
| | KCl -0,5; | 3,86 | 0,004 | |
| FeSO ₄ *7H ₂ O - 0,01 | 6 | 0,0015 | | |
| Вартість 1 л середовища – 1,5 грн | | | | |
| <i>T. reesei</i> ZU-02 | Пептон – 3; | 1 | 0,02 | www.prom.ua www.prom.ua www.ua.all.biz www.prom.ua www.himprom.com.ua www.prom.ua |
| | Сахароза – 5; | 6,7 | 0,08 | |
| | Кукурудзяний екстракт – 10; | 4,9 | 0,0098 | |
| | NaNO ₃ -2 | 30,6 | 0,306 | |
| | Висівки-25; | 15,6 | 0,08 | |
| Целюлоза мікрокристалічна - 20 | 458 | 9,16 | | |
| Вартість 1 л середовища – 9,67 грн | | | | |

Примітка. * – Ціни наведено станом на квітень 2023 р.

Однак можна зробити висновок, що середня вартість *T. reesei* ZU-02 у шість разів вища, ніж в інших штамів. Далі розраховується умовна вартість 1 мг цільового продукту для обраних штамів (табл. 2.3).

**Умовна вартість 1 мг цільового продукту (целюлолітичного ферменту) при
культивуванні *T. reesei* Rut C30 та *T. reesei* ZU-02**

| Біологічний агент | Вартість 1 л середовища, грн | Целюлазна активність, од/мл | Умовна вартість одиниці целюлазної активності, грн/од | Тривалість культивування, год | Кількість утворених одиниць целюлази за годину, од/год |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| <i>T. reesei</i> Rut C30 | 1,5 | 21,8 | 0,068 | 96 | 0,72 |
| <i>T. reesei</i> ZU-02 | 9,67 | 22,2 | 0,43 | 72 | 0,46 |

Із двох перспективних штамів-продуцентів целюлолітичного комплексу ферментів продуктивнішим є *T. reesei* Rut C30, але він має більший час культивування за *T. reesei* ZU-02 на 18 годин і, відповідно, кількість утвореного фермента за годину буде меншою на 0,26 мг/год. Умовна вартість 1 мг цільового продукту для *T. reesei* Rut C30 вища в 6 разів, тому для подальшого аналізу обрано саме цей штам.

Узагальнивши наведені дані, можна зробити наступний висновок: доцільніше використовувати для одержання препарату целюлази саме *T. reesei* RutC30.

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

Морфолого-культуральні ознаки

Міцелій *T. viride* добре розвинений і водянистий. Грибниця відокремлена, розгалужена і гладенька. Середній діаметр міцелію 6-10 мкм; на щільних середовищах колонії утворюються до формування повітряного міцелію, поширюються від центру і мають плоску поверхню. Через 35-40 годин після посіву повітряний міцелій набуває білуватого, майже сірого кольору [15].

У зрілих зразків репродуктивні органи, конідієносці, в середньому мають 50-60 мкм заввишки і 4-4,5 мкм в діаметрі в центрі. Меристема сильно розгалужена і дещо компактно подушкоподібна. Дві-три, іноді одна, гілки відходять під широким кутом від головної осі гіллястого ворсу. Гілки не чітко розрізняються за

своїм положенням. Кінці меристематичних гілочок закінчуються стерильними гілочками, на кожній гілочці не більше трьох стерильних гілочок. Меристеми утворюються по одній і послідовно формують більш-менш кулясті головки. Їх розмір також не є постійним, з довжиною 7-12 мкм і діаметром 2-5 мкм у найтовстішій частині.

На верхівці знаходиться головка конідієносця розміром близько 70 мкм, що складається з сукупності конідієносцевих спор. Найдрібніші спори здебільшого кулясті, рідше еліпсоїдні. Зовнішня поверхня оболонки дрібнозерниста і блідо-зеленувата, якщо розглядати їх окремо під мікроскопом, але темно-зелена в сукупності і має розмір 3-4 мкм, деякі 3,5-4,5 мкм [16].

Для вирощування *T. viride* в лабораторних умовах використовують рідкі та концентровані поживні середовища (переважно на основі пивного суслу або картопляного відвару), а також різноманітні природні матеріали (рис. 2.1). У рідких середовищах бактерії культивують як методом занурення, так і методом поверхневого культивування.



Рис. 2.1. Культура *Trichoderma viride* на щільному поживному середовищі (глюкозо-картопляний агар).

В умовах поверхневого культивування грибів *Trichoderma* всі стадії циклу розвитку протікають нормально і безперервно: спочатку проростають спори. Спочатку спори проростають. Грибниця розростається і утворює ватоподібну грибницю, а коли її основна маса розташовується на поверхні середовища,

починається формування аерованого міцелію з подальшим утворенням газону з плодових тіл. З часом утворюється суцільна плівка товщиною 2-3 мм. При цьому способі культивування міцеліальна маса концентрується на поверхні середовища, де забезпеченість киснем найвища. Глибинне культивування здійснюється за допомогою обертової качалки. Оскільки кисневий режим у середовищі є однією з основних умов нормального розвитку гриба, глибинне культивування сприяє швидкому розвитку і швидкому накопиченню біомаси. При культивуванні *T. viride* на щільних поживних середовищах субстратний міцелій швидко розвивається з точки росту. Цей міцелій є дернистим і розгалуженим і не виходить на поверхню на ранніх стадіях росту. Через добу повітряний міцелій піднімається на поверхню середовища. При глибинному культивуванні було виявлено, що *T. viride* зазнає вікових змін протягом періоду розвитку [16].

Природа поживних речовин у середовищі має значний вплив на якісний та кількісний стан гриба. Так, при статичному культивуванні середовища, що містять галактозу або глюкозу, призводять до вищого виходу біомаси, тоді як крохмаль призводить до вищого виходу біомаси в умовах глибинного культивування. У дослідженні джерел азотних поживних речовин найкращі результати накопичення біомаси були отримані, коли в середовищі був присутній пептон [16].

Розмноження. Статевий процес відсутній, *T. viride* розмножується за допомогою міцелію (диференційованої грибниці), на якому утворюються ектопаразити (спори). Хвилинна гіфа починає утворюватися через 70-75 годин після посіву. Конідієносці формуються рівномірно по всій поверхні і мають круглу форму з концентрацією кільцеподібних носіїв конідієносців (рис. 2.2). Дернина має світло-блакитно-зелене забарвлення, але з часом темно-зелений колір стає домінуючим.

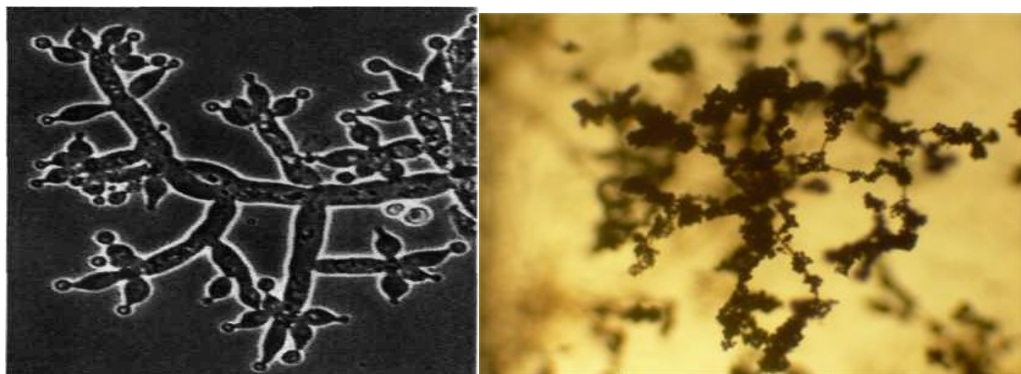


Рис. 2.2. Мікрофотографія конідієносців і спор *Trichoderma viride*

У нормальних умовах спори набухають і збільшуються в об'ємі, в середині спори видно грануляції. Спори з гладкою поверхнею виростають до ледь помітного розміру і швидко подовжуються, утворюючи міцелій. Довжина міцелію стає рівною діаметру материнської спори, а часто й перевищує його. Таким чином, спори проростають, і утворюються молодий міцелії [16].

Фізіолого-біохімічні ознаки

На ріст і фізіологічну активність грибів впливає низка факторів навколишнього середовища, включаючи температуру, кислотність, аеробність середовища, світло, вологість, тиск і концентрацію кисню в навколишньому середовищі.

Гриби *T. viride* є типовими ротифікаторами і використовують глюкозу, ксилозу, галактозу, арабінозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, декстрин і крохмаль як джерела вуглецю. Крім вуглеводів, також використовуються багатоатомні спирти та солі органічних кислот. Щодо азоту, було відмічено, що *T. viride* найкраще засвоює амонійний азот, частково KNO_3 . Щодо мінерального живлення, в літературі повідомляється, що сполуки натрію, калію і особливо кальцію сприяють росту, а розвиток культури залежить від наявності в середовищі сульфату магнію.

Температура: ріст і розмноження *T. viride* визначаються температурними умовами. Температурні межі розвитку досить широкі, причому нижня температурна межа для ініціації розвитку значно нижча, ніж для інших грибів (оптимальна температура 25-30°C); вище 30°C ріст значно сповільнюється, колонії не утворюють повітряної міцелії, а поверхня іноді стає зморшкуватою і слизовою. Низькі температури також несприятливі: при 12°C *T. viride* росте дуже повільно, при 5-6°C розвиток міцелію відбувається дуже повільно, а повітряні міцелії та спорангії з'являються значно пізніше [15].

Кислотність середовища. Одним з найважливіших факторів, що сприяють нормальному розвитку триходерми, є концентрація водневих іонів (рН). Якщо рН середовища змінюється в несприятливому напрямку, організм припиняє ріст,

навіть якщо інші умови є оптимальними; *T. viride* добре розвивається при рН 4-5 і може розвиватися в середовищах з низькою кислотністю, наприклад, при рН 3,1 або 1,5 [15].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Згідно з класифікацією грибів, розробленою в 70-х - на початку 80-х років ХХ століття, *Trichoderma viride* належить до грибів (Eumycota) і підрозділяється на сім класів. *Trichoderma viride* належить до дейтеромицетів (Deuteromycetes) і є представником роду *Trichoderma* (назва вперше введена в мікробіологію С. Н. Персоном (1794) і С. О. Гарцем (1871)). Рід поділяється на дев'ять видів (за класифікацією М. А. Ріфаї): *T. piluliferum* Webs., Rif., 7". polysporum (Link ex Pers), *T. hamatum* (Bon) Bain, *T. roningii* Oud., *T. aureoviride* Rif., *T. harzianum* Rif., *T. longibrachiatum* Rif., *T. pseudokoningii* Rif., *T. viride* Pers ex S. F. Grey [17]. Grey [17].

Згідно з класифікацією Хоксуорта, *T. viride* належить до царства Fungi, відділу Mitotic fungi, куди входять дейтеромицети *Trichoderma* [17].

Нині існує нова наукова класифікація грибів Айнсворта [18], згідно з якою *Trichoderma viride* класифікується таким чином:

Царство: *Fungi*
Відділ: *Ascomycota*
Клас: *Sordariomycetes*
Підклас: *Hypocreomycetidae*
Порядок : *Hypocreales*
Родина: *Hypocreaceae*
Рід: *Trichoderma*
Вид: *viride*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Целловіридин - ферментний препарат, призначений для використання у тваринництві як добавка до кормів, комбикормів і преміксів, а також в інших галузях, де необхідний гідроліз целюлозовмісних субстратів.

Сьогодні світовий ринок ферментних препаратів зростає як в натуральному, так і у вартісному вираженні. Незважаючи на постійне підвищення активності ферментів (що передбачає зміну швидкості споживання ферментів), продажі ферментних препаратів зростають у фізичному обсязі.

Понад 90% потреби галузі у ферментних препаратах задовольняється за рахунок імпорту. На українських виробників припадає менше 10% від загального обсягу. При цьому вітчизняне виробництво скорочується протягом останніх трьох років через сильну конкуренцію з боку іноземних компаній. Іноземні компанії пропонують широкий асортимент продукції, що постійно вдосконалюється. Як зазначають споживачі ферментних препаратів, якісні характеристики продукції, яку пропонують найбільші західні компанії, виправдовують високі ціни на ці препарати [1].

Експорт ферментних препаратів здійснюється в невеликих обсягах, представлений як продукцією українських компаній, так і іноземними ферментними препаратами.

Результати дослідження ринку ферментних препаратів для сільського господарства у 2020-2022 рр. дозволяють вказати на важливі особливості цієї галузі:

1. Використання ферментних препаратів комплексної дії. Замість окремих ферментів використовуються ферментні комплекси (мультиферментні композиції), які є набагато ефективнішими. Для кукурудзяного, пшеничного та соєвого корму потрібен один тип ферменту, а для ячмінного, пшеничного та соняшникового - інший.

| | | | | | | | | |
|-----------|------|--------------|--------|------|--|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР | | | |
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
| Розроб. | | Антипенко В. | | | ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Воронцов О. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | 19 | | |
| Н. Контр. | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| Затверд. | | Стабніков В. | | | | | | |
| | | | | | | | | |

Наразі на українському ринку доступні мультиензимні комплекси з різними комбінаціями ферментів.

2. Частка високоактивних ферментних препаратів зростає, і попит на них надходить переважно від промислових виробників преміксів і комбікормів з більш досконалою технологією змішування. Попит на високоактивні ферментні препарати зростатиме з розвитком вітчизняного виробництва преміксів та комбікормів.

3. Приблизно 25% ринку ферментних препаратів споживається безпосередньо тваринниками, які мають невеликі потужності з виробництва комбікормів.

Безпосередньо споживається тваринниками з невеликими потужностями з виробництва комбікормів.

4. Особливістю дифузії ферментних препаратів є те, що деякі споживачі шукають комплексну послугу. Споживачі купують не ферменти, а послуги для "тваринництва". Це означає, що продавцям ферментів доводиться підбирати і розраховувати корми, оцінювати результати промислових випробувань тощо.

Наразі на ринку ферментів є кілька основних компаній (частка ринку): Novozymes A/S (47 %), SMS (45 %), Danisco A/S (21 %), Alltech Ltd (7 %), ShandongLongda Bio-Products Co (10 %), KeminEuropa N.V. (5 %), ТОВ "Ензим" (10 %).

Споживачами продукту є птахо- і тваринницькі ферми, виробники комбікормів і преміксів, зернові господарства, тепличні комбінати, овочеві господарства, спиртові заводи, підприємства легкої промисловості, шкіряної промисловості, виробники синтетичних миючих засобів, нафтовидобувні та нафтопереробні компанії, природоохоронні організації та медичні установи [5-9].

Бажано виробляти целовіридин G3X в Україні для таких галузей, як виробництво спирту та виробництво кормів. Це пов'язано з тим, що попит на целюлази в цих галузях є високим, і перевага надається вітчизняним продуктам завдяки таким перевагам, як низька ціна, задовільна якість та пристосованість до вітчизняної сировини, що використовується у виробництві кормів.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Департамент агропромислового розвитку Київської обласної державної адміністрації повідомив про поголів'я великої та дрібної рогатої худоби, свиней та курей, що утримуються в Київській області. Цього року поголів'я великої рогатої худоби в усіх господарствах склало 143,1 000 голів.

Поголів'я великої рогатої худоби в усіх господарствах становило 70,4 тис.

голів, з яких 34,5 тис. утримувалося в сільськогосподарських підприємствах; станом на 1 липня 2021 року поголів'я свиней в усіх господарствах становило 510,6 тис. голів, з яких 373,3 тис. утримувалося в сільськогосподарських підприємствах.

Крім того, поголів'я овець та кіз налічувало 39,1 тис. голів, а птиці - 29,4 млн. голів.

Тип корму та його кількість на добу залежить від виду худоби (велика рогата худоба чи свині), віку (молодняк чи доросла худоба), фізіологічного стану (дійні корови чи сухостійні), а також наявності та кількості кормів у господарстві.

Витрата ферментного препарату Целовіридин: на корм - 30 г/т (все поголів'я тварин); на корм - 30 г/т (все поголів'я тварин). У цьому проекті розглядаються лише раціони для великої рогатої худоби та свиней. Споживання корму становить приблизно 10 кг/добу на одну тварину. Отже, $70,4 + 510,6 = 590$ тис. голів корів та свиней.

Річна витрата кормів становить: $590000 * 10 * 365 = 2153500000$ кг, або 2153500 т.

Кількість ферментного препарату буде становити: $2153500 * 0,003 = 6460,5$ кг.

Препарат являє собою висушений фільтрат культуральної рідини. Річний об'єм культуральної рідини буде: $V_{\text{кр}^{\text{річ}}} = 6460,5 * 1/0,4 = 125 \text{ м}^3$.

3.3. Розрахунок об'єму ферментатора та кількості виробничих циклів

1.1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 184. Ефективний фонд робочого часу $\text{Неф.} = 184 * 24 = 4416$ год.

1.2. Розрахуємо цикл роботи ферментатора:

$$\text{Тцф} = \text{Тф} + \text{Тдр} = 96 + 10 = 106 \text{ (год)}, \text{ де}$$

Тф – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

Тдр – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

1.3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{ц} = N_{еф.} / T_{цф} = 4416 / 106 = 41,6$$

1.4. Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{кр}^{н} = V_{кр}^{рiч} / n_{ц} = 125 / 41,6 = 3 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментатор об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення $K_з = 0,6$.

Об'єм культуральної рідини становить $V_{к.р} = 0,6 \text{ м}^3$, що більше за розрахований.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментаторі об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення, $0,6$.

Робочий об'єм ферментатора ($V_{роб}$) визначають за формулою:

$$V_{роб.} = V_{г.ф.} \times K_{зап.}, \quad (2.1)$$

де: $V_{г.ф.}$ – геометричний об'єм ферментатора;

$K_{зап.}$ – коефіцієнт заповнення, $0,6$.

$$V_{роб.} = 5 \times 0,6 = 3 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 3 м^3 культуральної рідини потрібно:

$$V_{роб.1} = 3 \times 0,1 = 0,3 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Для одержання $0,3 \text{ м}^3$ культуральної рідини треба мати:

$$V_{роб.2} = 0,3 \times 0,1 = 0,03 \text{ м}^3 \text{ (30 л) посівного матеріалу.}$$

6 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{роб.3} = 30 \times 0,1 = 3 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу одержують культивуванням культури в качалочних колбах об'ємом $0,75 \text{ дм}^3$. Кількість колб – 5 шт.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу целовіридину у ферментаторі об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення

0,6 буде проходити у 3 етапи.

3.5. Біосинтез цільового продукту

3.5. 1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії (субстратом росту) в середовищі *T. viride* є сахароза, основний компонент висівкового борошна. Сахароза - це олігосахарид, що складається з двох моносахаридів, D-глюкози та D-фруктози, з'єднаних 1-4 глікозидними зв'язками [23].

Сахароза катаболізується шляхом перетворення цього цукру на α -D-глюкозу з подальшим включенням останньої в шлях Ембдена-Мейерхофа-Парнака, тобто гліколіз. Усі гліколітичні реакції, за винятком кіназної, повністю оборотні.

Першим кроком є перетворення сахарози на α -D-глюкозу (С.Ф. 3.2.1.108). Потім слідує перетворення α -D-глюкози на α -D-глюкозо-6-фосфат, яке бере участь у гліколізі та каталізується ферментом гексокіназою (С.Ф. 2.7.1.1). За допомогою важливого ферменту глюкозо-6-фосфат-ізомерази (С.Ф. 5.3.1.9) α -D-глюкозо-6-фосфат перетворюється на β -D-фруктозо-6-фосфат.

Потім 6-фосфофруктокіназа (С.Ф.2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктоза-6-фосфату на β -D-фруктоза-1,6-фосфат, який під дією фруктозодифосфат-редуктази (С.Ф.4.1.2.13) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат.

Фермент гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (К.Ф. 1.2.1.12) потім бере участь у перетворенні гліцеральдегід-3-фосфату на 3-фосфо-D-гліцериїлфосфат, який перетворюється на 3-фосфогліцеринову кислоту, фосфогліцеролат кіназою (К.Ф. 2.7.2.3). Кіназа перетворюється на 3-фосфогліцеринову кислоту. Далі перетворення 3-фосфогліцеринової кислоти на 2-фосфо-D-гліцеринову активується фосфогліцерат-мутазою (КФ 5.4.2.12) і перетворюється на фосфоенолпіруват під дією енолази (КФ 4.2.1.11).

Останнім етапом гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40). Піруват є дуже важливим проміжним продуктом енергетичного обміну і включається в цикл трикарбонових кислот, перетворюючись на ацетил-КоА в присутності кисню. Усі процеси та ферменти циклу трикарбонових кислот локалізовані в мітохондріях [19].

Крім того, піруват перетворюється на 2-гідроксіетилтіаміндифосфат за допомогою піруватдекарбоксилази (ЕС 4.1.1.1) і на ацетальдегід за допомогою того самого ферменту. Потім фермент NADPH+-альдегіддегідрогеназа (CF 1.2.1.5) каталізує перетворення ацетальдегіду в оцтову кислоту, яка перетворюється на ацетил-КоА-синтазу (CF 6.2.1.1).

Ацетил-КоА бере участь у трьох циклах карбонових кислот (цикл Кребса) [19].

3.5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

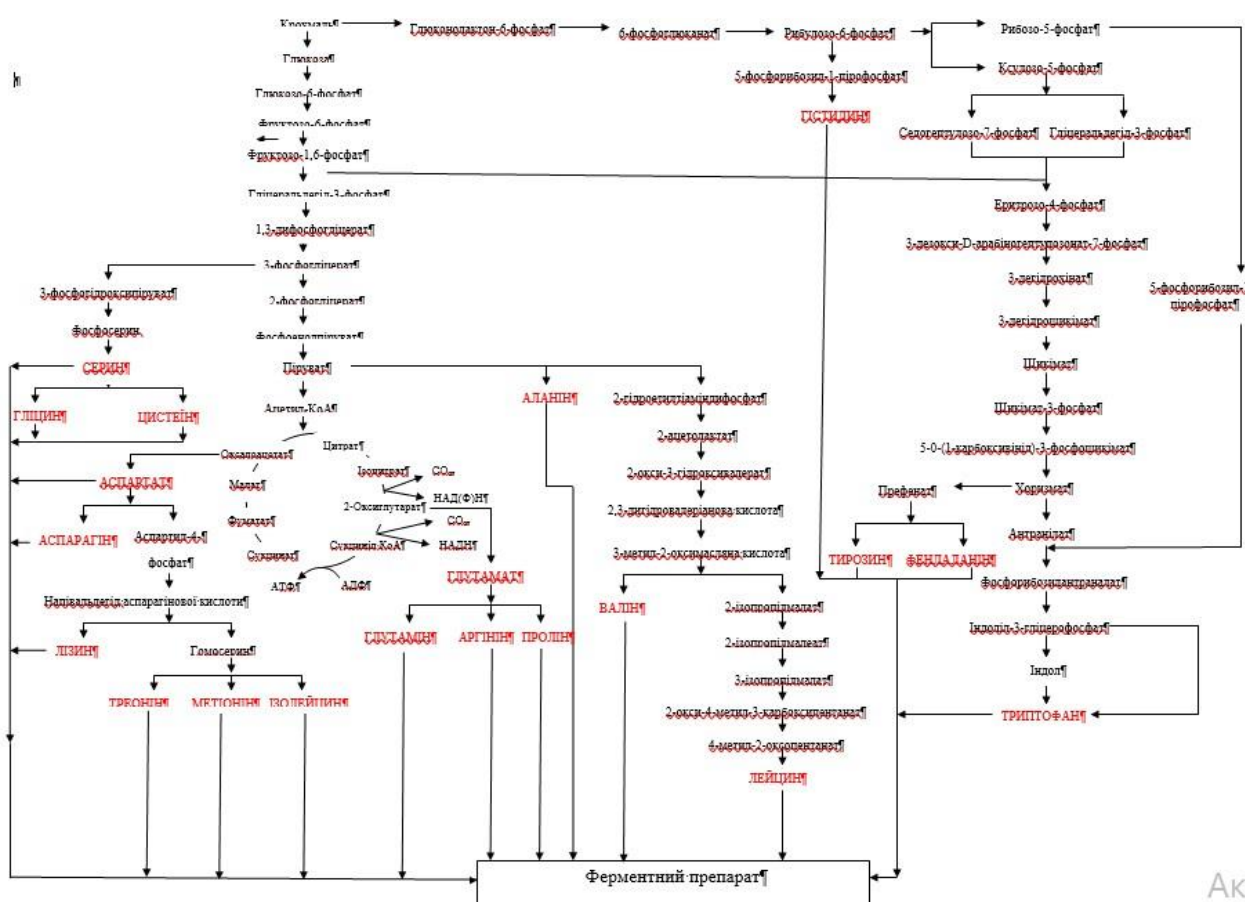


Рис. 2.3. Схема синтезу ферментного препарату

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментатора

Оптимальні умови для росту *Trichoderma viride* - 4-35°C. Для росту в ферментаторах оптимальна температура становить 20-27 °С, а для росту міцелію підходить середовище з рН 4,5-5,0. По відношенню до кисню *Trichoderma viride* є аеробним мікроорганізмом.

Аналіз впливу різних методів культивування на накопичення біомаси показав, що утворення біомаси спостерігалось як при глибинному, так і при поверхневому культивуванні продуцентів. Однак метод глибинного культивування було обрано через низку переваг глибинного культивування над поверхневим. Глибинне культивування мікроорганізмів можна здійснювати в періодичних або безперервних системах. Глибинне культивування використовується в науково-дослідних установах по всьому світу як для виробництва різних біологічно активних речовин, так і в рослинництві через наступні переваги над поверхневим культивуванням

- Поживні речовини в живильному середовищі використовуються раціонально (менше домішок, більше активних ферментних препаратів);

- Зменшується виробнича площа;

- Зменшується виробнича площа;

- Зменшується виробнича площа;

- Зменшується виробнича площа;

- Зменшується виробнича площа;

- Зменшується виробнича площа

- Покращується охорона праці та безпека на виробництві;

- Можна контролювати роботу і, за необхідності, втручатися в процес [16].

У процесі інкубації важливо підтримувати рН на рівні 4, оскільки рН середовища впливає на накопичення біомаси.

| | | | | | | | | | | |
|-----------|--------------|----------|--------|------|---|--|--|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР | | | | | |
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ | | | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Розроб. | Антипенко В. | | | | | | | | | |
| Перевір. | Воронцов О. | | | | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | | | |
| Затверд. | Стабніков В. | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | Кафедра БТМ | | 25 |

Температуру підтримують нижче 27°C.

Таким чином, культивування *T. reesei* Rut C30 в стерильних умовах (через ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами) здійснюється глибинним методом з періодичністю 96 годин; оскільки *Trichoderma viride* є мезофільною бактерією, температура культивування становить 25-27°C, рН = 4,5-5. Швидкість перемішування - 220 об/хв.

Вибір ферментаційного обладнання ґрунтується на даних, що описують процес культивування, описаний раніше.

Основною вимогою до ферментатора є здатність здійснювати процес культивування продукту в асептичних умовах і в процесі інтенсивної аерації та масообміну. [3].

Оскільки продуценти є аеробними мікроорганізмами, необхідна безперервна аерація культурального середовища. Аерацію культурального середовища здійснюють шляхом подачі повітря через барботери, встановлені на дні ферментатора. Також можлива подача повітря через перфоровану коробку, яка збільшує швидкість повітря, в результаті чого воно розсіюється на дуже дрібні бульбашки і повільно виходить з рідини [3].

Для забезпечення більш високих коефіцієнтів масопередачі ферментатор також повинен бути обладнаний механічною мішалкою. Важливо також правильно підібрати мішалку, щоб забезпечити рівномірний розподіл кисню по всьому об'єму культурального середовища. Для вирощування культури слід використовувати гвинтові мішалки. Вони використовуються для перемішування високов'язких сумішей (в даному випадку борошно висівок). Перевагою такої мішалки є те, що вона потребує менше енергії, ніж пропелерна мішалка, для однакової циркуляції субстрату в ферментаторі і не руйнує міцелій. [16].

Оскільки гриби утворюють розгалужену міцелій, перемішування у ферментаторі здійснюється на низькій швидкості.

Підтримання температурного режиму інкубації у ферментаторі забезпечується наявністю теплової сорочки або теплообмінника. Це здійснюється шляхом подачі нагрітої води в теплову сорочку.

Таким чином, вибір конкретного ферментатора залежить від вимог процесу

культивування.

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Цей продуцент *Trichoderma viride* є аеробним організмом по відношенню до кисню. Повітря необхідне для всіх етапів мікробіологічного вирощування, і повітря стерилізується заздалегідь для видалення забруднень, оскільки вони можуть переносити сторонню мікрофлору, яка, в свою чергу, погіршує якість продукції.

Підготовка стерильної аерації для насінневого та виробничого вирощування здійснюється шляхом очищення повітря за допомогою системи фільтрів (фільтр грубої очистки, прецизійний фільтр, попередній фільтр) та стабілізації термодинамічних параметрів (температура, вологість).

Атмосферне повітря забирається вертикально з вентиляційної шахти на висоті 30 м у будівлі, де концентрація мікробів є стабільною.

Для попередньої стерилізації використовуються глибокі рукавні фільтри на основі волокнистого матеріалу. Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність ефективно працювати при низькому перепаді тиску до і після фільтра. В якості фільтрувальних матеріалів використовуються перхлорвінілові волокна (марки ФП, ФП-15-1,5) з температурою термостійкості 60-70°C, поліакрилонітрильні волокна з температурою термостійкості до 180°C (ФПАН-10-3,0) або 250°C (ФПАР-15-1,5), скловолокно (ФСК) або скловолокно (FGC) або базальтові волокна. Товщина скловолокна коливається від 1,5 до 21 мкм, базальтових волокон - від 0,5 до 1 мкм. Всі волокна, крім перхлорвінілових, можна стерилізувати гострою парою. Фільтруючий матеріал виготовлений зі скловолокна. Повітря потрапляє на попередній фільтр на основі скловолокна, який не містить грубого аерозольного пилу (діаметром 5-10 мкм) і зменшує кількість забруднюючих речовин [43].

Фільтр забезпечує високий рівень очищення повітря і є екологічно безпечним завдяки низькому опору, вогнетривким матеріалам, високій ефективності та мінімальному споживанню енергії. Рівень очищення становить 80%.

Далі повітря стискається компресором до 0,35-0,5 МПа. Залежно від способу стиснення повітря компресори поділяються на поршневі та динамічні. Поршневі

компресори - це найпоширеніші об'ємні компресори, які використовуються на промислових підприємствах. Їх продуктивність контролюється пружинними запобіжними клапанами для підтримки енергоспоживання. Коли повітря стискається в компресорі, температура підвищується до 200-250°C, а вміст вологи в одиниці об'єму збільшується [46].

Наступним етапом є охолодження стисненого повітря до температури 25-40°C, при якій волога в повітрі конденсується. Для цього використовується кінцевий охолоджувач. Стиснене повітря на виході з компресора може бути недостатньо охолодженим, і саме тут вступає в дію кінцевий охолоджувач. Ефект охолодження призводить до того, що водяна пара конденсується в рідину, а циклонний сепаратор на виході з охолоджувача відокремлює воду від повітряного потоку. Саме кінцевий охолоджувач забезпечує найкращу гарантію повернення стисненого повітря до робочих умов і захист пневматичної мережі від високих температур [47].

Конденсована вода і пари масла з компресора відводяться в ресивері (ємність великої місткості). Крім того, ресивер зменшує пульсації в русі повітря, які можуть негативно впливати на роботу наступних фільтрів очищення повітря.

Крім того, для забезпечення надійної роботи основного та індивідуальних фільтрів повітря підігрівається до температури 50-70°C канальними водяними нагрівачами. Водяні калорифери призначені для нагріву повітря у вентиляційних системах. Для вентиляції доступні різні типорозміри водяних калориферів, залежно від розміру приєднувального фланця.

Потужність водонагрівача залежить від температури води, що подається, і розраховується за номограмою [48].

Система фільтрів після теплообмінника забезпечує остаточне очищення повітря від домішок і запахів. Основний фільтр встановлюється в головному колекторі компресійної аерації у ферментаційній установці. Для грубого очищення в головному фільтрі використовуються такі фільтрувальні матеріали: грубе базальтове волокно, високопродуктивний нетканий фільтрувальний матеріал або тканина Камінська. Найбільшою популярністю користуються фільтри з камінської тканини. Особливістю цього матеріалу є те, що фільтри, наповнені цією тканиною,

не потребують стерилізації, оскільки консервант гексахлорфен додається до прядильного розчину під час виробництва. Основний фільтр змінюється кожні 2-3 місяці. Ступінь очищення становить 90% [49, 50].

Повітря з головного фільтра подається безпосередньо через трубопровід (колектор) до індивідуальних фільтрів, встановлених у ферментаторі. При цьому повітря очищується до ступеня очищення $E = 99,99\%$. В останні роки для тонкого очищення повітря використовують суцільні пористі перегородки з пластику або металокераміки. Перевагами цих матеріалів перед волокнистими є структурна стабільність, висока термостійкість, простота конструкції і легкість обслуговування фільтра. Суттєвим недоліком є високий перепад тиску. Найбільш поширеними фільтруючими матеріалами є фторполімери та металокераміка у вигляді фільтруючих елементів картриджного типу, які виготовляються у вигляді втулок ФЕП. Фторполімерні фільтри можна мити і вони не потребують заміни.

Таким чином, повітря відбирається на висоті 20-30 м і подається на фільтр попереднього очищення, який видаляє крупнодисперсний аерозольний пил і значно зменшує кількість забруднюючих речовин. Для попереднього очищення повітря використовуються вінілові комірчасті фільтри, які не піддаються корозії і регенеруються тиском повітря без змащування. Для створення високого тиску необхідне стиснення, а для подолання місцевого опору - надлишковий тиск повітря. Після стиснення повітря вологість збільшується, в результаті чого волокна фільтра злипаються і створюються умови, необхідні для генерації забруднень, які додають додаткове мікробне навантаження на систему, тому надлишок вологи видаляється в конденсаторі. Основний фільтр очищає 95% повітря. В основних фільтрах найчастіше використовуються грубі базальтові волокна, камінське ткане полотно і склорізи. Тканина Камінської обрана тому, що цей матеріал просочений консервантом гексахлорфенолом і не потребує стерилізації. Індивідуальні фільтри стерилізуються повітрям на 99,99%. До індивідуальних фільтрів відносяться тканинні фільтри Петрянова, мембранні фільтри, ультратонкі базальтові волокна та картриджні фільтри з металокерамічними фільтруючими елементами. Ми зупинили свій вибір на останніх. Перевагами останніх є те, що вони витримують високі перепади тиску, легко стерилізуються та регенеруються.

Очищення відпрацьованого повітря У процесі ферментації утворюється велика кількість відпрацьованого повітря, яке викидається в атмосферу. Відпрацьоване повітря містить органічні сполуки, такі як аміни, альдегіди, жирні кислоти, кетони, спирти та ефіри. Відносна вологість повітря, що викидається з ферментатора, близька до 100%. Крім того, воно містить культуральне середовище у вигляді дрібних крапель, з вмістом клітин продуцента від 10^3 до 10^5 клітин на m^3 , залежно від типу та тривалості ферментації. [49].

4.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво целюлолітичних ферментів здійснюється упродовж 75 днів. Оптимальна площа виробничого приміщення $560 m^2$ ($35*16 m$). Приміщення включає три кімнати, з-за великого об'єму ферментатора ($32 m^3$) і габаритів апаратів для виділення цільового продукту. У першій кімнаті ($11*5 m$) розташовані: $3,2 m^3$ посівний апарат (із внутрішнім діаметром 1,2 м), інокулятори 320 л та 33 л (із внутрішніми діаметрами 0,8 м та 0,4 м), збірники (9 одиниць – для приготування стерилізації композицій), автоклав. Друга кімната ($6*5 m$) містить $5 m^3$ ферментатор (із внутрішнім діаметром 2,6 м), а також збірник з піногасником.

Як правило, враховують відстань між апаратами і вікнами 1 м, а також відстань між самими апаратами для пересування персоналу, який обслуговує техніку – 1 м. Висота стін – 2,5 м. Загальна площа стін становить $((35*2,5) + (16*2,5))*2 = 127,5 m^2$. Площа підлоги становить $560 m^2$. Визначимо площі поверхонь, які необхідно мити та/або дезінфікувати (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

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

| Об'єкт миття та/або дезінфекції | Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, m^2 (л) | Кількість процесів миття та/або дезінфекцій за весь період виробництва | Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту, m^2 |
|-----------------------------------|--|--|--|
| Обладнання, інвентар, комунікації | 6 235 л | 11 | 68 585 л |
| Підлога | 560 | 75 | 42 000 |
| Стіни, двері, вікна | 127,5 | 3 | 382,5 |

Гігієнічна обробка приміщень є одним з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти. Підготовка виробничих приміщень здійснюється відповідно до СТП 00481212-03-01-2001 "Гігієнічна підготовка виробничих приміщень", ТІ № Т-45 "Інструкція з підготовки до роботи та післяопераційної обробки виробничих приміщень, обладнання та інвентарю" та методичних рекомендацій, затверджених наказом МОЗ України № 502 від 14.12.01 р. проводяться відповідно до вимог, викладених нижче.

При виборі мийних та дезінфекційних засобів слід враховувати їх вартість та вартість обробки необхідної площі виробничого приміщення. У більшості випадків потрібно 100 мл миючого або дезінфікуючого засобу на м².

Ми обрали Vlanidas active - безальдегідний, нехлорований, універсальний миючий та дезінфікуючий засіб, який можна використовувати для миття (попередня стерилізація + дезінфекція високого рівня), дезінфекції, профілактичного прибирання та одночасного очищення всіх типів поверхонь, а також обладнання в біотехнологічній промисловості Виробник. Виробник ВАТ "Лізоформ М", Україна. Переваги: висока економічність, робочий розчин зберігає ефективність протягом 16 діб, можна використовувати багаторазово для дезінфекції зануренням, не втрачає властивостей при заморожуванні, простий у застосуванні. Розчин засобу "Бранідас Актив" та води, з концентрацією 0,5-1%.

Засіб використовується одноразово (протягом 75 днів з моменту виготовлення) для дезінфекції стін, дверей та вікон.

Щоб запобігти стійкості мікроорганізмів до миючих та дезінфікуючих засобів, біотехнологічні компанії зазвичай використовують кілька миючих засобів. З цієї причини ми також рекомендуємо використовувати ще один дезінфікуючий засіб - "Неокрол". Неохлор - це жовтувата концентрована рідина з характерним запахом хлору та парфумів. Цей засіб добре змішується з водою в будь-якій пропорції. Робочий розчин засобу є лужним, добре очищує і має відмінні змочувальні властивості. Засіб та його робочий розчин є негорючими та вибухобезпечними. Виробник ЗАТ "Науково-виробничий центр дезінфекційних проблем України", Україна. Застосовується для дезінфекції обладнання та поверхонь на біотехнологічних підприємствах.

Робочий розчин може зберігатися в закритій тарі в прохолодному, захищеному від світла місці протягом трьох діб. Робочі розчини, не використані протягом терміну придатності, можна застосовувати для прибирання та миття приміщень.

Для дезінфекції стін, дверей та вікон цей засіб використовується двічі (оскільки він дешевший за Бланідас Актив).

Розчин каустичної соди слід використовувати для очищення обладнання всередині.

При розрахунку площі обладнання, яке необхідно обробити всередині миючим розчином, підсумовується площа всього обладнання, задіяного в процесі виробництва целюлозного ферменту. Таким чином, 32 м³ + 3,2 м³ + 330 л + 33 л (об'єм резервуарів для ферментації та інокуляції) + 30 л (резервуар для піногасника) + 10 л + 6 л + 60 л + 12 л + 60 л + 580 л + 120 л + 510 л (резервуар для приготування композиції та стерилізації). Оскільки модулі SIR використовуються для внутрішнього очищення обладнання, як правило, розраховується 20% від загального обсягу обладнання і ділиться на 4 (кількість мийного засобу для очищення SIR):

$(0,2 * 113\ 093) / 4 = 56\ 547$ літрів - витрата каустичної соди на очищення обладнання.

Якщо обладнання має очищатися зовні, використовуйте рівняння 5.1 і враховуйте як висоту тільки площу очищення зони обслуговування обладнання, яка становить приблизно $h = 1,5$ м:

$$S = 2\pi r h \quad (5.1)$$

Отже, просумуємо усі внутрішні діаметри апаратури, що використовується: 2,6 м + 2,4 м + 1,2 м + 0,8 м + 0,4 м + 0,35 м + 0,25 м + 0,4 м + 0,4 м + 0,25 м + 0,5 м + 0,8 м + 0,6 м + 2,2 м + 1 м + 1,5 м + 1,4 м + 0,35 м + 0,4 м + 0,3 м + 2,8 м + 2,8 м + 2,6 м + 2,7 м = 29 м.

Оскільки маємо 24 апарати з умовною висотою кожного 1,5, тому: $1,5 * 24 = 36$ м. Загальна площа миття обладнання ззовні складає: $3,14 * 29 * 36 = 3\ 278$ м².

Вартість концентратів мийних та дезінфікувальних засобів та їх витрати при виробництві целюлолітичних ферментів наведено в *табл. 4.2*.

Таблиця 4.2.

**Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів
для виробництва целюлолітичних ферментів**

| Назва миючого/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 |
|-------------------------------------|--|----------------------------------|--|--|---|--|
| Каустична сода | Обладнання, інвентар, комунікації | 20 | 3 530 | 176,5 | 22 | 776,6 |
| Неохлор | Стіни, двері, вікна, обладнання, підлога | 0,3 | 3 705 | 3 380 | 90 | 912,6 |
| Бланідас актив | Обладнання, інвентар, комунікації, стіни, двері. | 0,2 | 1 705 | 3 380 | 280 | 1 892,8 |

Аналіз даних таблиці 4.2 дозволяє зробити наступні висновки:

- Розчини каустичної соди слід використовувати для очищення обладнання, інвентарю та телекомунікаційного обладнання;

- для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон, дверей та зовнішнього обладнання слід використовувати миючі та дезінфікуючі засоби "Бранідас Актив" та "Неохлор"

Щоб запобігти розвитку стійких бактерій, ці засоби слід використовувати з інтервалом у місяць (термін придатності 75 днів).

Підлогу слід мити та дезінфікувати щодня (загалом 75 разів), а стіни, двері та вікна - раз на місяць, тобто два-три рази.

4.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Підготовка та стерилізація поживних середовищ

Методи підготовки та стерилізації компонентів живильного середовища

Спосіб приготування та стерилізації компонентів живильного середовища залежить від фізико-хімічних властивостей речовини та загальної кількості компонентів розчину.

Це залежить від компонентів. Методи підготовки живильного середовища та стерилізації за стадіями виробництва

Процес отримання посівного матеріалу складається з чотирьох етапів.

Таблиця 4.3

Посівний матеріал *Trichoderma viride* отримують вирощуванням штаму у колбах на рідкому поживному складу (г/л) [2]:

| | |
|--------------------------------------|------|
| Висівки | 30 |
| NaNO ₃ | 2 |
| K ₂ PO ₄ | 2 |
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 0,5 |
| KCl | 0,5 |
| FeSO ₄ *7H ₂ O | 0,01 |

Необхідно приготувати та простерилізувати 0,25 л середовища. Стерилізація проводиться відповідно до об'єму середовища. Наприклад.

Якщо об'єм середовища невеликий, стерилізують його в автоклаві.

Проаналізувавши склад середовища, умовно розділіть його на наступні композиції

Композиція А: висівки (112°C, 0,05 МПа, 30 хв).

Оскільки висівки містять лише 50% цукру, цей склад слід подвоїти.

Композиція Б: NaNO₃, MgSO₄ *7H₂O, KCl, FeSO₄ *7H₂O (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 МПа);

Композиція С: Калій дигідроген ортофосфат (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, 0,15 (МПа). Стерилізуйте фосфати окремо, оскільки вони утворюють осади з іншими солями.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання

| Позиція | Найменування | Кількість | Технологічна характеристика (виробник) |
|-----------------------------|--|-----------|--|
| Р-1 | Реактор-змішувач для приготування робочого розчину кальцинованої соди | 1 | Реактор об'ємом 30 л, оснащений мішалкою. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв, сталь 12Х18Н10Т |
| Н-2, Н-29, Н-31, Н-36, Н-40 | Насоси відцентрові для перекачування кальцинованої соди, культуральної рідини, концентрату | 5 | Насоси відцентрового типу фірми НМР5 серії Sprut, продуктивність до 60 м ³ /год (100 л / хв) [68] |
| ЕП-3, ЕП-4 | Емальований посуд для приготування робочого розчину Гусіа, Бланідасу марки А | 1 | Емальована емність об'ємом 15 л, сталь 12Х18Н10Т |
| ПЗ-5 | Повітрязабірник | 1 | Повітрязабірник з металевою сіткою для вилучення механічних забруднень. |
| Ф-6 | Фільтр грубої очистки повітря | 1 | Панельний фільтр фірми LUXFILTR (Бельгія). Фільтруючий матеріал – скловолокно, товщина профілю – 48 мм, продуктивність 1650-2800 м ³ /год, E = 80% [69] |
| К-7 | Компресор | 1 | Компресор АВ40-380 фірми Airpol (Польща), потужність 660 л/хв, робочий тиск 1 МПа [70] |

НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР

| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | | | | |
|-----------|------|--------------|--------|------|------------------------------------|-------------|------|---------|
| Розроб. | | Антипенко В. | | | СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Перевір. | | Воронцов О. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В. | | | | | | |
| | | | | | | Кафедра БТМ | | |
| | | | | | | 35 | | |

| | | | |
|------------|--|---|---|
| T-8 | Теплообмінник-охолоджувач | 1 | Теплообмінник-охолоджувач серії AFR 11 виробника Friulair Dryers, продуктивність 66 м ³ /год [47] |
| P-9 | Ресивер | 1 | Ресивер Р 270.500.01 компанії ЧП НТЦ "Редуктор" (Україна), об'єм 270 л, робочий тиск 1 МПа [71] |
| T-10 | Теплообмінник-нагрівач | 1 | Теплообмінник-нагрівач ВНП 50-25 компанії «Titan» (Бельгія) виготовлений із оцинкової сталі, максимально допустима температура води 160°C, максимально допустимий тиск 1,6 МПа [48] |
| Ф-11 | Фільтр головний | 1 | Фільтруючий матеріал – тканина Камінської, товщина волокна 16,9 мкм, E = 90% [50] |
| СТ-12 | Стерилізатор для стерилізації розчину гідроксиду натрію | 1 | Стерилізатор об'ємом 6 л, оснащений паровою сорочкою сталь 12Х18Н10Т |
| P-13 | Реактор для приготування композиції Б | 1 | Реактор об'ємом 20 л, оснащений перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість обертів 100 об/хв |
| P-14 | Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А | 1 | Реактор-змішувач об'ємом 30 л, оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв, сталь 12Х18Н10Т |
| H-15, H-21 | Насос відцентровий для перекачування стерильної композиції А | 2 | Насоси відцентрового типу компанії Ватерпас (Україна), продуктивність – до 100 м ³ /год, робочий тиск – до 7 бар, температура – до 150 °С [72] |
| P-16 | Реактор-змішувач для приготування | 2 | Реактор об'ємом 100 л, оснащений мішалкою. Загальна швидкість обертів 100 об/хв, |

| | | | |
|---------------------|--|---|---|
| | композиції Б | | сталь 12Х18Н10Т |
| Д-17, Д-19, Д-41 | Дозатори об'ємно-вагові | 3 | Дозатор об'ємно-ваговий серії КБД-РС компанії «Авіарм» діапазон дозування 1-100 кг, споживана потужність – не більше 1500 Вт [73] |
| Р-18 | Реактор-змішувач для приготування композиції Б | 1 | Реактор- об'ємом 2000 л, мішалка. Загальна швидкість обертів 100 об/хв, сталь 12Х18Н10Т |
| Р-20 | Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А | 3 | Реактор об'ємом 100 л, оснащений паровою сорочкою та мішалкою. Загальна швидкість обертів 100 об/хв, сталь 12Х18Н10Т |
| Ф-22, Ф-25, Ф-27 | Фільтр тонкого очищення | 3 | Фільтруючий матеріал – фторопласт серії ЕПМ.Ф42Л компанії «Технофільтр Україна», середній розмір пор від 0,25 мкм, Е=99,99% [74] |
| ЗП-23 | Засівний пристрій | 1 | Ємність із нержавіючої сталі 12Х18Н10Т, прикріплений до ферментатора (інокулятора) |
| ФР-24 | Ферментатор (інокулятор) | 1 | Ферментатор BioFlo510 (Німеччина), об'єм 50 л [75] |
| ФР-26 | Ферментатор (посівний апарат) | 1 | Ферментатор I SERIES 240 компанії Solaris (Італія), об'єм 500 л [76] |
| ФР-28 | Ферментатор | 1 | Ферментатор моделі RTY-MS (RITAI, Китай), об'єм 5000 л [45] |

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу біомаси включає допоміжні роботи (підготовка і стерилізація розчинів титрувальних агентів, піногасника та поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез цільового продукту).

Технологічну схему біосинтезу біомаси наведемо у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Дана стадія включає в себе операцію навчання та інструктаж персоналу.

ДР 1.1.1. Навчання та інструктаж персоналу

Ознайомлюють зі особливостями роботи на підприємстві, її важливістю та відповідальністю. Акцентують увагу працівника на головних технологічних операціях. Проводять інструктаж з техніки безпеки та охорони праці. Дані про ознайомлення фіксують у спеціальному документі.

ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючого розчинів

Для забезпечення зменшення кількості контамінантної мікрофлори на виробництві, необхідним є використання мийних та дезінфікуючих засобів.

ДР 1.2.1. Приготування розчину кальцинованої соди

Для очищення внутрішньої частини обладнання та комунікацій використовується 2% водний розчин кальцинованої соди; для приготування 20 л 400 г кальцинованої соди зважують на терезах і переносять у 30-літровий реактор-змішувач (Р-1). Далі з трубопроводу подається 19,6 л води. Розчин нагрівають до 70 °С шляхом подачі пари в сорочку реактора-змішувача. Після нагрівання розчин охолоджують до температури 40 °С шляхом подачі холодної води в сорочку реактора змішування. Розчин кальцинованої соди подається на виробничу дільницю насосом (Н-2).

| | | | | | | | | | | |
|-----------|------|--------------|--------|------|---|--|--|-------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР | | | | | |
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | | | | | | |
| Розроб. | | Антипенко В. | | | ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ | | | | | |
| Перевір. | | Воронцов О. | | | | | | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Реценз. | | | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | 38 | | |
| Затверд. | | Стабніков В. | | | | | | Кафедра БТМ | | |

ДР 1.2.2. Приготування миючого розчину Gucia

Для очищення зовнішніх поверхонь обладнання, телекомунікаційного устаткування, інвентарю та контейнерів використовуйте 0,1% розчин *Gucia*. Для приготування 20 літрів відміряйте 20 мл концентрату в мірний циліндр і перенесіть в 15-літрову емальовану посудину (ЕП-3). Потім до концентрату додають 14,98 л води. Приготований розчин зберігають у закритому посуді.

ДР 1.2.3. Приготування розчину Бланідасу марки А

Для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон, дверей і контейнерів використовуйте 0,2% розчин засобу Бранідас марки А.

На етапі приготування миючого та дезінфікуючого засобу "Бранідус" марки А необхідно дотримуватися запобіжних заходів під час зважування та наповнення: для приготування 20 літрів 40 г порошку зважують на терезах і пересипають в емальовану ємність (ЕП-4) місткістю 15 літрів. Потім до концентрату додають 14,96 л води і зберігають у герметичній ємності.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Дезінфекція приміщень є одним з найважливіших заходів для забезпечення чистоти і спрямована на мінімізацію механічного та мікробіологічного забруднення. Дезінфекція поверхонь зазвичай зменшує кількість мікроорганізмів на 40-60% від їх початкового вмісту.

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щодня проводять прибирання підлоги із застосуванням мийно-дезінфікуючого розчину Бланідасу марки А від ДР 1.2.3. Прибирання проводиться 1 раз на зміну і за необхідності, при цьому обробляється підлога, вікна та двері.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання виробничого обладнання проводиться раз на тиждень. Прибиранню підлягають підлоги, стіни, стелі, повітроводи, підвіконня, всі поверхні обладнання, засоби зв'язку та всі виробничі меблі. Всередині обладнання та засобів зв'язку слід використовувати 2% розчин кальцинованої соди ДР 1.2.1, а зовні обладнання, засобів зв'язку, інвентарю та контейнерів - 0,1% розчин *Gucia* ДР 1.2.2. Для інших цілей використовуйте миючі та дезінфікуючі розчини згідно з ДР 1.2.3.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Зняття з'ємних частин обладнання та їх миття

З'ємні елементи (вузли) обладнання, розбирають, поміщають в ванну і замочують миючому розчині, який надходить від ДР 1.2.1. Температура розчину становить 40 °С, тривалість замочування становить – 30 хвилин.

ДР 1.4.2. Миття обладнання

Внутрішня частина обладнання очищається 2% розчином кальцинованої соди, що постачається в комплекті ДР 1.2.1. Очищення здійснюється вручну, температура розчину 40°С, час обробки - 1 година. Миття зовнішньої поверхні обладнання – 0,1% розчином Gucia від ДР 1.2.2.

ДР 1.4.3. Ополіскування обладнання

Ця операція проводиться шляхом пропускання водопровідної води через систему трубопроводів. Температура води становить 20 °С.

ДР 1.4.4. Технологічний огляд обладнання

Після миття та ополіскування ємнісного обладнання здійснюють його технічний огляд з метою виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі обладнання. У разі їх знаходження здійснюють підтягування різьбові з'єднань.

ДР 1.4.5. Перевірка на герметичність

Герметичність обладнання перевіряється за допомогою стисненого повітря. Для цього закривають усі запірні вентиля на апараті і подають аераційне повітря до досягнення надлишкового тиску $P = 0,2$ МПа. Закрийте вентиля подачі повітря і запишіть показання манометра і час витримки (30 хв) на кришці апарата в експлуатаційний журнал. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, обладнання вважається герметичним. Якщо падіння тиску перевищує 0,01 МПа, обладнання несправне. Для виявлення дефектів слід приготувати мильний розчин і обробити ним обладнання, особливо ущільнення і труби. Будь-які виявлені пошкодження слід усунути і перевірити ще раз на герметичність.

ДР 1.4.6. Стерилізація обладнання та комунікацій

Простерилізувати обладнання гострою парою. Відкрийте всі запірні вентиля

на відкритих кінцях труб і комунікацій, підключених до апарату, заздалегідь відкрийте витяжний клапан, щоб випустити повітря з апарату, і подайте гарячу пару безпосередньо в апарат з нижнього зливного отвору. Після досягнення в апараті температури стерилізації 131 °С і тиску $P = 0,15$ МПа закрити всі запірні клапани апарата, крім парового, і витримати апарат у режимі стерилізації протягом однієї години.

ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря

Підготовка стерильного аераційного повітря здійснюється шляхом фільтрування на системі фільтрів (фільтр грубого, головного та тонкого очищення) а також стабілізації термодинамічних показників (температура, вологість).

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою вертикального повітребірника (ПЗ-5) через забірну шахту на висоті 30 м будівлі, де стабільна концентрація мікроорганізмів

ДР 2.2. Очищення повітря на фільтрі грубої очистки

Видаляється з повітря більшість великих частинок пилу ($d = 5-10$ мкм), зменшуючи кількість забруднюючих речовин Панельний фільтр FVP-II (F-6) має прямокутну конструкцію з оцинкованим U-подібним профілем і фільтрувальним матеріалом зі скловолосна. Металева сітка з боку виходу повітря захищає фільтр від видавлювання фільтруючого матеріалу під час роботи. На стороні входу повітря є спиці, які утримують фільтрувальний матеріал. Ступінь очищення становить 80% [69].

ДР 2.3. Стиснення (компресування) повітря

Під тиском 0,35-0,5 МПа у компресорі (К-7) поршневого типу відбувається компресування повітря. При створенні такого тиску температура повітря піднімається до 200 – 250 °С, так збільшується і вологість.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Охолодження такого повітря до температури 25-40 °С, за якої волога повітря конденсується ($W = 60-70\%$), відбувається в теплообміннику (Т-8). Потім

відбувається видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (Р-9).

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи фільтрів (головного та індивідуального), повітря нагрівають до температури 55-80 °С у пластинчатому теплообміннику (Т-10).

ДР 2.4. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря потрапляє в основний фільтр (Ф-11), який являє собою сталевий циліндр зі сферичним дном і знімною кришкою. В середині фільтра знаходиться сітка, між якими знаходиться шар (Камінської тканине полотно). Мат має товщину 20-23 мм і складається з волокон 16,9 мкм. Вибрані фільтри не потребують стерилізації. Основний фільтр слід міняти кожні 2-3 місяці. Ступінь очищення становить 95 %.

ДР 2.5. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Потім очищене повітря подається на окремі фільтри тонкого очищення (Ф-22, Ф-25, Ф-27) для аерації в інокуляторах, посівних машинах і виробничих ферментаторах. Фільтрувальний матеріал забезпечує стерилізацію повітря, необхідну для розвитку мікроорганізмів. Використовуються фторопластові рукавні фільтри, які являють собою металеві циліндри з кришкою і конічним дном, а фільтруючий матеріал має товщину 4 мм. Фторопластовий фільтр миється і не потребує заміни. Рівень очищення становить 99,99%.

ДР 3 Приготування та стерилізація розчинів титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація титрувального агента 6% HCl

Для досягнення рН 4,5-5 у сольовому розчині перед стерилізацією у ферментер (посівний матеріал) і колбу додають 6% розчин HCl із розрахунку 0,002 літра на літр середовища, щоб підтримувати рН в межах 5.

Розрахуйте загальну кількість необхідної HCl:

$$(2,5 \times 0,002) + (25 \times 0,002) + (250 \times 0,002) + (2500 \times 0,002) = 5,55$$

Щоб приготувати HCl, додайте 0,33 л 36% HCl у 10-літрову збірну посудину і повільно (помішуючи) додайте 5,22 л водопровідної води.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація титрувального агенту 6% NaOH

Для оптимізації рН середовища додають 0,002 л 6% розчину NaOH на 1 л підготовленого середовища для даного виробника після стерилізації при рН 4,5-5. Лужні розчини додають при приготуванні поживних середовищ для колб, інокуляторів, сівалок і ферментаторів у таких кількостях: 2,5 л, 25 л, 250 л і 2,5 м³. Розрахуйте загальну кількість необхідного NaOH:

$$(2,5 \times 0,002) + (25 \times 0,002) + (250 \times 0,002) + (2500 \times 0,002) = 5,55$$

Щоб приготувати 5,55 л лужного розчину, додайте 5,22 л дистильованої води і 0,33 кг NaOH в 10-літрову склянку і перемішайте.

Простерилізуйте 10-літрову посудину гострою парою при 131°C протягом 40 хвилин.

ДР 4. Приготування та стерилізація піногасника

ДР 4.1. Приготування піногасника

Як піногасник використовуємо водну емульсію олеїнової кислоти 1%. Готується з водою в співвідношенні 1:100. Його вносять концентрацією 0,01% від робочого об'єму, а отже загальна кількість піногасника, яку слід підготувати становить:

$$(25 \times 0,01) + (250 \times 0,01) + (2500 \times 0,01) = 27,75 \text{ л.}$$

Приготований піногасник надходить до ДР 2.1.1., ДР 2.1.2, ДР 2.1.3, ДР 2.1.4.

ДР 4.1.1. Стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 25л

Кількість використовуваного інокулянта становить 25 літрів, тому потрібно 0,25 літра піногасника. Піногасник поміщають в 0,5-літрову колбу і стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хвилин. Підготовлений піногасник направляють на стадію ТП 6.4.

ДР 4.1.2. Стерилізація піногасника для інокулятора об'ємом 250л

Кількість використовуваного інокулянта становить 250 літрів, тому потрібно 2,5 літра піногасника. Піногасник поміщають в 0,5-літрову колбу і стерилізують в автоклаві при 131°C протягом 40 хвилин. Підготовлений піногасник направляють на стадію ТП 6.5.

ДР 4.1.4. Стерилізація піногасника для ферментатора

Робочий об'єм ферментера становить 2500 літрів, тому потрібен 25-літровий скіммер. Скіммер стерилізується в резервуарі об'ємом 5000 літрів при температурі 131°C протягом 40 хвилин. Для охолодження піногасника в сорочку колектора подається холодна вода, а регенована вода відводиться. Підготовлений піногасник подається на ТП 4.6.

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для культивування посівного матеріалу приготуйте 2,5 л середовища (10% від об'єму середовища). Загальний об'єм води, доданої для розчинення середовища, становить 2,35 л. Джерелом вуглецю в середовищі є висівки, а джерелом органічного азоту - нітрат натрію. Вміст компонентів, необхідних для приготування середовища Vrob.3, наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2,5 л середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 2,5 л середовища, г | Композиція | Об'єм композиції, л | Об'єм води, л |
|--------------------------------------|-------------------|--|------------|---------------------|---------------|
| Висівки | 60 | 150 | А | 1 | 0,850 |
| NaNO ₃ | 2 | 5 | Б | 1 | 1 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,5 | 1,25 | | | |
| KCl | 0,5 | 1,25 | | | |
| FeSO ₄ *7H ₂ O | 0,01 | 0,25 | В | 0,5 | 0,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 | 5 | | | |

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізації композиції А

Зважте 150 г висівкового борошна на терезах. Помістіть його у 2,5-літрову колбу і змішайте з 0,850 мл водопровідної води. Закрийте колбу марлевою пробкою і стерилізуйте в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хвилин (0,05 МПа).

ДР. 5.1.2 Приготування та стерилізація композиції В

Зважте на терезах 5 г NaNO₃, 1,25 г KCl, 1,25 г MgSO₄×7H₂O та 0,25 г FeSO₄×7H₂O. Помістіть наважку в 2,5-літрову колбу і додайте 1000 мл водопровідної води. Закрийте колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізуйте в

автоклаві при 131°C протягом 40 хв (0,15 МПа).

ДР. 5.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

Зважте 5 г K_2HPO_4 на терезах; помістіть наважку в колбу на 1 л, додайте 1 л дистильованої води і перемішайте. Закрийте колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізуйте в автоклаві при 131 °С протягом 40 хв (0,15 МПа).

ДР. 5.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування в інокуляторі.

Приготуйте 25 л середовища для інкубації в інокуляторах (10% від об'єму середовища).

Якщо для інокуляції інокуляторів використовується 2,5 л рідкого середовища та з урахуванням конденсату, що утворюється під час стерилізації (10%), загальний об'єм води, що додається для приготування середовища, становить 17,5 л. Вміст компонентів, необхідних для приготування 25 л середовища, наведено в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 25 л середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 25 л середовища, г | Композиція | Об'єм композиції, л | Об'єм води, л |
|--------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------|---------------------|---------------|
| Висівки | 60 | 1500 | А | 7,5 | 5 |
| $NaNO_3$ | 2 | 50 | Б | 7,5 | 7,5 |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,5 | 12,5 | | | |
| KCl | 0,5 | 12,5 | | | |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$ | 0,01 | 2,5 | В | 5 | 5 |
| K_2HPO_4 | 2 | 50 | | | |

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізації композиції А

На технічних терезах зважують 1500 г борошно висівок. Наважку поміщають у збірник об'ємом 10 л, додають 5 л водопровідної води та стерилізують при температурі 112°C, упродовж 30 хвилин (0,05 МПа).

ДР 5.2.2. приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 50 г $NaNO_3$, 12,5 г KCl, 12,5 г $MgSO_4 \times 7H_2O$

та 2,5 FeSO₄*7H₂O. Наважки поміщають у збірник об'ємом 10 л, додають 7,5 л водопровідної води, перемішують. Стерилізують при температурі 131°C, упродовж 40 хвилин (0,15МПа).

ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 50 г К₂НРО₄. Наважку поміщають у збірник об'ємом 10 л, додають 5 л дистильованої води, перемішують. Стерилізують при температурі 131°C, упродовж 40 хвилин (0,15МПа).

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,63 м³ з об'ємом посівного матеріалу 250 л.

Для культивування необхідно приготувати 250 літрів середовища.

Якщо посіяти 25 літрів рідкого посівного матеріалу і врахувати конденсат, що утворився під час стерилізації, то загальний об'єм води, доданої для приготування середовища, становить 87,57 л. Вміст компонентів наведено в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 250 л середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 250 л середовища, кг | Композиція | Об'єм композиції, л | Об'єм води, л |
|--------------------------------------|-------------------|---|------------|---------------------|---------------|
| Висівки | 60 | 15 | А | 100 | 85 |
| NaNO ₃ | 2 | 0,5 | Б і В | 100 | 100 |
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 0,5 | 0,125 | | | |
| KCl | 0,5 | 0,125 | | | |
| FeSO ₄ *7H ₂ O | 0,01 | 0,025 | | | |
| K ₂ HPO ₄ | 2 | 0,5 | | | |

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізації композиції А

На об'ємно-ваговому дозаторі зважують 15 кг борошно висівок. Наважку поміщають у збірник об'ємом 300 л, додають 85 л водопровідної води, перемішують і стерилізують при температурі 112°C, упродовж 30 хвилин (0,05 МПа).

ДР 5.3.2. приготування і стерилізація композиції Б і В

На технічних терезах зважують 500 г NaNO₃, 125 г KCl 125 г MgSO₄*7H₂O та

25 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 500 г K_2HPO_4 . Наважки поміщають у збірник об'ємом 200 л, додають 100 л водопровідної води, перемішують і для того, щоб запобігти випадання осаду, рН доводять до 4,5 за допомогою кислоти. Стерилізують при температурі 131°C, упродовж 40 хвилин (0,15МПа).

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в ферментаторі об'ємом 5 м³

Для культивування у ферментері об'ємом 5 м³ необхідно приготувати 2,5 м³ поживного середовища; враховуючи, що 0,25 м³ поживного середовища плюс конденсат після стерилізації додається для засіву ферментеру, загальний об'єм води, що додається, становить 1,85 м³. У таблиці 4.4 наведено вміст компонентів, необхідних для приготування 1,85 м³ поживного середовища.

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2500 л середовища

| Компонент поживного середовища | Концентрація, г/л | Вміст компонента у 2500 л середовища, кг | Композиція | Об'єм композиції, л | Об'єм води, л |
|---|-------------------|--|------------|---------------------|---------------|
| Висівки | 60 | 150 | А | 1000 | 850 |
| NaNO_3 | 2 | 5 | Б і В | 1000 | 1000 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 | 1,25 | | | |
| KCl | 0,5 | 1,25 | | | |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,01 | 0,25 | | | |
| K_2HPO_4 | 2 | 5 | | | |

ДР 5.4.1. Приготування композиції А

На об'ємно-ваговому дозаторі зважують 150 кг борошно висівок. Наважку поміщають у ферментатор, додають 1,85 м³ водопровідної води, перемішують.

ДР 5.4.2. Приготування композиції Б і В

На об'ємно-ваговому дозаторі зважують 5 кг NaNO_3 , 1,25 кг KCl, 1,25 кг $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 250 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ і 5 кг K_2HPO_4 .

ДР 5.4.3. Стерилізації композиції А і Б та В

Наважки поміщають у збірник об'ємом 2000 л, додають 1000 л водопровідної води. Стерилізація проходить в збірнику гострою парою і для того, щоб запобігти випадання осаду, рН доводять до 4,5 за допомогою сірчаної кислоти. Стерилізують при температурі 131°C, упродовж 40 хвилин (0,15МПа).

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *T. viride* Rut C30 зберігають у пробірках на скошеному агаризованому середовищі СА. Пересіви здійснюються кожні 2 – 3 рази протягом року. Всі роботи з колекційною культурою проводяться в строго асептичних умовах.

ТП 6.2. одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру що зберігається в пробірках зі скошеним сусло-агаром, розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із агаризованим середовищем суслон і вирощують при температурі 27°C протягом 48 год.

ТП 6.3. вирощування культури на агаризованих середовищах

Одержані окремі колонії (від ТП 6.2) пересівають мікробіологічною петлею в пробірки зі скошеним середовищем сусло-агар (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки переносять ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше ніж 1 см. Тривалість культивування – 24 години.

ТП 6.4. вирощування культури в колбах на качалках

Для культивування рідкого середовища додайте 1000 мл Компоненту А (ДР 5.1.1) і 500 мл Компоненту Б (ДР 5.1.2) у 5-літрову колбу, що містить 1000 мл Компоненту Б (ДР 5.1.3), у стерильних умовах. Перемішайте і розлийте по 100 мл у п'ять стерильних колб по 750 мл.

У пробірку з культурою *Trichoderma viride* Rut C30, вирощеною на сусло-агаровому середовищі, додати 5 мл фізіологічного розчину, щоб суспендувати клітини (змити культуральне середовище) Посівний матеріал з однієї пробірки використовують для інокуляції однієї колби.

Культури інкубують в шейкері зі швидкістю 300 об/хв при 20-27°C протягом 48 годин при рН 5. Потім культуральне середовище переносять у стерильну 5-літрову колбу для посіву.

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л.

Асептично додайте 7,5 л Компоненту А і 5 л Компоненту В до попередньо нагрітої стерилізованої парою посівної рідини (ДР 5.2.3 і ДР 5.2.4 відповідно). Також додають посівний матеріал (асептично через колбу для посіву, з ТП 6.4). Температуру слід підтримувати на рівні 20-27°C. Готовий посівний матеріал до наступного посівного матеріалу через спеціальну трубку (до ТП 6.6).

До обладнання подається стерильне стиснене повітря, гостра пара та відпрацьоване повітря. Крім того, в сорочку ферментатора подається відпрацьована пара і холодна вода, а для видалення води з сорочки використовується повітря.

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 630 л.

100 літрів композицій В і С (з ТП 3.3.2 і ТП 3.3.3 відповідно) асептично додають до посівного матеріалу з композицією А, який попередньо стерилізують термальною парою. Посівний матеріал також асептично доставляють і додають до посівного матеріалу (з ТП 6.5). Температура підтримується на рівні 28-30 °С. Готовий посівний матеріал ($V = 32,5$ л) подається по спеціальній трубці до наступного блоку інокуляції (до ТП 7).

До обладнання подається стерильне стиснене повітря, гостра пара та відпрацьоване повітря. Крім того, у ферментер подається відпрацьована пара і холодна вода, а з апарату зливається вода.

ТП 7. Біосинтез

Виробниче вирощування відбувається у ферментаторі з робочим об'ємом 5 м³. Насос подає 250 літрів посівний матеріал у ферментатор разом з поживним середовищем. На початку культивування мішалка приводиться в обертання.

До обладнання подається стерильне стиснене повітря, гостра пара та відпрацьоване повітря. Крім того, в сорочку ферментатора подається водяна пара, холодна вода і оборотна вода.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Карта постадійного контролю доферментаційних процесів отримання препарату Целовіридин

| Номер контрольної точки та назва стадії | Об'єкт контролю і показник, що визначається | Засоби та методи контролю | Періодичність перевірки та порядок відбору проб | Нормативна характеристика показника, що визначається |
|--|---|---|--|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Кх, Кт 1.2.1 Приготування розчину кальцинованої соди | Концентрація і температура розчину кальцинованої соди | Хімічний метод, термометр технічний | Після приготування розчину | C = 2 %, t = 70 °C |
| Кх 1.2.2 Приготування розчину Gucia | Концентрація розчину Gucia | Хімічний метод | Після приготування розчину | C = 0,1 % |
| Кх 1.2.3 Приготування розчину Бланідасу марки А | Концентрація розчину Бланідасу марки А | Хімічний метод | Після приготування розчину | C = 0,2 % |
| Кт, Км 1.3.1, Кт, Км 1.3.2 Підготовка виробничих приміщень | Підлога, стіни, обладнання, чистота | Візуальний огляд, мікробіологічний контроль | Після прибирання | Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду, КУО < 800/дм ² , КУО < 300/дм ² |
| Кт 1.4.1 Миття з'ємних частин обладнання | З'ємні частини обладнання, мийний розчин, температура мийного розчину, час замочування, чистота | Термометр технічний, годинник | Під час проведення операції | t = 40 °C, τ = 30 хв |
| Кт 1.4.2 Миття обладнання | Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота | Термометр технічний, годинник | Під час проведення операції обробки | t = 40 °C, τ = 1 год |
| Кт 1.4.3 Ополіскування обладнання | Водопровідна вода, температура водопровідної води | Термометр технічний | Після проведення операції обробки | t = 20 °C |
| Кт 1.4.4 Технічний огляд | Обладнання | Візуальний огляд | Під час проведення операції огляду | Ущільнення в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні |
| Кт 1.4.5 Перевірка на герметичність | Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск | Манометр технічний, годинник | Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність | P = 0,2 МПа, τ = 30 хв |

НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР

| | | | | | | | | |
|-----------|------|--------------|--------|------|---------------------------------|-------------------|------|---------|
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Розроб. | | Антипенко В. | | | | | | |
| Перевір. | | Воронцов О. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В. | | | | | | |
| | | | | | | 50 Кафедра БТМ | | |

| | | | | |
|--|--|--|---|--|
| Кт, Км 1.4.6 Стерилізація обладнання | Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації, стерильність | Манометр технічний, термометр, годинник, мікробіологічний контроль | Тиск та температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 1 \text{ год}$, відсутність мікробіоти |
| Кт 2.2 Грубе очищення | Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра | Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення | Тиск згідно паспорту фільтру, $E = 80 \%$ |
| Кт 2.3 Компресування повітря | Стиснене повітря, температура, тиск | Манометр технічний, термометр | Після компресування повітря | $P = 0,35\text{-}0,5 \text{ МПа}$ $t = 200\text{-}250 \text{ }^\circ\text{C}$ |
| Кт 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи | Охолоджене повітря, Температура, повітря після видалення зайвої вологи | Термометр технічний, психрометричний метод | Після охолодження повітря Після видалення зайвої вологи | $t = 25\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$, $W = 60\text{-}70\%$ |
| Кт 2.5 Нагрівання Повітря | Нагріте повітря, температура | Термометр технічний | Після нагрівання повітря | $t = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ |
| Кт 2.6 Очищення повітря на головному фільтрі | Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків | Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра | Після очистки повітря на головному фільтрі | $E = 90\%$ |
| Кт, Км 2.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі | Очищене повітря, ступінь очищення, стерильність | Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль | Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі, мікробіологічний контроль після очистки | $E = 99,99\%$, відсутність мікробіоти |
| Кх 3.1 Приготування розчину соляної кислоти | Концентрація розчину соляної кислоти | Хімічний метод | Після приготування розчину | $C = 6 \%$ |
| Кх, Кт, Км 3.2 Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрія | Концентрація розчину гідроксиду натрію, температура, час, тиск, стерильність | Хімічний метод, манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Концентрація визначається після приготування розчину, температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $C = 6 \%$, $P = 0,15 \text{ МПа}$, $t = 131 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 40 \text{ хв}$, відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.1.1 Приготування і стерилізація композиції А | Композиція А, концентрація, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, хімічний метод, мікробіологічний контроль | Концентрація визначається після приготування розчину, температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $C = 40\%$, $p = 0,05 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$, $t = 112 \text{ }^\circ\text{C}$, відсутність мікробіоти |
| Кх 4.1.2 Приготування | Концентрація сульфату феруму | Хімічний метод | Після приготування розчину | $C = 1\%$, $V = 100 \text{ мл}$ |

| | | | | |
|--|--|--|---|---|
| розчину сульфату феруму семиводного | семиводного | | | |
| Кт, Км 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції Б | Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t = 131$ °С, відсутність мікробіоти |
| Кт, Км 4.1.4 Приготування і стерилізація композиції В | Композиція В, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль | Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $P = 0,15$ МПа, $\tau = 45$ хв, $t = 131$ °С, відсутність мікробіоти |
| Км 4.1.5 Змішування композицій | Композиція А, Композиція Б, Композиція В | мікробіологічний контроль | мікробіологічний контроль після змішування | відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.2.1 Приготування і стерилізація композиції А | Композиція А, концентрація, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, хімічний метод, мікробіологічний контроль | Концентрація визначається після приготування розчину, температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $C = 40\%$, $p = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $t = 112$ °С, відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б в інкуляторі | Композиція Б, температура, час, тиск, рН, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль | Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, рН визначається до та після стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t = 131$ °С, $pH = 5,0$, відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.3.1 Приготування і стерилізація композиції А | Композиція А, концентрація, температура, час, тиск, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, хімічний метод, мікробіологічний контроль | Концентрація визначається після приготування розчину, температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, | $C = 40\%$, $p = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, $t = 112$ °С, відсутність |
| | | | мікробіологічний контроль після стерилізації | мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б в посівному апараті | Композиція Б, температура, час, тиск, рН, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль | Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, рН визначається до та після стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | $P = 0,15$ МПа, $\tau = 40$ хв, $t = 131$ °С, $pH = 5,0$, відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.4.1 Приготування і стерилізація | Композиція А, концентрація, температура, час, | Манометр технічний, термометр | Концентрація визначається після приготування розчину, | $C = 40\%$, $p = 0,05$ МПа, $\tau = 30$ хв, |

| | | | | |
|--|--|---|---|---|
| композиції А | тиск, стерильність | технічний, годинник, хімічний метод, мікробіологічний контроль | температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | t = 112 °С, відсутність мікробіоти |
| Кт, Кх, Км 4.4.2 Приготування і стерилізація композиції Б у ферментаторі | Композиція Б, температура, час, тиск, рН, стерильність | Манометр технічний, термометр технічний, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль | Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, рН визначається до та після стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації | P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, t = 131 °С, рН = 5,0, відсутність мікробіоти |

7.2. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводиться з метою

- Виявлення контамінації
- Підтвердження фізіологічного стану культури;

Спочатку проводять мікроскопічне дослідження з використанням препарату "розчавлена крапля". Препарат "розчавлена крапля" готується на добре відмитому та знежиреному предметному склі, на яке наносять невелику краплю культуральної рідини, накривають покривним скельцем і спостерігають за допомогою об'єктива з 40х. При виявленні сторонньої мікрофлори її переносять на чашку Петрі.

Колонії відокремлюють, наносячи петлю культуральної рідини на чашку Петрі на м'ясо-пептонний агар (МПА) (37°С, 24 години інкубації) для бактерій і на сусло-агар (WA) (30°С, 48-72 години інкубації) для дріжджів і грибів.

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

Визначення вмісту абсолютної сухої біомаси (АБМ) міцелію проводиться шляхом висушування міцелію до певної ваги. Вихідний розчин виливають на попередньо зважений сушильний фільтр, а концентровану біомасу кількісно переносять на той самий фільтр. Паперовий фільтр зважують на аналітичних терезах. Фільтр з біомасою продуцента висушують до сталої маси при 105-110 °С за допомогою приладу Чижової, охолоджують у випарнику і зважують на аналітичних терезах. Потім визначають кількість АСБ [26].

7.3.2. Концентрація цільового продукту

Метод заснований на кількісному визначенні редукуючих цукрів, що вивільняються в результаті гідролізу целюлози на хроматографічному папері під дією ферменту в складі целюлозорозщеплювального комплексу; одна одиниця целюлозорозщеплювальної активності (одна одиниця ЦДА) означає, що при температурі 50°C і рН 4,7 Кількість ферменту, що каталізує гідроліз целюлози і виробляє 1 мкмоль відновлювального цукру (еквівалент глюкози) за 1 годину.

Вміст редукуючих цукрів, які утворились в результаті реакції ферментативного зозщеплення, визначають колориметричним методом з використанням реагенту динітросаліцилової кислоти (DAS). Діапазон вимірювання 0,5-25,0 одиниць СІА [38].

Обладнання: фотоелектричний колориметр ($\lambda = 540$ нм), рН-метр (похибка не більше $\pm 0,1$ од. рН), магнітна мішалка (не більше 800 об/хв), гіпертермометр (точність ± 1 °С), лабораторна центрифуга (не менше 7000 хв-1), лабораторні ваги, піпетка, секундомір (ціна поділки 0,2 с), сита (dпор = 1 мм).

Реактиви: оцтова кислота, тринатрію ацетат, натрію гідроксид, 3,5-динітросаліцилова кислота, D-глюкоза, дистильована вода, хроматографічний папір (масою до 102 мг).

Методика визначення.

1. Ацетатний буферний розчин готують змішуванням 57 мл оцтової кислоти (молярна концентрація 0,1 моль/л), попередньо розчиненої у 200-300 мл води, та 13,6 г ацетату натрію (молярна концентрація 0,1 моль/л), розчиненого у 200-300 мл води у колбі ємністю 1 л.

2. Розчин натрію гідроксиду, змішавши 16,05 г натрію гідроксиду з 150 мл дистильованої води (масова частка 10,7%). Дайте отриманому розчину охолонути до кімнатної температури.

3 Для приготування реагенту розчиніть 10 г (масова частка 10,7 %) динітросаліцилової кислоти у склянці об'ємом 1 л разом з 400 мл ДМСО. Перемішують при кімнатній температурі протягом 25-30 хв на магнітній мішалці. Потім поступово додають 150 мл натрію гідроксиду при перемішуванні. Колір змінюється від блідо-жовтого до яскраво-жовтого. 4.

4. Помістити склянку з отриманим розчином на водяну баню при температурі 47 ± 1 °C і поступово додати 300 г калій-натрій тартрату при постійному перемішуванні до повного розчинення реактиву.

5. Дати розчину охолонути до кімнатної температури, перенести в мірну колбу на 1 л, точно розвести дистильованою водою і за необхідності відфільтрувати. Приготований реагент повинен бути яскраво-жовтого кольору (без червонуватого відтінку).

6. 90 мг глюкози в мірній колбі на 100 мл розчинити в невеликій кількості буфера (30-50 мл), довести до постійного об'єму дистильованою водою і добре перемішати.

7. Для побудови калібрувальної кривої з реактивом D1C у пробірку вносять 1 мл розчину глюкози, дистильовану воду та 3 мл реактиву D1C і швидко перемішують.

8. приготуйте контрольний зразок реагенту так само, як і на попередньому кроці. Додайте 1 мл буферного розчину і 3 мл реагенту D1C до 1 мл дистильованої води. Помістіть пробірку на киплячу водяну баню та інкубуйте протягом 5 хв.

9. дайте пробіркам охолонути до кімнатної температури і виміряйте оптичну густину розчину при довжині хвилі 540 нм на фотоелектроколориметрі, використовуючи кювету товщиною 10 мм.

10. Побудуйте графік залежності оптичної густини від концентрації глюкози (мкмоль/мл) на основі отриманих даних. Відкладіть молярну концентрацію глюкози (мкмоль/мл) на горизонтальній осі, а оптичну густину - на вертикальній осі. Робоча область калібрувальної кривої знаходиться в діапазоні оптичних концентрацій 0,15-0,65.

11. Для приготування розчину ферментного препарату візьміть наважку 0,1-10 г і суспендуйте її в 50 мл дистильованої води за допомогою магнітної мішалки протягом 15 хвилин. Суспензію переносять у мірну колбу на 200 мл і точно розводять дистильованою водою. Отриману суспензію центрифугують при швидкості 7000 хв-1 протягом 15 хвилин.

12. Робочий розчин готують шляхом розведення (в 10 разів) вихідного розчину ферментного препарату дистильованою водою, щоб оптичні концентрації

досліджуваного і контрольного розчинів при вимірюванні активності потрапляли в межі калібрувальної кривої.

13. Для визначення редукуючих цукрів методом реактиву DNS після гідролізу відбирають по 1 мл реакційної суміші з двох пробірок (пробірок) в чисту пробірку; в третю контрольну пробірку додають 2 мл робочого розчину і відразу ж відбирають 1 мл суміші в чисту пробірку. негайно додайте в усі три пробірки по 1 мл дистильованої води і по 3 мл реагенту DNS. Ретельно перемішайте і помістіть пробірки на киплячу водяну баню на 5 хвилин і дайте охолонути до кімнатної температури.

14. Визначте молярну концентрацію глюкози (мкмоль/мл) у досліджуваному та контрольному розчинах за калібрувальним графіком.

15. Розрахувати целюлозолітичну активність в одиницях СІА/г ферментного препарату при вимірюванні з реактивом DSS, згідно з рівнянням (9.2):

$$\text{ЦЛА} = \frac{C_0 - C_x}{tc}, \quad (9.2)$$

де: C_0 – молярна концентрація глюкози у дослідній пробі у відповідності до градуовального графіку (мкмоль/мл);

C_x – молярна концентрація глюкози у контрольній пробі у відповідності до градуовального графіку (мкмоль/мл);

t – тривалість гідролізу;

c – масова концентрація ферментного препарату в реакційній суміші, г/мл, яку обчислюють за формулою (9.3):

$$c = \frac{m}{VP2},$$

(9.3)

де: m – маса наважки ферментного препарату;

V – об'єм розведення наважки при виготовленні основного розчину;

P – розведення основного розчину ферментного препарату для виготовлення робочого розчину;

2 – розведення робочого розчину в реакційній суміші.

1. За кінцевий результат приймають середнє арифметичне значення результатів двох паралельних визначень, який округлюють до першого десяткового знака ($X \pm \Delta$), од/г при вірогідності:

$$P = 0,95, \text{ де } \Delta = 0,01 \xi \times X, \text{ при } \xi = \pm 7 \%.$$

2. Результати вважаються дійсними, якщо задовольняють наступному виразу (9.4):

$$|X_1 - X_2| \leq r \times 0.01 \times X$$

(9.4)

де: X_1 та X_2 – результати двох паралельних визначень, отримані в умовах

повторюваності при $P = 0,95$ од/г;

X – середнє арифметичне двох паралельних визначень, од/г;

r – межа повторюваності (5 %) [38].

7.3.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення джерела вуглецю [13]

Метод заснований на зважуванні висушеного осаду борошна висівок. Щоб отримати правильні результати, борошно висівок необхідно відокремити від рідкої фізи.

Прилади, посуд і реактиви: терези лабораторні загального призначення, колба конічна, колба мірна об'ємом 100 см³, шпатель, воронки, шафа сушильна.

Техніка аналізу. Ваговий метод передбачає безпосереднє зважування відфільтрованого осаду борошна висівок на аналітичних або торсійних терезах і виконується в лабораторних умовах після висушування. Пробу культуральної рідини профільтровують через фільтр №70-77. Осад з фільтром підсушують до зникнення мокрих плям, переносять у чашку Петрі або бюкс і зважують на терезах (масу чашки Петрі або бюкса з вологим ситом визначають заздалегідь). За різницею мас отримують масу зоопланктону. Знаючи об'єм культуральної рідини і масу осаду розраховують борошна висівок.

Визначення концентрації джерела азоту [13]

Визначення вмісту нітратного азоту. Джерелом азоту в середовищі є нітрат натрію, тому нітратний азот вимірюють за методом Поупа і Стівенса (мідний метод).

Відберіть піпеткою 5 см³ досліджуваного розчину в мірну колбу на 50 см³ і додайте 3-4 краплі індикатора тимофталеїну та водного розчину гідроксиду натрію з концентрацією 0,1 моль/дм³ до появи блакитного забарвлення. До слабого лужного розчину обережно додають 30 см³ суспензії ортофосфату міді, перемішуючи, доводять вміст колби дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат повинен бути прозорим.

Відберіть піпеткою 10 см³ абсолютно прозорого фільтрату в порцелянову чашку або конічну колбу і додайте 0,5 см³ 80% оцтової кислоти (підкисленої) і 10 см³ розчину йодату калію. Після перемішування йод, що виділився, титрують з мікробюретки розчином тіосульфату натрію з концентрацією 0,01 моль/см³. В кінці титрування додають одну-дві краплі розчину крохмалю. Кінець титрування визначають за зникненням синього забарвлення однієї краплі тіосульфату натрію.

У прохідному розведенні масу наважки тіосульфату натрію, що пішла на титрування, множать на 0,28, щоб отримати кількість аміної форми азоту у фільтраті 10 см³. З урахуванням розчинення це відповідає 1 см³ культурального середовища. Вміст нітратного азоту розраховують за формулою (1):

$$X = \frac{a \cdot 0,28 \cdot 6 \cdot 10 \cdot 100}{50} \text{ мг в } 100 \text{ см}^3 \text{ культуральної рідини,}$$

Де а - об'єм розчину натрій тіосульфату концентрацією 0,01 моль/дм³, що пішов на титрування, см³;

б - об'єм досліджуваного розчину, використаний для аналізу, см³.

Крім того, протягом усього процесу біосинтезу контролюються такі параметри культури

Температура. Температуру контролюють за допомогою термометра;

Аерація. Для визначення цього показника використовується система моніторингу розчиненого кисню Simvolt-FitFish. Датчики кисню і температури занурюються в рідину, і на дисплеї відображається концентрація кисню. До цієї

системи можна підключити аератор для автоматичного регулювання кількості кисню, що генерується.

Манометри використовуються для вимірювання та контролю надлишкового тиску [14].

Забарвлення, що з'являється, поглинає випромінювання широкого діапазону довжин хвиль, і за певних умов його інтенсивність пропорційна кількості амонію. Експерименти проводять при $\lambda = 400 - 425$ нм ($< 0,2$ мг NO_3) і при $\lambda = 550 - 580$ нм (для ≈ 1 мг). При вимірюванні за допомогою спектрофотометра діапазон концентрацій може бути розширений до $1,25$ мг (при $\lambda = 580$ нм). При визначенні мікрограмових кількостей азоту оптична густина розчинів повинна зберігатися постійною протягом 6 годин після додавання реагентів. Коливання температури в межах $20 - 40$ °C не впливають на результати визначення. Якщо реакція протікає довше $15 - 20$ хв., то при вмісті азоту > 1 мг може спостерігатися помутніння або замутнення розчину (що свідчить про неточність результатів)). Оскільки однією з причин таких негативних реакцій є пари органічних розчинників (особливо кетонів, спиртів і хлороформу), рекомендується проводити вимірювання азоту в приміщенні, вільному від органічних розчинників. Для отримання точних результатів необхідно суворо дотримуватися умов проведення реакції і підготовки реагентів. Концентрація аналізованого розчину повинна бути в межах $0,5-0,6$ н.

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

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

У процесі виробництва утворюється велика кількість відходів, стічних вод і забрудненого повітря, які необхідно правильно утилізувати для охорони довкілля згідно з вимогами СН 245171 ("Санітарні норми проектування промислових підприємств") і ДБН 173196 ("Державні санітарні правила з планування та забудови населених місць"), промислові підприємства повинні розташовуватися на території населеного пункту, у спеціально виділених промислових зонах або за межами населеного пункту на певній відстані (залежно від того, чи є викиди промислових забруднювачів в атмосферу житловими та громадськими будівлями).

Між підприємствами і населеними пунктами, тобто між місцями викидів промислових забруднень в атмосферу і житловими та громадськими будівлями, встановлюються санітарно-захисні зони, ширина яких залежить від підприємства, галузі та класу підприємства. Санітарні норми встановлюють п'ять класів підприємств, галузей і установ з урахуванням потужності підприємства, умов проведення технічних процесів, характеру і кількості викидів у навколишнє середовище шкідливих речовин і речовин із неприємним запахом або шкідливим фізичним впливом, а також заходів для зниження їхнього негативного впливу на навколишнє середовище.

Залежно від призначення будівлі та технології виробництва передбачаються зовнішні та внутрішні системи водопостачання.

| | | | | | | | | |
|-----------|------|--------------|--------|------|--------------------------|-------------------|------|---------|
| | | | | | НУХТ БТЕК 05.01.01. ПЗКР | | | |
| Змн. | Лист | № докум. | Підпис | Дата | ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ | Літ. | Арк. | Акрушів |
| Розроб. | | Антипенко В. | | | | | | |
| Перевір. | | Воронцов О. | | | | | | |
| Реценз. | | | | | | | | |
| Н. Контр. | | | | | | | | |
| Затверд. | | Стабніков В. | | | | | | |
| | | | | | | 60 Кафедра БТМ | | |

8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Залежно від технологічних вимог використовуються такі системи технологічного водопостачання: оборотне водопостачання, повторне водопостачання, охолоджувальна вода, дистильована вода, м'яка вода тощо. Системи оборотного і повторного водопостачання повинні використовуватися для зниження споживання води, необхідної для технологічного процесу. Системи питного водопостачання (фонтанчики) рекомендується встановлювати в коридорах, вестибюлях, кімнатах відпочинку, на відкритих майданчиках підприємств і, у виняткових випадках, у виробничих цехах. Мережа господарсько-питного водопостачання має бути відокремлена від мережі непитного водопостачання. Норма споживання питної та господарської води становить 45 літрів у гарячих цехах і 25 літрів на одного працівника на зміну у звичайних цехах.

Каналізаційні системи для очищення стічних вод можна розділити на виробничі, побутові, гнойові та стічні. Каналізаційні системи складаються з приймальних пристроїв (лотків, раковин), каналізаційних мереж, насосних станцій, очисних споруд і допоміжних пристроїв. Щоб уникнути забруднення ґрунтового водоносного горизонту, забороняється скидати побутові, фекальні та промислові стічні води в дренажні колодязі. Там, де це можливо, доцільною вважається кругова система водопостачання, за якої забруднена виробнича вода повторно використовується після очищення і задовольняє потреби технічного процесу.

Незабруднені промислові стічні води (наприклад, стічні води із систем охолодження) можна скидати в зливові стоки, призначені для відведення атмосферних опадів. Багатьом підприємствам дозволено скидати стічні води, що містять небезпечні речовини, у міську каналізаційну мережу після відповідного очищення, за умови, що концентрація небезпечних речовин у суміші промислових і міських стічних вод не перевищує встановлених норм [49].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Основними методами знешкодження та захоронення твердих промислових відходів являються:

1. біологічне окислення ;
2. термічна обробка;
3. складування у поверхневих сховищах;
4. захоронення високотоксичних речовин та їх сполук в поверхневих шарах землі.

Біологічне окислення використовують для знешкодження та стабілізації осадових стічних вод на очистних спорудах. В результаті його застосування утворюється біогаз та органічні добрива. Біогаз використовують для одержання тепла та електроенергії, а органічні добрива в сільському господарстві. В останній час все більше застосування для знешкодження та утилізації твердих промислових відходів знаходять термічні методи їх обробки на сміттєспалювальних заводах та полігонах.

Незалежно від конструкції застосованих печей спалювання вони повинні забезпечувати:

1. добре перемішування відходів в процесі горіння для забезпечення більш повного їх згорання;
2. збереження і підтримка достатньо високих температур, що забезпечить повне знешкодження токсичних компонентів.

Спалювання помірно та мало небезпечних твердих промислових відходів можна здійснювати в печах різної конструкції (камерні, барабанні, із зваженим шаром та інші), але в кожній із них повинні існувати наступні температурні зони.

Перспективними напрямками термічної обробки твердих промислових відходів являються:

- Низькотемпературний піроліз;
- Високотемпературний піроліз.

Піролізні продукти з успіхом використовуються в якості сировини для виробництва органічного синтезу або палива. Процес низькотемпературного піролізу проходить при температурах від 300 до 900⁰ С в стаціонарних вертикальних циліндричних печах (ретортах). В якості теплоносія використовуються рідкі продукти розкладання твердих горючих матеріалів, розплави солей та інші матеріали.

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Промислові способи очищення газових викидів від газо- і пароподібні токсичних домішок можна розділити на три основні групи:

- 1) абсорбція рідинами;
- 2) адсорбція твердими поглиначами;
- 3) каталітична очистка.

У менших масштабах застосовуються термічні методи очищення (спалювання або допалювання) горючих забруднень, спосіб хімічної взаємодії домішок з сухими поглиначами і окислювання домішок озоном.

Абсорбція рідинами застосовується в промисловості для вилучення з газів діоксиду сірки, сірководню, сірковуглецю, меркаптанів та інших сірчистих сполук, оксидів азоту, галогенів та їх сполук, парів кислот (HCl, HF, H₂SO₄), діоксиду та оксиду вуглецю, різноманітних органічних сполук (фенол, формальдегід, летючі розчинники та інше).

8.2.4. Заходи щодо зменшення об'ємів відходів

Система поводження з відходами на підприємстві включає наступні етапи:– інвентаризація, виявлення та ідентифікація, паспортизація відходів;– нормування утворення відходів;– постановка на облік об'єктів їх утворення (розробка реєстрових карт об'єкту утворення відходу та ведення реєстрів);– утилізація і видалення відходів;– організація первинного обліку і поточного контролю над утворенням відходів і поводження з ними. Державний облік відходів –єдина державна система збирання, узагальнення, всебічного аналізу та зберігання відомостей про відходи під час їх утворення та здійснення операцій поводження з ними. Державному обліку та паспортизації підлягають в обов'язковому порядку всі відходи, що утворюються на території України. Державний облік відходів ґрунтується на даних спостережень за утворенням відходів та здійсненням операцій поводження з ними і включає ведення первинного обліку відходів та державної статистичної звітності про них.

Прогнозування і виявлення відходів починається на основі оцінки матеріального балансу кожного елемента життєвого циклу виробництва, товарів і

послуг. Ідентифікація відходів –віднесення відходів до певних категорій та класифікаційних груп, виходячи з їх походження, складу, стану, небезпеки для довкілля, здоров'я людини, технологічних можливостей утилізації, знешкодження. Ідентифікацію проводять на підставі:–фізичного (агрегатного) стану відходів та визначення їх хімічного, речовинного та гранулометричного складу за загальними методиками,–визначення небезпечних властивостей за встановленим порядком та стандартними методиками–радіаційно-гігієнічних характеристик, встановлених за стандартними методиками–віднесення до певного класу (категорії) небезпеки. На основі ідентифікації складають характеристику відходів, у якій зазначається агрегатний стан, клас небезпеки (затоксичністю), хімічний та (або) матеріальний (речовинний) склад, фізико-механічні властивості тощо. Інвентаризація відходів – комплекс разових організаційно-технічних заходів з виявлення, ідентифікації, опису і реєстрації відходів, обліку обсягів їх утворення, утилізації та видалення, а також виявлення і обстеження місць утворення відходів і об'єктів поводження з ними. Виявлені та ідентифіковані відходи підлягають первинному обліку, який виконують шляхом реєстрації обсягів фактичного поточного утворення відходів за відповідними формами, затвердженими у встановленому порядку, згідно із інструкцією з заповнення зазначених форм.

Первинний облік відходів ведуть підприємства відповідно до типових форм первинної облікової документації (картки, журнали, анкети) з використанням технологічної, нормативно-технічної, планово-економічної, бухгалтерської та іншої документації. На підприємствах має бути введено в дію типову форму первинної облікової документації №1-ВТ «Облік відходів та пакувальних матеріалів і тари». Інформація, наведена у типовій формі № 1-ВТ, може використовуватися для ведення державного обліку і паспортизації відходів, складання адміністративної звітності, проведення контролю, експертизи проектів та об'єктів, підготовки технічної документації, реєстраційних карток для реєстрів місць утворення, перероблення та видалення відходів, проведення інвентаризації, отримання дозволів на утворення і розміщення відходів, отримання ліцензій на поводження з відходами і

упаковкою, оперативного вирішення питань поводження з неякісною та небезпечною продукцією, ідентифікації та паспортизації потенційно небезпечних об'єктів і укладання декларацій безпеки, заповнення документів для транскордонних перевезень відходів тощо. Паспортизація охоплює послідовне збирання, узагальнення та зберігання та зберігання відомостей про кожний конкретний вид відходів: їх походження, технічні, фізико-хімічні, технологічні, санітарні та інші показники, методи їх вимірювання та контролювання, технології їх знешкодження, оброблення, перероблення, утилізації або видалення. Паспортизують відходи на підприємствах з метою вичерпної ідентифікації та визначення оптимальних шляхів поводження з ними. За підсумками паспортизації складають паспорти відходів. Паспортизація відходів передбачає складення і ведення паспортів відходів, паспортів місць видалення відходів (МВВ), реєстрових карт об'єктів утворення, оброблення та утилізації відходів. На кожне МВВ складається спеціальний паспорт, у якому зазначається найменування і код відходів, їх кількісний та якісний склад, походження, а також технічні характеристики і відомості про методи контролю та безпечної експлуатації.

Спеціальний паспорт складається власником МВВ відповідно до Інструкції про зміст і складання паспорта місць видалення відходів. До місць видалення відходів прирівнюються місця довгострокового (понад 2 роки) зберігання відходів.

Спеціальний паспорт місця видалення відходів складається власником МВВ. Власники МВВ несуть відповідальність за достовірність і повноту інформації, наведеної в паспорті. Дані паспорта МВВ, після його затвердження і присвоєння реєстраційного номера, вносяться до реєстру місць видалення відходів відповідно до Порядку ведення реєстру місць видалення відходів. Реєстр місць видалення відходів - це система даних, одержаних у результаті обліку та опису всіх об'єктів і спеціально відведених місць, де здійснюються операції з видалення відходів. Включенню до реєстру підлягають усі місця видалення відходів (ті, що функціонують, закриті, законсервовані тощо).

Ведення реєстру здійснюють місцеві державні адміністрації. Реєстр об'єктів утворення, оброблення та утилізації відходів - це комплексна система

збирання, оброблення, збереження та аналізу інформації про об'єкти утворення, оброблення та утилізації відходів. Реєстр складається з двох частин. До першої частини реєстру включаються об'єкти утворення відходів (ОУВ). До другої частини реєстру включаються об'єкти оброблення та утилізації відходів(ООУВ) інших власників.Критерієм включення ОУВ до реєстру є показник загального утворення відходів (Пзув). До реєстру включаються об'єкти, для яких показник загального утворення відходів перевищує граничне значення (Пгз), що дорівнює 1000 умовних одиниць на рік. Критерієм включення ООУВ до реєстру є показник загального обсягу оброблення чи утилізації відходів, який не може бути меншим 100 тонн на рік. За рішенням місцевих державних адміністрацій до реєстру можуть бути включені ОУВ, для яких показник Пзув менший від Пгз, якщо ОУВ розташовані у рекреаційній і курортній зоні Реєстр складається і ведеться на підставі реєстрових карт ОУВ та ООУВ, що містять звітні дані щодо виробників відходів, об'єктів утилізації та оброблення відходів, а також відомостей, поданих спеціально уповноваженими органами виконавчої влади у сфері поводження з відходами.Реєстрові карти, які містять інформацію про розміщення, технічні та екологічні характеристики ОУВ та ООУВ, кількісні та якісні характеристики відходів, що утворюються, обробляються та утилізуються, та інформацію про поводження з ними, складаються відповідно до Інструкції про зміст і складання реєстрових карт об'єктів утворення, оброблення та утилізації відходів.

Щорічно власники ОУВ та ООУВ подають дані про зміни у діяльності своїх об'єктів для внесення відповідних змін до реєстрових карт та реєстру. За даними реєстрів формуються державний та регіональні інформаційні банки даних. Класифікація відходів – процес впорядкування даних про відходи, який охоплює ідентифікацію виду відходів відповідно до їхнього стану, складу і властивостей через номенклатурну назву, сіввіднесення з певним процесом утворення та видом економічної діяльності та віднесення до будь-яких інших діючих систем групування чи переліків (забруднень вторинних ресурсів, токсикантів та ін.), категорій речовин, матеріалів та інших об'єктів, а також до певних видів перероблення, утилізації та видалення відходів.Номенклатурна назва відходу – спеціальний термін, який відображає стан і структуру відходів за місцем

їх утворення або виявлення, складається з одного слова або комбінації слів і відповідає: конкретному різновиду відходів, загальному стану відходу в цілому та його компонентів, назві речовини, матеріалу, готового виробу чи іншій номенклатурній назві сировини або продукції, що частково або повністю визначає склад і стан відходу у цілому або його компонентів, стану відходу, як продукт процесу, в якому він утворюється.

Основний документ, який встановлює класифікацію відходів в Україні - Державний класифікатор відходів ДК 005-96. Класифікатор відходів забезпечує інформаційну підтримку у вирішенні широкого кола питань державного управління відходами та ресурсовикористання на базі системи обліку та звітності, гармонізованої з міжнародними системами, зокрема у галузі екології, захисту життя та здоров'я населення, безпеки праці, ресурсозбереження, структурної перебудови економіки, сертифікації продукції (послуг) та систем якості. Нормування в сфері поводження з відходами – це визначення обмежень щодо утворення та розміщення відходів на рівні максимально допустимого впливу людини на навколишнє природне середовище, що забезпечує техногенно–екологічну безпеку та раціональне поводження з ресурсами. Основним завданням нормування відходів є скорочення питомої витрати сировини, ресурсів, обсягів утворення відходів при дотриманні технологічних регламентів виробництва і експлуатації, а також необхідної якості продукції, що випускається.

Для визначення нормативних обсягів утворення відходів у загальному вигляді необхідно виявити джерела утворення відходів; вивчити номенклатуру відходів, що утворюються; вивчити звітні дані за ряд років про обсяги утворення відходів або матеріальний баланс виробництва; розрахувати кількість (обсяги) нормативного утворення відходів на підставі наявних формул і довідкових даних по вхідних в них параметрами.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мікробіологічні препарати [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.centrbio.com/preparaty.php>
2. Пат. №85761 UA. Спосіб отримання целюлаз / Пархомець М. К. (UA), Броцак І. С., Кулик С. М., Сенік І. І., Скаржинський В. Ф., Майструк О. Я. – Опубл. 25.11.2013.
3. Пат. №2380906 UA. Самоконсервуючий біопрепарат для захисту рослин від хвороб та спосіб його одержання / Л. В. Коломбет, С.Л. Жиглетова. Ю. Л. Дородних. - Опубл. 10.02.2010.
4. Пат. №2408563 UA. Спосіб отримання біогумусу / Н.М. Терещенко, О.Б. Бубіна, Т. В. Юнусова. - Опубл. 10.01.2011.
5. Штам мікроміцету *Trichoderma viride*, шт.23, що характеризується підвищеною целюлолітичною активністю / Чекасіна Е.В. Опубл. 10.08.2002
6. Пат. №2170511 UA. Препарат для гідролізу лігнін-целюлозних відходів / Коломбет Л.В.; Єжов Д.В.; Жиглетова С.К.; Бистрова Є.В.; Косарева Н.І. - - Опубл. 20.07.2001.
7. Апсіте А.Ф., Швінка Ю.Е., Стрікауска С.В., Віестурс У.Е., Лісовська А. Я., Бічевскіс Є.Я., Свока І.М., Беніка Р.Г. Використання целовіридину для покращення біодоступності кормів // Вест. с.-г. науки. - №9 (397). – 1989с. - 114-118.
8. Пат. №77546 UA. Препарат для гідролізу целюлози / Гебауер О. (DE), Гройль Й. Н. (DE),.. – Опубл. 15.12.2006.
9. Benitez T.V. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains* / T.V. Benitez, AM. Rincon, M.C. Лімон, A.C. Codon // International Microbiology. -2004. – Vol. 7 №4. - P. 60-63.
10. Бабицька В.Г. Гриби – ефективні деструктори лігноцелюлозних субстратів: їхня морфологічна та фізіолого-біохімічна характеристика / В.Г. Бабицька. - М.: Нова Хвиля, 2003. - 38 с.
11. Пат. №2121793 UA. Штам гриба *Trichoderma lignorum*, що використовується для гідролізу лігноцелюлозних субстратів / Степанова О.В.; Штерншіс М.В.; Рєпін В.Є.- Опубл. 20.11.1998.

12. Пат. №2081167 UA. Штам гриба *Trichoderma viride* для одержання препарату целюлолітичних ферментів / Новікова І.І.; Литвиненко О.І.; Нугманова Т.А.; Калько Г.В ... - Опубл. 10.06.1997.
13. Малежик І. Ф. Процеси та апарати харчових виробництв: Підруч. для студ. вищ. навч. закл., які навч. за напрямом підготовки "Харч. технологія та інженерія" / Нац. ун-т харч. технологій. – К.: Бібліогр., 2003. – 400 с.
14. Новіков Д.А. Виділення та очищення продуктів біотехнології. Методичний посібник - Львів. -2014. - 256 с.
15. Загальні технології харчової промисловості: Метод. вказівки до вік. 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. Бондарь, Ю.В. Булій. - К: НУХТ, 2011. - 53 с
16. Волинець В.Ф., Волинець М.П. Аналітична хімія азоту. - К.: Наука, 1977. - 307 с.