

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

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

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

«  » \_\_\_\_\_ 20   р.

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

«  » \_\_\_\_\_ 20   р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

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

на тему: «Культивування *Beauveria bassiana* з метою одержання Боверину»

Виконав: здобувач   5   курсу, групи   1  

Оністратенко Марія-Владислава Юріївна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Карлаш Юрій Васильович  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

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

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь Бакалавр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Завідувач кафедри  
біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

“28” жовтня 2020 року

**ЗАВДАННЯ**

**НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Онiстратенко Марії-Владислави Юрїївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Beauveria bassiana* з метою одержання Боверину»

керівник роботи Карлаш Ю.В., доц., к.т.н.  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 31.01.2021 р.

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 16 м<sup>3</sup>,  
коефіцієнт заповнення ферментера становить 0,6 ,  
цільовий продукт боверин , виробничий штам *Beauveria bassiana* TC-92,

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
Обґрунтування вибору біологічного агенту, техніко-економічне  
обґрунтування, параметри культивування біологічного агенту, точки  
контролю виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва боверину формату А1- 1 аркуш  
Апаратурна схема виробництва боверину формату А1 - 1 аркуш



## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	3
ВСТУП .....	4
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	6
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА .....	11
2.1. Таксономічний статус.....	11
2.2. Морфолого-культуральні ознаки біологічного агента.....	12
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	13
2.4. Розмноження грибу.....	15
2.5. Схема біотрансформації.....	15
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ. ....	20
3.1. Потреба в цільовому продукті .....	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва .....	23
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	27
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	27
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	33
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	36
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	60
ДОДАТКИ	

## РЕФЕРАТ

Проект присвячений виробництву біомаси грибу *Beauveria bassiana* – продуцента препарату захисту рослин Боверин; складається зі вступу, семи розділів, графічних матеріалів та списку використаної літератури з 14 найменувань. Загальний обсяг роботи – 55 сторінок, 3 рисунків, 2 креслення формату А1.

У кваліфікаційній роботі дано обґрунтування та викладено технологічний процес ділянки біосинтезу виробництва препарату, який включає блок допоміжних робіт та стадії вирощування культури.

Складено аналітичний огляд літератури щодо властивостей, сучасних форм та галузей застосування препарату захисту рослин Боверин. Внесено пропозиції з удосконалення процесу ферментації: з метою зменшити витрати на закупівлю компонентів до поживного середовища запропоновано замість глюкози використовувати крохмаль.

**Ключові слова:** мікроорганізм, ентамопатогенний гриб, продуцент, *Beauveria bassiana*, субстрат, штам, катаболізм, синтез, гліколіз, Боверин, ферментер, поживне середовище, промислове культивування, біосинтез, апаратурна схема, технологічна схема.

## ВСТУП

Як одна з найважливіших проблем біотехнології, в усьому світі широко досліджується можливість керування процесом азотфіксації, у тому числі можливість уведення генів азотфіксації в геном корисних рослин, а також процесом фотосинтезу. Ведуться дослідження з поліпшення амінокислотного складу рослинних білків. Розробляються нові регулятори росту рослин, мікробіологічні засоби захисту рослин від хвороб і шкідників, бактеріальні добрива [1].

Хвороби рослин, включаючи грибкові та вірусні, можуть знищити врожай та суттєво знизити якість продукції. Японські вчені запропонували підвищувати врожайність без хімії, а лише за рахунок збагачення ґрунту гумусом природним шляхом. Не секрет, що екологічно чистої рослинності сьогодні нам бракує. Це відбувається тому, що у світі стали використовувати ґрунт як субстанцію для наповнення його хімічними добривами і за рахунок цього домагатися підвищення зборів вирощуваних культур. А щоб їх захистити від бур'янів, шкідників і хвороб, інтенсивно застосовуються гербіциди та пестициди. Вирощування різних традиційних культур - це дуже важка праця.

**Актуальність.** Препарат Боверин, є важливим для сільського господарства оскільки, захищені від хвороб сорти надають сільськогосподарські, економічні переваги фермерам, та не забруднюють навколишнє середовище. Фермери зможуть боротися з комахами, які розповсюджують вірусні хвороби, та, таким чином, захистити свої врожаї. Фермери мають можливість вирощувати вищі врожаї на тій же площі, та зменшувати витрати ресурсів, таких як: робоча сила, добрива, пестициди, насіння та обладнання. Ці переваги дозволяють фермерам обробляти додаткові площі, або збільшувати врожай на одиницю площі і, як наслідок, дозволяє їм збільшити законсервовані площі.

**Новизною проекту** виробництва препарату для захисту рослин є заміна методу поверхневого культивування на глибинне. Оскільки при

глибинному методі культивування отримання бластоспор грибу *Beauveria bassiana* відбувається за менш тривалий час, у порівнянні з отриманням бластоспор методом поверхневого культивування. Це відбувається через те, що під час глибинного культивування, в порівнянні з поверхневим клітини тривалий час перебувають у фазі експоненційного росту за постійної концентрації субстрату.

## РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 1.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва



Рис.1.1.1 Боверин [2]

Мікробіологічний препарат інсектицидної дії на основі ентамопатогенного гриба - *Beauveria bassiana* з титром не нижче  $20 \times 10^9$  спор в мл препарату [2].

Рекомендується для захисту сільськогосподарських і квітково-декоративних культур закритого ґрунту від трипсів, оранжерейної білокрилки, личинок грибних комариків, мух, плодожерок, личинок, капустяної совки, трипсів [3].

Механізм дії. Конідіоспори гриба, потрапивши на тіло комахи, проростають і проникають в порожнину тіла, розчиняючи ферментами кутикулу, при цьому виділяють токсини, викликаючи загибель шкідників. Грибниця пронизує все тіло комахи, утворюючи на його поверхні шар конідіеносців з конідіями. Комаха гине, а конідії переносяться на інші рослини. Застосування та умови обробки [4].

\* Витрата препарату від 3 до 9 л / га в залежності від чисельності шкідника.

					НУХТ БТЕК 05.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Оністратенко			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					6	5
Реценз.						8		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

\* Витрата робочої рідини 0,5 л/м<sup>2</sup> або 1500-2000 л на 1 га при концентрації 0,5-1%.

\* Обприскування вегетуючих рослин. Проводять регулярну обробку рослин з інтервалом 7-14 днів, причому половину суспензії наносять на рослини, другу – на ґрунт.

\* Оптимальна температура для розвитку ентомопатогенних грибів +16 ... +28° С, при відносній вологості повітря: 80-85%.

Біологічна ефективність через 30 днів після застосування препарату становить 75-82%.

Застосовується замість аналогічних хімічних препаратів. Безпечний для людей, тварин і корисних комах.

Зберігати при температурі 15 ... 20°С – 3 місяці.[2]

Для вирощування *Beauveria bassiana* традиційно використовують пептон, дріжджі кормові, крохмаль, пивне сусло. З метою здешевлення виробництва препарату було підібрано поживне середовище, до складу якого входять: кормові дріжджі, крохмаль, хлорид натрію, хлорид марганцю, хлорид кальцію, кукурудзяний екстракт, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, де джерелом вуглецю є крохмаль [2].

Препарат захисту рослин можна отримати в рідкому вигляді, а також у вигляді гранул.

#### *Отримання препарату в рідкому вигляді*

Отриману культуральну рідину концентрують фільтрацією, отримуючи суспензію, що містить міцелій, залишки поживного середовища та бластоспори. У пасту вводять гліцерин і змочений поліетиленоксид, перемішують і охолоджують. Отримують ентомопатогенний препарат Боверин, що представляє собою стійку суспензію і має таку характеристику: біологічна ефективність в робочій концентрації 90% на трипса і личинки оранжерейної білокрилки. Орієнтований термін зберігання до трьох місяців при температурі 10°С [9].

#### *Отримання препарату в сухому вигляді*

Для отримання сухого препарату в пасту вносять суміш цеоліту типу NaX і монтморилоніту в кількості 20%. Витримують при перемішуванні для перерозподілу вологи і пропускають через гранулятор. Гранули висушують, фасують і маркують. Отримують Боверин у вигляді гранул від світло-сірого до темно-коричневого кольору, які в процесі зберігання і транспортування вони не злежуються. Біологічна ефективність на трипса в робочій концентрації 90% на трипса і личинки оранжевої білокрилки [9].

### 1.2 Токсична дія препарату захисту рослин Боверин

Дія *Beauveria bassiana* на комах починається із проникнення спори в порожнину тіла через шкірні покриви (кутикулу). Потрапивши в тіло, спора проростає в гіф, потім розростається міцелій, від якого відходять конідії. Виявившись у тілі, конідії циркулюють у гемолімфі. Уже на цій стадії можливе ураження комахи внаслідок виділення деякими штаммами значної кількості токсинів. Під час відсутності токсину міцелій поступово заповнює все тіло комахи, насамперед вражається м'язова тканина. Ріст гриба триває доти, поки всі тканини не будуть зруйновані. Можуть утворюватися конідієносці, що проривають кутикулу й облітають мертву личинку. Уражена комаха покривається білим ватяним нальотом (Рис.1.3.3.1.)[10].



Рис. 1.2.1. Комаха, уражена грибом *Beauveria bassiana*[10]

### 1.3 Галузь використання препарату захисту рослин Боверин

Рекомендована область застосування: Сільське господарство.

Традиційно фундаментальні дослідження вчених стають основою для

створення нових біотехнологій для промисловості, сільського господарства, охорони здоров'я й захисту навколишнього середовища. Надзвичайно актуальною темою біотехнології XXI століття стала розробка препаратів для захисту рослин на основі живих культур, які є високоефективними і відповідно безпечними для рослин і тварин. У ході дослідів і наполегливих пошуків отримано багато цінних препаратів [12].

У сільському господарстві для захисту рослин використовується біопрепарат Боверин. Це порошок білого або сіруватого кольору, до складу якого входять спори ентамопатогенного гриба *Beauveria bassiana*. Боверин рекомендується для захисту сільськогосподарських і квітково-декоративних культур закритого ґрунту від тепличної білокрилки та трипсів. Даний препарат також є високоефективним, проти колорадського жука [11].

Боверин, є важливим для сільського господарства оскільки, захищені від хвороб сорти надають, економічні переваги фермерам, та не забруднюють навколишнє середовище. Фермери зможуть боротися з комахами, які розповсюджують вірусні хвороби, та, таким чином, захистити свої врожаї. Фермери мають можливість вирощувати більшу кількість врожаю на тій же площі, та зменшувати витрати ресурсів, таких як: робоча сила, добрива, пестициди, насіння та обладнання. Ці переваги дозволяють фермерам обробляти додаткові площі, або збільшувати врожай на одиницю площі і, як наслідок, дозволяє їм збільшити законсервовані площі [11].

*Beauveria bassiana* заражає в першу чергу ослаблених комах. Тому для біологічної боротьби Боверин застосовується в суміші з малими дозами отрутохімікатів, що викликають ослаблення організму шкідника. Дозування отрут береться зазвичай в чотири-десять разів менше загальноприйнятої при хімічній боротьбі. Перед обприскуванням зважену порцію Боверину розмішують в невеликій кількості води і вливають в суспензію інсектициду.

Боверин рекомендується для захисту сільськогосподарських і квітково-декоративних культур закритого ґрунту від тепличної білокрилки та трипсів. Даний препарат також є високоефективним, проти колорадського жука.

Норма витрати препарату - 1-2 кг на 1 га. Рослини картоплі обробляють на початку масового переходу личинок у другий вік і через 12-15 днів після цього. Витрата рідини становить 400-450 л на гектар. Найбільш сприятлива температура для обробки +20-25 ° [11].

Таким чином, Боверин є біологічним ресурсом, що підтримує біосферний баланс. Також має оздоровче значення (заміна токсичних синтетичних інсектицидів на біологічні, засновані на вилучених з природи агентів). Сучасне трактування поняття «біологічні ресурси» ставить завдання розширити біоресурсні бази та розвиток біотехнологій, оптимізувати управління ресурсами природних і штучно створених біосистем.

## РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

З метою отримання препарату для захисту рослин Боверин використовують ентамопатогенний гриб *Beauveria bassian*.

Штам мікроскопічного гриба *Beauveria bassiana* ТС-92 отриманий шляхом селекціонування штаму *Beauveria bassiana* 124 / 1 з наступним відбором клонів за продуктивністю, біологічної ефективності на тест-комах і терморезистентності.

Штам депонований в Центральній колекції мікроорганізмів державного концерну "Біопрепарат" під N ЦКМ F-54 Ц. Для отримання ентомопатогенних препаратів штам вирощують на рідкому поживному середовищі, що містить 1% технічної глюкози, 3% гліцерину і 7% гідролізату білково-вітамінного концентрату при 25 ° С при аерації протягом 57 год, отриману культуральну рідину концентрують у 10 разів за обсягом, вводять стабілізатор і змочувач. Біологічна ефективність препарату проти трипса огірка при робочій концентрації 1% становить 90%[13-14].

### 2.1 Таксономічний статус

Ентомопатогенний гриб *Beauveriabassiana* - це недосконалий гриб (*Fungiimperfecti*). Рід *Beauveriabassiana*, відноситься до класу *Deuteromycetes*. Відрізняється від інших родів добре розвинутим міцелієм, наявністю конідій, які тримаються поодинці, не розташовуються дрібними ланцюжками, і мають фертильну частина конідіофори у формі зигзага і витягнуту догори. Вид *Beauveriabassiana* має сферичні, не еліпсоїдальних конідії розміром 2-3 - 2-2,5 мкм, які утворюють щільні пучки[15-16].

**Згідно з класифікацією грибів, розробленою у 70 – х на початку 80-х років ХХ ст.(Moreau 1978р.)**

**Надцарство *Eucaryota***

**Царство *Fungi***

					НУХТ БТЕК 05.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Оністратенко				РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Карлаш Ю.В.						131	9
Реценз.						13		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Пирог Т.П.							

Відділ *Eumycota*  
 Клас *Deuteromycetes*  
 Родина *Clavicipitaceae*  
 Рід *Beauveria*  
 Вид *Beauveriabassiana*

Таблиця 2.1.1

**Систематика грибів Кавалір-Сміта (1988 р.)**

Царство	Підцарство	Відділ	Представники
<i>Fungi</i>	<i>Eomycota</i>	<i>Archemycota</i>	Хитридіоміцети Зигоміцети Трихоміцети
<i>Microsporida</i>			Мікроспоровики
<i>Neomycota</i>	<i>Ascomycota</i>		Аскоміцети Клас <i>Plectomycetes</i> - Дейтероміцети
<i>Basidiomycota</i>			Базидіоміцети

Отже, за однією з сучасних систематик Кавалір – Сміта (1998) *Beauveria bassiana* відносять до відділу *Ascomycota* класу *Plectomycetes*. Характеризуються добре розвинутим міцелієм, міцелій септований [17].

**2.2. Морфолого – культуральні ознаки *Beauveria bassiana***

*Beauveria bassiana* — ентомопатогенний гриб сімейства *Clavicipitaceae*, відомий ще як збудник білої мускардини. *Beauveria bassiana* має багато штамів проявляючих значні відмінності в вірулентності, патогенності і специфічності. Штам гриба *Beauveria bassiana* ТС-92 характеризується наступними культурально-морфологічними ознаками [18-19].

При вирощуванні штаму на твердому середовищі Чапека при 26-27°C протягом 6 діб колонії білуватого кольору з точкою в центрі, з рівними краями. Повітряний міцелій розгалужений (рис. 2.2.1.), септований, гіфи міцелію в діаметрі 3,0 - 5,0 мкм. Конідієносці бутилевидні (рис. 2.2.2.), формуються поодинокі, попарно. Розмір конідій 2,8 - 3,5 мкм одноклітинні, одноядерні. На середовищі Сабуро, при тих же умовах, вирощування колонії

з рівними краями, білі з кремовим відтінком зверху і знизу, що врастають в агар, на сусло-агарі формує зморшкуваті колонії кремового кольору знизу і білі зверху, плоскі з піднесеним центром [20-21].

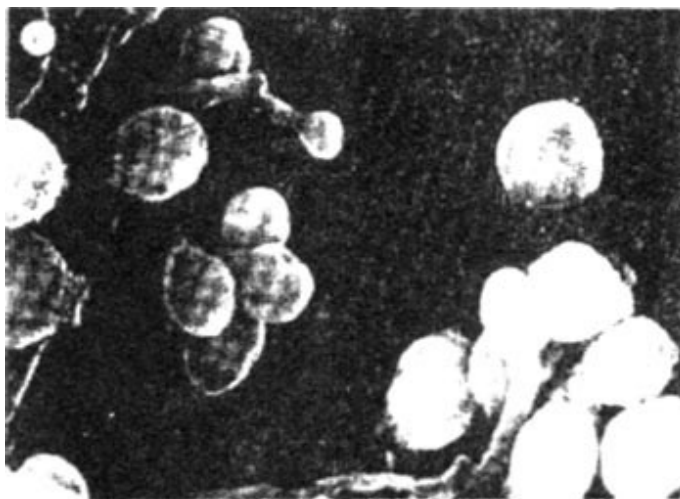


Рис.2.2.1. Гриб *Beauveria bassiana* в скануючому мікроскопі (конідії та міцелій)[27]



Рис. 2.2.2. Гриб *Beauveria bassiana* в скануючому мікроскопі (конідії)[27]

### 2.3. Фізіолого – біохімічні ознаки *Beauveria bassiana*

Ентомопатогенний гриб *Beauveria bassiana* росте при температурі 18 - 32°C, оптимальною є температура 25-28°C. Оптимальне рН середовища становить 4,5 - 5,6. Гриб *Beauveria bassiana* – це аероб[25-26].

Гриб *Beauveria bassiana* за типом живлення є хемоорганогетеротрофом. Ставлення до джерел вуглецю: засвоює крохмаль, сахарозу, глюкозу,

лактозу, гліцерин. Ставлення до джерел азоту, як донора електронів: утилізує пептон, казеїн, рибо-кісткове борошно, м'ясний бульйон, дріжджі та їх гідролізати. Ставлення до джерела енергії: використовують хімічні сполуки.

При глибинному культивуванні штаму ТС-92 на різних складах середовищ відбувається зміна рН культуральної рідини залежно від складу середовища[21-22].

Штам гриба *Beauveria bassiana* ТС-92 отриманий шляхом селекції штаму *Beauveria bassiana* 124 / 1 на рідких і твердих поживних що містять гідролізат білково-вітамінного концентрату (БВК) і гліцерин з подальшим відбором чистих культур за продуктивністю, біологічної активності на тест-комах і терморезистентності[23-24].

Досліджено терморезистентність штамів *Beauveria bassiana* ТС-92 і вихідного штаму *Beauveria bassiana* 124 / 1 при температурі 80°C протягом 1-2 хв. Отримали такі такі результати, що запропонований штам є стійкішим на 20%. Біологічна ефективність штаму ТС-92 на личинках оранжерейної білокрилки і павутинного кліща, при обприскуванні рослин суспензією з титром 107 спор / мл, складає 65 і 55% на 5-у добу, а у відомого відповідно 55 і 40% .

Приклад використання штаму ТС-92 для отримання ентомопатогенних препарату.

У рідке сприятливе середовище, що містить 1% крохмалю, 3% гліцерину і 7% гідролізату БВК, вносять 5% посівної спорової культури штаму ТС-92 і культивують при температурі 25°C і аерації в ферментері об'ємом 50 л протягом 57 год. Отриману культуральну рідину концентрують в 10 разів. У концентрат вводять змочувач і стабілізатор суспензії і отримують препарат в рідкому вигляді. Біологічна ефективність отриманого препарату проти трипса огірка, при робочій концентрації 1%, становить 90%.

Таким чином, запропонований штам перевершує батьківський штам по продуктивності і біологічної ефективності[25-26].

## 2.4 Розмноження грибу

Гриб *Beauveria bassiana* розмножується шляхом проникнення спори в порожнину тіла через шкірні покриви (кутикулу). Потрапивши в тіло, спора проростає в гіф, потім розростається міцелій, від якого відходять конідії. Виявившись у тілі, конідії циркулюють у гемолімфі. Уже на цій стадії можливе ураження комахи внаслідок виділення деякими штамми значної кількості токсинів. Під час відсутності токсину міцелій поступово заповнює все тіло комахи, насамперед вражається м'язова тканина. Ріст гриба триває доти, поки всі тканини не будуть зруйновані. Можуть утворюватися конідієносці, що проривають кутикулу й обплітають мертву личинку. Уражена комаха покривається білим ватяним нальотом[42].

## **2.5 Схема біотрансформації ростового субстрату в біомасу грибу**

### ***Beauveria bassiana***

Процес біосинтезу Боверину можна поділити на такі етапи: 1) синтез амінокислот – попередників білків; 2) синтез пуринів і піримідинів – попередників нуклеїнових кислот; 3) синтез жирних кислот – попередників ліпідів; 4) синтез нуклеозиддифосфатпохідних вуглеводів.

Ростовим субстратом, для одержання біомаси грибу *Beauveria bassiana*, є крохмаль, який за допомогою гідролізу перетворюється на глюкозу, а далі перетворення йде за гліколітичним шляхом. Ключовими ферментами катаболізму даного ростового субстрату є 1-фосфофруктокіназа та 6-фосфофруктокіназа[29].

#### **2.5.1 Синтез амінокислот**

Даний мікроорганізм *Beauveria bassiana* має здатність синтезувати всі 20 амінокислот, з яких складаються білки. Вуглецеві скелети амінокислот будуються з проміжних продуктів обміну, аміногрупи вводяться прямим амінуванням або трансамінуванням. Переведення неорганічного азоту в органічні сполуки завжди відбувається через аміак. Нітрати, нітроти, молекулярний азот (джерела азоту в поживних середовищах) попередньо відновлюються до аміаку (асиміляційна нітратредукція) і тільки після цього включаються до складу органічних сполук[30].

Лише небагато амінокислот утворюються в результаті прямого амінування вільними іонами амонію. У первинній асиміляції аміаку беруть участь *L*-глутаматдегідрогеназа та *L*-аланіндегідрогеназа, які здійснюють відновлювальне амінування 2-оксокислот (пірувату та 2-оксоглутарату). АТФ у цьому процесі участі не бере. Утворення глутаміну з глутамату каталізується *глутамінсинтетазою* і потребує витрат АТФ. За допомогою *глутаматсинтази* аміногрупа глутаміну може бути перенесена на 2-оксоглутарат з утворенням глутамату[31].

Решта амінокислот отримує свою аміногрупу від первинних амінокислот в результаті трансамінування. З вільних амінокислот у цитоплазмі кількісно переважає глутамінова кислота.

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників.

Як видно з наведених даних, субстратами для синтезу амінокислот є кілька сполук - піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат і 5-фосфорибозил-пірофосфат. Оксалоацетат являє собою відправну точку для синтезу п'яти амінокислот, 2-оксоглутарат є попередником синтезу п'яти, а піруват - трьох амінокислот.

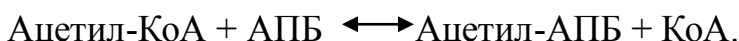
Аланін та аспарат синтезуються з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Аспарагін утворюється в реакції, аналогічній реакції, що каталізується *глутамінсинтетазою*. Відновлення аспарату дає напівальдегід аспарагінової кислоти - попередник лізину, треоніну та метіоніну. Серин, гліцин і цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, а пролін та аргінін - з глутамату[31].

### **2.5.2 Синтез жирних кислот**

Більшість жирних кислот, які входять до складу бактеріальних ліпідів, містять 16 або 18 атомів вуглецю. Ці кислоти є або насиченими, або мають один чи більше подвійних зв'язків. Попередником жирних кислот є ацетил-КоА. Проте подовження ланцюга у даному разі не відбувається за рахунок

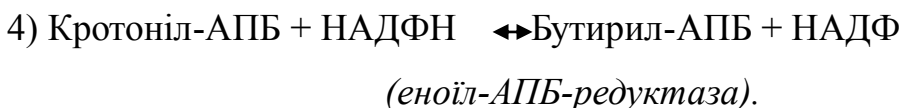
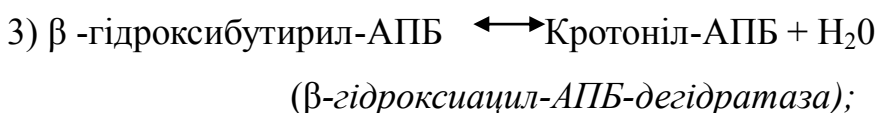
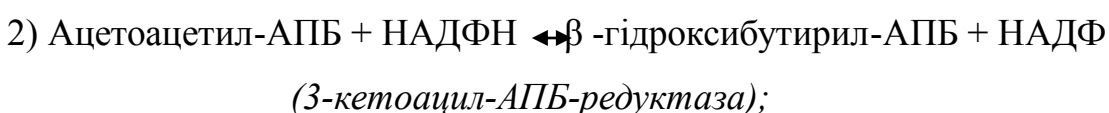
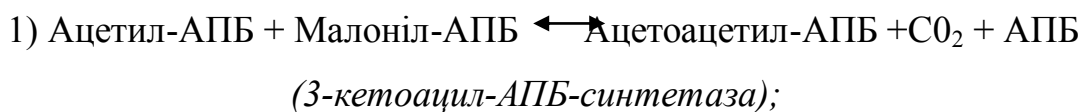
конденсації двох молекул ацетил-КоА з наступною подальшою конденсацією утвореної C<sub>4</sub>-сполуки з ацетил-КоА. У біосинтезі жирних кислот є дві принципові відмінності:

1. КоА-похідні не є субстратами ферментів, що беруть участь у синтезі жирних кислот. Замість них використовується *ацилпереносний білок (АЛБ)*, який містить як простетичну групу 4-фосфопантетеїн, тобто є схожим на кофермент А. Перша реакція у синтезі жирних кислот - це утворення ацетил-АЛБ:



2. Ацетил-АЛБ функціонує у синтезі жирних кислот як затравка, а C<sub>2</sub>-фрагменти приєднуються до цієї затравки у формі малоніл-КоА. Малоніл-КоА синтезується з ацетил-КоА у два етапи.

Для подовження ацил-АЛБ на два атоми вуглецю необхідно чотири ферменти. Спочатку ацетил-АЛБ реагує з малоніл-АЛБ з утворенням ацетоацетил-АЛБ, який потім відновлюється до β-гідроксибутирил-АЛБ. Відщеплення води дає кротоніл-АЛБ, а наступне відновлення приводить до утворення бутирил-АЛБ:



Точкою розгалуження синтезу насичених і ненасичених жирних кислот є β-гідроксидеканоїл-АЛБ.

Основними субстратами для утворення фосфатидних кислот є 3-фосфогліцерин та ацил-АЛБ. 3-Фосфогліцерин утворюється з діоксиацетонфосфату - проміжного продукту гліколізу. Фосфатидні кислоти

утворюються в результаті перенесення ацильного залишку від ацил-АПБ на 3-фосфогліцерин. Більша частина фосфатидних кислот (через стадію утворення складних ефірів із спиртами) використовується для синтезу фосфоліпідів[31].

Попередниками піримідинових нуклеотидів є карбамоїлфосфат та аспартат. Конденсація цих сполук дає карбамоїласпартат, який піддається циклізації і перетворюється на 4,5-дигідрооротат. Дегідрування цієї сполуки приводить до утворення оротату - першого проміжного продукту, який містить піримідинове кільце. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується перетворенням у 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбоксилюється в уридинмонофосфат .

У результаті метаболічного шляху, який починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, надходять із бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Декілька додаткових реакцій приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і нарешті утворюються АТФ та ГТФ. Відновлення рибонуклеотидів до дезоксирибонуклеотидів відбувається на рівні дифосфатів.

Відновлювальним агентом у цій реакції є флавопротеїдтіоредоксин, його відновлена форма регенерується за рахунок НАДФН[31].

### **2.5.3 Утворення та синтез вуглеводів**

Вуглеводи у даному біосинтезі утворюються з клітинної стінки граба *Beauveria bassiana*. Якщо субстратом служить крохмаль, який гідролізує з утворенням глюкози, то продуктами катаболізму глюкози є глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, у пентозофосфатному циклі утворюються рибулозо-5-фосфат, ксилулозо-5-фосфат, рибозо-5 - фосфат. У разі неуглеводних субстратів такі вуглеводи, як глюкозо-6-фосфат,

фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, синтезуються в реакціях глікогеногенезу. Взаємоперетворення моносахаридів відбувається через нуклеозиддифосфатсахариди (наприклад, через УДФ-похідні).

Попередником ліпополісахариду клітинної стінки є *гексозаміни*, що утворюються з фруктозо-6-фосфату. Фруктозо-6-фосфат перетворюється на глюкозамін-6-фосфат за рахунок глутаміну як донора аміногрупи:



Із глюкозамін-6-фосфату утворюються інші гексозаміни. УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-ацетилглюкозамін-попередники пептидоглікану - також синтезуються з глюкозамін-6-фосфату (див. схему). Спочатку фосфатна група переноситься з положення 6 у положення 1 з утворенням глюкозамін-1-фосфату. Наступна реакція з ацетил-КоА дає N-ацетилглюкозамін-1-фосфат, який зв'язується з УДФ. На останньому етапі УДФ-N-ацетилглюкозамін реагує з фосфоенолпіруватом, утворюючи УДФ-N-ацетилмурамову кислоту.

Будівельним блоком пептидоглікану є УДФ-N-ацетилмураміл пентапептид. Пентапептид синтезується з УДФ-N-ацетилмурамової кислоти в результаті послідовних реакцій з L-аланіном + АТФ, D-глутаматом + АТФ, мезо-діамінопімелатом + АТФ та D-аланіл-D-аланіном + АТФ [31].

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1 Потреба у мікробіологічному препараті «Боверин»

Боверин - мікробіологічний препарат інсектицидної дії на основі Ентомопатогенні гриба - гіфоміцета *Beauveria bassiana*.

Рекомендується для захисту сільськогосподарських і квітково-декоративних культур закритого ґрунту від трипсів, оранжерейної білокрилки, личинок грибних комариків, мінируючих мух, плодожерок, личинок капустяної совки, словом - м'якотілих шкідників. Також ефективний проти ґрунтових шкідників - личинки хруща, дротяники, капустянки (капустянки). Боротьба проти трипсів особливо ефективна в поєднанні з амблісейуса [1].

**Механізм дії.** Конідіоспори гриба, потрапивши на тіло комахи, проростають і проникають в порожнину тіла, розчиняючи ферментами кутикулу, при цьому виділяють токсини, викликаючи загибель шкідників. Грибниця пронизує все тіло комахи, утворюючи на його поверхні шар конідіеносців з конідіями. Господар гине, а конідії переносяться на інших шкідників [2].



Рис. 1.1.1. Боверин [3]

**Застосування. Обприскування рослин. Перед використанням**

					НУХТ БТЕК 05.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Онiстратенко			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					20	7
Реценз.						22		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

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

Використовується на сільськогосподарських культурах, в теплицях, на присадибних ділянках в період вегетації від сходів рослин (при появі шкідника) до цвітіння і збору врожаю. Норма використання в залежності від чисельності шкідників становить від 5 л на гектар, на присадибних ділянках 500 мл на 10 л на 2 сотки [4].

**Норми використання.** У період вегетації на 1 гектар використовується не менше 300 літрів робочого розчину, обробляти після 18-ї години. Повторні обробітку через 7-10 днів.

**Переваги використання:**

- ✓ Безпечний для людей, тварин, птахів, риб, бджіл
- ✓ Чи не забруднює навколишнє середовище
- ✓ Не має регламентів застосування
- ✓ Чи не впливає на смак вирощуваної продукції
- ✓ Позитивно впливає на якісні показники продукції
- ✓ Спектр дії, норми і способи використання [5]

Препарат Боверин – це сертифікований Органік-Стандарт. Згідно Стандарту з виробництва допоміжних речовин, які можуть використовуватися в органічному сільському господарстві та переробці (з урахуванням вимог Стандарту, еквівалентного Постановами ЄС 834/2007 і 889/2008).

Таблиця 3.1.1

**Спосіб обробки та дозування препарату**

Культура	Шкідники	Норма витрати, л / га	Норма робочого розчину, л
Зернові: пшениця, ячмінь	злакова попелиця, пшеничний трипс	4-6	200-300
Зернобобові: горох	горохова зернівка (брухус)	5-6	200-300

Картопля	колорадський жук (личинки I - II віку)	3-4	200-500
Овочеві (закритий ґрунт)	белокрилка, трипси	6-9	400-800
Плодово-ягідні	плодожерка, попелиці	5-7	800-1000
Для досягнення максимального ефекту препарат Боверін® рекомендується застосовувати в поєднанні з інсекто-акарицидом Колорадоцид®, при цьому норми внесення препаратів на 1 га можна зменшити в 1,5 - 2 рази			

**Механізм дії.** *Beauveria bassiana* проникає в тіло комах, як безпосередньо через кутикулу, так і через травний тракт. Проростання конідій гриба в порожнину тіла комах-шкідника відбувається дуже швидко і супроводжується виділенням токсинів, в результаті чого шкідник гине. Зараження комах грибним патогеном відбувається на різних стадіях розвитку шкідника. Загиблі комах стають джерелом інфекцій для інших комах шкідників.

**Приготування робочого розчину.** Перед додаванням в робочий розчин препарат рекомендується збовтати. Зберігання робочого розчину понад 6 годин не допускається.

Особливості використання:

- Обов'язково застосовувати кількість робочого розчину, яке забезпечить якісне і рясне змочування поверхні рослин;
- рН робочого розчину в межах 5,5 - 7,0;
- Застосовувати в ранкові та вечірні години або при хмарності в безвітряну суху погоду;
- температурний режим від +12 до + 30 ° С.

**Заходи безпеки.** При застосуванні необхідно дотримуватися загальноприйнятих заходів безпеки.

**Умови зберігання.** Препарат зберігають в герметичній тарі в сухому темному місці при температурі + 4°С .. + 6°С. Термін зберігання до 3-х місяців з дати виготовлення.

Додаткова інформація: ТУ У 24.2-00717867-004 діє до: 2013.

Для вирощування *Beauveria bassiana* традиційно використовують пептон, дріжджі кормові, крохмаль, пивне сусло. З метою здешевлення виробництва препарату було підібрано поживне середовище, до складу якого входять: кормові дріжджі, крохмаль, хлорид натрію, хлорид марганцю, хлорид кальцію, кукурудзяний екстракт,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , де джерелом вуглецю є крохмаль [6].

Препарат захисту рослин можна отримати в рідкому вигляді, а також у вигляді гранул.

#### *Отримання препарату в рідкому вигляді*

Отриману культуральну рідину концентрують фільтрацією, отримуючи суспензію, що містить міцелій, залишки поживного середовища та бластоспори. У пасту вводять гліцерин і змочений поліетиленоксид, перемішують і охолоджують. Отримують ентомопатогенний препарат Боверин, що представляє собою стійку суспензію і має таку характеристику: біологічна ефективність в робочій концентрації 90% на трипса і личинки оранжерейної білокрилки. Орієнтований термін зберігання до трьох місяців при температурі 10°C [5].

#### *Отримання препарату в сухому вигляді*

Для отримання сухого препарату в пасту вносять суміш цеоліту типу NaX і монтморилоніту в кількості 20%. Витримують при перемішуванні для перерозподілу вологи і пропускають через гранулятор. Гранули висушують, фасують і маркують. Отримують Боверин у вигляді гранул від світло-сірого до темно-коричневого кольору, які в процесі зберігання і транспортування вони не злежуються. Біологічна ефективність на трипса в робочій концентрації 90% на трипса і личинки оранжевої білокрилки [5].

### **3.2 Розрахунок потужності виробництва**




Розрахунок виробничої потужності – важлива частина обґрунтування плану виробництва (надання послуг, виконання робіт). На його основі плануються обсяги випуску продукції, складаються баланси потужностей,

визначаються обсяги вкладень.

Наведемо існуючих українських виробників препарату Боверину (таблиця 3.2.1).

Таблиця 3.2.1

**Аналіз виробників препарату Боверину в Україні**

Назва препарату	Виробник	Об'єм	Витрати	Препаративна форма:	Фото продукції
Боверин	ТМ «Agro-Market», Україна	200 г	на 3-5 соток	гранули.	
Боверин-М	ТОВ «Біо Центр», Україна	5 л	на 0,5 г	культуральна рідина	
Боверин	Національна академія аграрних наук України, спільне виробництво ІТІ «Біотехніка» і ТОВ «Центр Біотехніка».	250 мл	4 сотки	рідина	
Боверин	«Зелена Аптека Садівника»	200 г	1 сотку	гранули	

На території України в 2020 році було засіяно 6315,0 тис.га землі пшеницею. Для розрахунку техніко економічного обґрунтування візьмемо 0,2 % від загальної площі землі  $F_1 = 10\ 342$  га.

Площа для обробки –  $F_1 = 10\ 342$  га. Кількість обробок – 2.

Оброблена площа –  $F_{об} = 20\ 682$  га. Норми препарату –  $n_{пр} = 5$  л/га.

Загальна кількість препарату на обробку

$$V_{гп} = F_{об} * n_{пр} = 20\ 682 * 5 = 103418 \text{ л} = 103,418 \text{ м}^3$$

Слід врахувати, що термін зберігання рідкого препарату до 3 місяців або 90 днів. Отже, кількість робочих днів має бути менша за термін зберігання. Слід прийняти 80 днів.

$$N_{эф} = 80 \times 24 = 1920 \text{ год}$$

Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{др} = 120 + 7 = 127 \text{ (год)}$$

$n_{ц} = N_{эф} / T_{цф} = 1920 / 127 = 15,1$  Приймаємо 16 циклів.

1.1. Об'єм препарату, який треба одержати за цикл:

$$V_{пр}^{ц} = V_{гп} / n_{ц} = 103,418 / 16 = 6,5 \text{ м}^3$$

1.2. Об'єм КР, який треба одержати за цикл:

$$V_{кр}^{ц} = K_1 \cdot V_{пр}^{ц} / (1 - E_{ф}) = 1,1 \cdot 6,5 / (1 - 0,1) = 7,9 \text{ м}^3$$

Робочий об'єм ферментера  $V_{рф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 7,9 / (1 - 0,1) = 8,8 \text{ м}^3$ ,

де  $E_{ф}$  – втрати КР при біосинтезі від краплевиносу - 0,1...0,2 частки.

Можливий геометричний об'єм ферментера

$$V_{гф} = V_{рф} / K_3 = 8,8 / 0,6 = 14,6 \text{ м}^3$$

Найближчий стандартний об'єм –  $V_{стф} = 16,0 \text{ м}^3$ . Уточнюємо  $K_3$

$$K_3 = V_{рф} / V_{стф} = 8,8 / 16 = 0,55 \text{ Що допустиме } K_3 = 0,5 \dots 0,6$$

## Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу

Виробниче культивування *Beauveria bassiana* для одержання боверину здійснюють у ферментері об'ємом 16 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_{\text{роб}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 7,9 / (1 - 0,1) = 8,8 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання 8,8 м<sup>3</sup> культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб.1}} = 8,8 \times 0,1 = 0,88 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування у посівному апараті об'ємом 1,6 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,55.

Для засіву посівного апарату (одержання 880 л культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб.2}} = 880 \times 0,1 = 88 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування у посівному апараті об'ємом 160 л з коефіцієнтом заповнення 0,55.

88 л культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб.3}} = 88 \times 0,1 = 8,8 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу одержують культивуванням біологічного агента в інокуляторі об'ємом 16 л.

Для отримання 8,8 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб.4}} = 8,8 \times 0,1 = 0,88 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням у колбах на качалці.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу боверину у ферментері об'ємом 16 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,55 буде проходити у чотири етапи.

## РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

Вибір технологічної схеми направлений на вдосконалення технологічного процесу і підвищення якості продукції.

Основною метою обґрунтування є вибір оптимального технологічного, апаратурного рішення на підставі аналізу існуючої інформації.

### 4.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту

Боверин – грибний інсектицидний препарат, який отримують шляхом глибинного культивування гриба *Beauveria bassiana*, штам ТС-92. *Beauveria bassiana* - ентомопатогенний гриб сімейства *Clavicipitaceae*, широко відомий ще як збудник білої мускардини. *Beauveria bassiana* має багато штамів значні розходження, що проявляють, у вірулентності, патогенності й специфічності [16].

Відомі штами грибів виду *Beauveria bassiana* для виробництва ентомопатогенних препаратів. Найпоширенішим штамом є *Beauveria bassiana* 124/1. Основним **недоліком** відомого штаму є його невисока **ефективність і низька терморезистентність**. Для **виключення цих недоліків** було одержано штам гриба *Beauveria bassiana* ТС-92, **отриманий шляхом селекції штаму *Beauveria bassiana* 124 / 1** на рідких і твердих поживних середовищах, що містять гідролізат білково-вітамінного концентрату (БВК) і гліцерин з подальшим відбором чистих культур за продуктивністю, біологічної активності на тест-комах. Штам депонований в Центральній колекції мікроорганізмів державного концерну "Біопрепарат" (ЦКМК "Б") під N ЦКМ F-54Ц[32-33].

Досліджено терморезистентність штамів *Beauveria bassiana* ТС-92 і вихідного штаму *Beauveria bassiana* 124 / 1 при температурі 80°C протягом 1-2 хв. Отримали такі такі результати, що запропонований штам *Beauveria*

					НУХТ БТЕК 05.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Окістратенко			РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					27	6
Реценз.						29		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

*bassiana* ТС-92 є стійкішим на 20%. Біологічна ефективність штаму ТС-92 на личинках оранжерейної білокрилки і павутинного кліща, при обприскуванні рослин суспензією з титром  $10^7$  спор / мл, складає 65 і 55% на 5-у добу, а у штаму *Beauveria bassiana* 124 / 1 відповідно 40% [32-33].

Концентрація біомаси штаму *Beauveria bassiana* ТС-92 становить  $20 \times 10^9$  КУО/мл, а концентрація штаму *Beauveria bassiana* 124 / 1 нижче  $10 \times 10^7$  КУО/мл.

Отже, перевага штаму *Beauveria bassiana* ТС-92 для виробництва препарату захисту рослин Боверин полягає в тому, що **даний штам має вищу терморезистентність, є стійкішим на 20%, біологічна ефективність вища на 15-25%.**

#### **4.2. Обґрунтування вибору умов культивування**

Культивування мікроорганізму може проводитись різними способами: глибинним чи поверхневим, періодичним чи безперервним.

Гриб *Beauveria bassiana* – аероб. У рідких середовищах з великим об'ємом рідини аеробні бактерії можуть рости тільки на поверхні, оскільки з віддаленням від поверхні умови наближаються до анаеробних. Для нормального росту аеробів у глибоких шарах рідкої культури необхідна аерація. Процес вирощування даної культури проводять з аерацією і перемішуванням, тому її можна вирощувати у глибоких шарах[17].

Метод безперервного культивування полягає в тому, що в ферментер, в якому вирощується бактерія, весь час надходить свіже поживне середовище і одночасно з такою самою швидкістю відводиться культуральна рідина, яка вміщує бактеріальні клітини та продукти метаболізму. За такого культивування можна якоюсь мірою наблизитись до ідеальної ситуації, коли клітини тривалий час перебувають у фазі експоненційного росту за постійної концентрації субстрату та інших незмінних умов [18].

Гриб *Beauveria bassiana* є мезофільним мікроорганізмом, тому найкращою і оптимальною температурою культивування буде 25-28°C протягом всього процесу.

Важливим етапом процесу біосинтезу є вибір ферментера, оскільки від цього залежить продуктивність процесу. Промислові ферментери, як правило, працюють в технологічному ланцюжку з посівними ферментаційними апаратами. В останніх готується посівна культура для виробничої ферментації. Слід пам'ятати, що продуктивність ферментера залежить від безлічі факторів, а не тільки від робочого об'єму.

Для отримання високої ефективності процесу ферментації важливе значення має забезпечення стерильності. При зараженні промислової культури сторонньої мікрофлорою вихід продукту ферментації дорівнює нулю, а економічні втрати максимальні. Тому гарантованого забезпечення стерильності слід приділяти особливу увагу. Стерильність в сучасних ферментерах забезпечується цілим комплексом технічних засобів.

Серед них:

- автоматична мийка ферментер на місці;
- подвійне механічне ущільнення валу мішалки;
- системи перевірки цілісності повітряних фільтрів;
- і т.д.[23-27].

### **4.3 Наведення складу поживного середовища**

Для вирощування *Beauveria bassiana* традиційно використовують пептон, дріжджі кормові, крохмаль, пивне сусло. З метою здешевлення виробництва препарату було підібрано поживне середовище, до складу якого входять: кормові дріжджі, крохмаль, хлорид натрію, хлорид марганцю, хлорид кальцію, кукурудзяний екстракт,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , де джерелом вуглецю є крохмаль [2]. Виходячи з того, які елементи потрібні і в яких співвідношеннях, для вирощування продуценту *Beauveria bassiana* може бути використане поживне середовище такого складу:

Склад ПС г/л[32]:

Крохмаль – 2%, - 20 г/л

Дріжджі кормові – 2%, - 20 г/л

Кукурудзяний екстракт – 1% - 10 г/л

Хлорид натрію – 0,2% - 2 г/л

Хлорид марганцю – 0,01%, - 0,1 г/л

Хлорид кальцію – 0,05%, - 0,5 г/л

$K_2HPO_4$  – 0,03% - 0,3 г/л

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,04% - 0,4 г/л

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,01% - 0,1 г/л

#### *Джерело вуглецю*

Крохмаль – рослинний полісахарид з дуже складною будовою, який є джерелом вуглецю для продуценту *Beauveria bassiana*. Це двокомпонентне з'єднання, що складається з 13 – 30% амілази і 70 – 85% амілопектину. Обидва компоненти неоднорідні, їх молекулярна маса коливається в широких межах і залежить від природи крохмалю.

#### *Джерело азоту*

Для синтезу біомаси грибу *Beauveria bassiana* в якості джерела азоту використовують кукурудзяний екстракт. Кукурудзяний екстракт є джерелом органічного азоту, який засвоюється продуцентом. Таким органічним азотом є аміний азот і частково білковий.

#### *Мінеральний склад середовища*

Середовища для вирощування *Beauveria bassiana* мають велику кількість джерел фосфору, магнію, заліза, кальцію, марганцю і інших мікроелементів. Основною вимогою до компоновки поживного середовища для вирощування *Beauveria bassiana* є те, що воно повинно містити всі елементи, з яких складається клітина, причому в такій формі, в якій продуцент здатний їх засвоювати.

### **4.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту та виробничого біосинтезу**

Поживне середовище можна стерилізувати різними способами, наприклад, при витримці певної температури за деякий час, подачею гарячого стисненого повітря в сорочку апарату, опроміненням, хімічними способами,

але ці способи не завжди ефективні, тому що хімічні компоненти можуть порушити склад середовища чи іншими способами. Стерилізація проводиться в залежності від компонентів поживного середовища [15].

Основним джерелом вуглецю при біосинтезі є крохмаль. Для кращого збереження вихідних якостей поживного середовища запропоновано проводити стерилізацію крохмалю окремо від інших компонентів поживного середовища. Найбільш ефективним способом стерилізації є витримка при високій температурі в стерилізаторі [16].

До складу середовища для вирощування грибу *Beauveria bassiana* входять такі компоненти як, крохмаль, кукурудзяний екстракт, суспензія дріжджів та солі. Враховуючи всі особливості цих елементів та на основі вище сказаного, стерилізацію проводять в наступному режимі:

- **Композиція I** : Крохмаль: температура стерилізації – 112°C, тиск – 0,05 МПа (20 хв);
- **Композиція II** : Суспензія дріжджів; кукурудзяний екстракт: температура стерилізації - 112°C, тиск – 0,05 МПа (20 хв);
- **Композиція III** : Солі: температура стерилізації – 131°C, тиск 0,15 МПа (40 хв). (підкислити розчин солей перед стерилізацією хлоридною кислотою до рН 4,0-4,5).

Після стерилізації поживне середовище охолоджують, при працюючій мішалці, до температури 26 °С подачею стерильного стисненого повітря в апарат, а потім оборотної води в апарат.

Після охолодження поживного середовища, готують інокулят і посівний матеріал. Особливістю підготовки інокуляту і посівного матеріал є те, що посівну культуру вирощують у колбах на качалках до експоненційної фази росту [16].

Висновок: Обраний для виробництва інсектицидів штам *Beauveria bassiana* TC 92 в порівнянні зі своїм попередником *Beauveria bassiana* 124/1 має більшу синтезуючу здатність, терморезистентність, є стійкішим на 20%, біологічна ефективність вища на 15-25%.

Розраховано, що для виробничого культивування продуцента у ферментері об'ємом 5 м<sup>3</sup> з коефіцієнтом заповнення 0,6 процес одержання посівного матеріалу буде проходити у чотири етапи.

Для вирощування *Beauveria bassiana* TC 92 обрано поживне середовище наступного складу (г/л):

Крохмаль – 2%, - 20 г/л

Дріжджі кормові – 2%, - 20 г/л

Кукурудзяний екстракт – 1% - 10 г/л

Хлорид натрію – 0,2% - 2 г/л

Хлорид марганцю – 0,01%, - 0,1 г/л

Хлорид кальцію – 0,05%, - 0,5 г/л

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,03% - 0,3 г/л

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,04% - 0,4 г/л

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,01% - 0,1 г/л

Для приготування його необхідно розділити на такі композиції (залежно від режиму стерилізації та можливого взаємного впливу певних компонентів):

- **Композиція I** : Крохмаль: температура стерилізації – 112°C, тиск – 0,05 МПа (20 хв);
- **Композиція II** : Суспензія дріжджів; кукурудзяний екстракт: температура стерилізації - 112°C, тиск – 0,05 МПа (20 хв);
- **Композиція III** : Солі: температура стерилізації – 131°C, тиск 0,15 МПа (40 хв). (підкислити розчин солей перед стерилізацією хлоридною кислотою до рН 4,0-4,5).

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл. 5. 1

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
Д-3 Д-6 Д-8 Д-17 Д-19 Д-21 Д-23 Д-25 Д-28	Об'ємно- ваговий дозатор	9	Дозатор виробництва НВП "Техноваги" призначений для дозування сипких продуктів по вазі. Точність зважування становить 0,1% [60].
Н-2 Н-5 Н-27 Н-30	Відцентровий насос	7	Відцентровий насос фірми EBARAсерії EBARA 3M, продуктивністю до 72 м <sup>3</sup> /год [58,62]
Р-4	Реактор змішувач для спирту етлового	1	Реактор об'ємом 2,5 м <sup>3</sup> , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [61]
Р-7	Реактор змішувач для дезактину	1	Реактор об'ємом 2,5 м <sup>3</sup> , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [61]
Р-9	Реактор змішувач для гембару	1	Реактор об'ємом 2,5 м <sup>3</sup> , оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв (Україна) [61]

					НУХТ БТЕК 05.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Онiстратенко			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					33	3
Реценз.						35		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

ПЗ-10	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. [63]
Ф-11	Фільтр грубої очистки	1	Фільтруючий матеріал – хімволокно ФВР, E=90%. [55]
К-12	Компресор	1	Компресор GX7 фірми AtlasCopco (Швеція), потужність 14 л/с. [56]
Т-13	Теплообмінник охолоджувач	1	Теплообмінник охолоджувач серії АС-13,5 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія) продуктивністю 13,5 нм <sup>3</sup> /год. [57]
Р-14	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 430/16 фірми «Уралкомпресормарш» (Росія), об'єм 430 л, робочий тиск 1,8 МПа [58].
Т-15	Теплообмінник нагрівач	1	Корпус теплообмінника фірми VENTS (Україна) виготовлений із оцинкованої сталі, максимальний робочий тиск 1,6 МПа. [59]
Ф-16	Фільтр головний	1	Фільтруючий матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E=96%. [55]
Р-18 Р-20 Р-22 Р-24 Р-26 Р-29	Реактори змішувачі	6	Реактори об'ємом 16 л, 160 л., 1,6 м <sup>3</sup> , 16 м <sup>3</sup> , з сорочкою, з перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 240 об/хв. [61]
ЗП-31	Засівний пристрій	1	Виготовлений із нержавіючої сталі, розташований над інокулятором об'ємом 16 л
Ф-32 Ф-34 Ф-36 Ф-38	Індивідуальний фільтр	4	Фільтри марки WopocoActive carbon filter (Швейцарія), E=99. [55]
ІН-33	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 16 л, швидкість перемішування 240 об/хв. [27]
ІН-35	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 0,16 м <sup>3</sup> , швидкість перемішування 240 об/хв (Росія) [61]
ІН-37	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 1,6 м <sup>3</sup> ,

			швидкість перемішування 240 об/хв (Росія) [61]
ФР-39	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 16 м <sup>3</sup> , швидкість перемішування 240 об/хв (Росія) [54]

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 6.1 Опис технологічного процесу

#### *ДР 1. Санітарна підготовка виробництва*

Підготовка виробництва виконується за вимогами нормативних документів, в яких описуються правила виробництва та контроль якості препаратів захисту рослин.

#### *ДР 1.1. Підготовка персоналу*

#### *ДР 1.2. Приготування миючих дезінфікуючих засобів*

Для запобігання контамінації та дотримання чистоти на підприємстві використовують миючі засоби. Розчини готують в емальованому посуді або в бутлях з товстого темного скла. Посуд, де зберігаються розчини, обов'язково повинен бути щільно прикритим кришкою або корком. Приготування розчинів проводиться у спеціальній кімнаті, що прилягає до санвузла. Бажано, щоб це була темна або напівтемна кімната, стіни та підлога її вистелені кахлями, також є раковина для миття рук. Приготовані миючі та дезінфікуючі засоби використовують з метою для санітарної обробки (миття та дезінфекції) приміщень, технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, санітарно-технічного обладнання тощо, а також антисептичної обробки рук.

#### *ДР 1.2.1. Приготування спирту етилового*

Розчин 76% спирту етилового готують з розрахунку ,що для приготування 1 л необхідно 792 мл 96% спирту і 208 мл води очищеної потім фільтрують і розчин надходить у збірник. Приготований розчин зберігають у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці. Використовують для обробки рук.

#### *ДР 1.2.2. Підготовка дезактину*

					НУХТ БТЕК 05.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Онiстратенко			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					36	394
Реценз.						38		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

Препарат дексоцид використовують для дезінфекції та ополіскування. Для приготування дезактину необхідно розбавити концентрований препарат водою до потрібної концентрації. Для 5 % розчину беруть 40 г дезактину та 750 мл води. Зберігати готовий розчин слід не більше 7 діб.

#### *ДР 1.2.3. Підготовка Гембару*

Для приготування Гембару необхідно розбавити концентрований препарат водою до потрібної концентрації. Для 2 % розчину беруть 20 г Гембару та 380 мл води. Вода, що додається до Гембару, повинна бути нагріта до температури 50—60 °С. Зберігати готовий розчин слід не більше 5 діб.

#### *ДР 1.3. Підготовка приміщень*

Підготовку виробничих приміщень проводять у відповідності до вимог СТП 00481212-03-01-2001 “Санітарна підготовка виробничих приміщень”, ТІ №Т-45 “Інструкція по підготовці до роботи і оброблення після технологічного процесу виробничих приміщень, обладнання і інвентаря” та Методичних рекомендацій, затверджених наказом МЗ України від 14.12.01 г №502. Санітарна обробка приміщень - один з найважливіших заходів щодо забезпечення чистоти. Мета такої обробки - зведення до мінімуму механічних і мікробних забруднень. Дезінфекція поверхонь призводить, як правило, до зниження мікроорганізмів на 40-60% від вихідного змісту. Прибирання приміщень повинно проводитись 1 раз на зміну, генеральне прибирання проводиться 1 раз на тиждень.

##### *ДР 1.3.1. Щоденне прибирання*

На всіх виробничих ділянках 1 раз на зміну проводять вологе прибирання приміщень, обладнання і трубопроводів. Прибирання виробничих, підсобних та побутових приміщень проводять прибиральниці, а прибирання робочих місць – самі робітники. Щоденне прибирання здійснюється за допомогою використання таких компонентів як вода водопровідна та таких розчинів миючих засобів, як розчин хлорного вапна, етиловий спирт, дексоцид.

### *ДР 1.3.2. Генеральне прибирання*

Генеральне прибирання приміщень проводиться один раз на тиждень або за вимогою бактеріолога. Стелю, стіни, вікна, перегородки та устаткування обробляють шляхом розпилювання дезрозчину. По закінченні зрошення, зайвий дезрозчин видаляють шляхом протирання оброблених поверхонь чистою серветкою. Прибиранню підлягають стелі, підлоги, стіни, підвіконня, поверхні всього обладнання, всі виробничі меблі. Генеральне прибирання здійснюється за допомогою використання таких компонентів як вода водопровідна та таких розчинів, як розчину хлорного вапна, етиловий спирт, хлороциду і дексоцид.

### *ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання*

Виробниче обладнання не має подавати ніякої небезпеки для продукції. Обладнання, засоби обслуговування мають бути спроектовані і встановлені так, щоб робочі операції, технічне обслуговування і ремонтні роботи можна було проводити зручно та без значного затрачання часу. Стерилізацію можна проводити тільки після повної збірки обладнання. Підготовку технологічного обладнання проводять до та після проведення технологічного процесу.

#### *ДР 1.4.1. Миття, дезінфекція та ополіскування*

По закінченні процесу вимикають насос і зливають залишки води з установки. Далі можна здійснити пропарювання апарату шляхом подачі пари з тиском 0,3-0,4 МПа і відведення конденсату в каналізацію. Після підготовчих заходів необхідно провести аналіз повітря всередині апарату за допомогою газоаналізаторів.

#### *ДР 1.4.2 Технічний огляд*

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

#### *ДР 1.4.3 Перевірка на герметичність*

Ємкісне обладнання та комунікації перевіряють на герметичність шляхом створювання надлишкового тиску 0,2 МПа. Якщо упродовж 1 год тиск (за манометром) не знижується, обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,1 до 0,2 МПа.

Після перевірки запірної арматури на герметичність, подають гостру пару  $t = 125 - 130$  °С протягом 10-15 хв. Якщо після закритої запірної арматури трубопровід не змінив свою температуру, вважається що вона є герметична.

#### *ДР 1.4.4 Стерилізація обладнання*

Стерилізація проводиться гострою парою температурою 125-130°С та тиском 0,28 МПа протягом 1 год. По закінченні стерилізації зупиняють подачу гострої пари, ставлять всі вузли під паровий захист та знижують тиск. При досягненні температури 90 °С для подальшого охолодження подають в сорочку холодну оборотну воду і охолоджують до температури 40-50 °С.

#### *ДР 2. Підготовка стерильного технологічного повітря*

##### *ДР 2.1. Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті 20 м, де стабільна концентрація мікроорганізмів.

##### *ДР 2.2. Очищення повітря від пилу та механічних часточок*

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 5-10 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують масляні фільтри.

##### *ДР 2.3. Стадія компресування повітря*

Стадія компресування повітря відбувається в компресорі К-3 при температурі 200°С та тиску 0,35-0,5 мПа.

##### *ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи*

Стиснене повітря «переохолоджують» в охолоджувачі повітря до температури 25-30°С для відведення надлишкової вологи. Повітря подають

на ресивер для згладжування пульсацій і відділення зайвої вологи ( $W = 60-70$  %).

*ДР 2.5. Нагрівання повітря*

Охолоджене повітря підігрівають до  $35-40^{\circ}\text{C}$  для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів. Нагрів здійснюють у теплообміннику.

*ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі*

Попереднє очищення повітря від мікроорганізмів здійснюють в головному фільтрі. Ступінь очищення – 95 %. Заміна фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. У разі забруднення, зволоження, інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову його заміну.

*ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі*

Всі інокулятори і ферментер оснащують індивідуальним фільтром для заключної очистки повітря. Ступінь очищення досягає 99,999 % (до ТП 6.5, ТП 6.6, ТП 6.7, ТП 7).

*ДР 3. Підготовка та стерилізація поживного середовища*

*ДР 3.1. Приготування та стерилізація поживних середовищ для колб на качалках.*

*Таблиця 6.1.1*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,88 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,88 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	20	17,6	<b>Композиція I</b>	300
Дріжджі кормові	20	17,6	<b>Композиція II</b>	300
Кукурудзяний екстракт	10	8,8		
NaCl	2	1,76		
MgCl	0,1	0,1		
CaCl	0,5	0,44		

$K_2HPO_4$	0,3	0,3	<b>Композиція III</b>	227,6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4	0,4		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1	0,1		
HCl	6	5,3		

*ДР 3.1.1. Приготування та стерилізація композиції I*

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 17,6 г крохмалю наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 1000 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,5, додають 300 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 112 °С на 20 хв.

*ДР 3.1.2. Приготування та стерилізація композиції II*

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 17,6 г кормових дріжджів та 8,8 г кукурудзяного екстракту, наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 1000 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,5, додають 300 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 112 °С на 20 хв.

*ДР 3.1.3. Приготування та стерилізація композиції III*

На аналітичних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 1,76 г NaCl; 0,1 г MgCl; 0,44 г CaCl; 0,3 г  $K_2HPO_4$ ; 0,4 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 г  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 5,3 г HCl наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 1000 мл, з коефіцієнтом заповнення 0,5, додають 227,6 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С на 30 хв.

*ДР 3.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для 16 л інокулятора*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 8,8 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 8,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	20	176	<b>Композиція I</b>	2000
Дріжджі кормові	20	176	<b>Композиція II</b>	3000
Кукурудзяний екстракт	10	88		
NaCl	2	17,6	<b>Композиція III</b>	3276
MgCl	0,1	0,9		
CaCl	0,5	4,4		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	2,6		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4	3,5		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	0,9		
HCl	6	52,8		

*ДР 3.2.1. ДР Приготування та стерилізація композиції I*

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 176 г крохмалю наважку переносять в попередньо простерилізовану колбу на 5 л, з коефіцієнтом заповнення 0,5, додають 2000 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в реакторі змішувачі за температури 112 °С на 20 хв.

*ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація композиції II*

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 176 г кормових дріжджів та 88 г кукурудзяного екстракту, наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 10 л, з коефіцієнтом заповнення 0,5, додають 3000 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за

температури 112 °С на 20 хв. Через засівний пристрій засівають в інокулятор об'ємом 16 л.

*ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація композиції III*

На технічних вагах у попередньо відтарованому хімічному стаканчику зважують 17,6 г NaCl; 0,9 г MgCl<sub>2</sub>; 4,4 г CaCl<sub>2</sub>; 2,6 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,5 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,9 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 52,8 г HCl наважки переносять в попередньо простерилізовану колбу на 10 л, з коефіцієнтом заповнення 0,5, додають 3276 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С на 30 хв. Через засівний пристрій засівають в інокулятор об'ємом 16 л.

*ДР 3.3. Приготування та стерилізація поживних середовищ для 160 л інокулятора*

*Таблиця 6.1.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 88 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 88 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Крохмаль	20	1760	<i>Композиція I</i>	30000
Дріжджі кормові	20	1760		
Кукурудзяний екстракт	10	880	<i>Композиція II</i>	30000
NaCl	2	176	<i>Композиція III</i>	22760
MgCl	0,1	9		
CaCl	0,5	44		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	26		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4	35		

FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,1	9		
HCl	6	528		

*ДР 3.3.1. ДР Приготування та стерилізація композиції I*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 1760 г крохмалю. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 30 л холодної питної води.

Крохмаль поміщають в реактор змішувач об'ємом 50 л та стерилізують за температури 112 °С на 20 хв.

*ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація композиції II*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 1760 г кормових дріжджів та 880 г кукурудзяного екстракту. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 30 л холодної питної води. Кормові дріжджі та кукурудзяний екстракт поміщають в реактор змішувач об'ємом 50 л та стерилізують за температури 112 °С на 20 хв.

*ДР 3.3.3. Приготування та стерилізація композиції III*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 176 г NaCl; 9 г MgCl; 44 г CaCl; 26 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 35 г MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O; 9 г FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O; 528 г HCl. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 22,76 л холодної води. NaCl; MgCl; CaCl; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O поміщають в інокулятор об'ємом 160 л та стерилізують за температури 131 °С на 30 хв.

*ДР 3.4. Приготування та стерилізація поживних середовищ для 1600 л інокулятора*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 880 л поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 880 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20	17600	<b>Композиція I</b>	300
Дріжджі кормові	20	17600		
Кукурудзяний екстракт	10	8800	<b>Композиція II</b>	300
NaCl	2	1760		
MgCl	0,1	90	<b>Композиція III</b>	228
CaCl	0,5	440		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	260		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4	350		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	90		
HCl	6	5280		

*ДР 3.4.1. ДР Приготування та стерилізація композиції I*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 17600 г крохмалю. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 300 л холодної питної води.

Крохмаль поміщають в реактор змішувач об'ємом 500 л та стерилізують за температури 112 °С на 20 хв.

*ДР 3.4.2. Приготування та стерилізація композиції II*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 17600 г кормових дріжджів та 8800 г кукурудзяного екстракту. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 300 л холодної питної води. Кормові дріжджі та

кукурудзяний екстракт поміщають в реактор змішувач об'ємом 500 л та стерилізують за температури 112 °С на 20 хв.

*ДР 3.4.3. Приготування та стерилізація композиції III*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 1760 г NaCl; 90 г MgCl; 440 г CaCl; 260 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 350 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 90 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 5280 г HCl. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 228 л холодної води. NaCl; MgCl; CaCl; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O поміщають в інокулятор об'ємом 500 лта стерилізують за температури 131 °С на 30 хв.

*ДР 3.5. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого ферментера об'ємом 16 м<sup>3</sup>*

Таблиця 6.1.5

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 8,8 м<sup>3</sup> поживного середовища**

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 8,8 м <sup>3</sup> середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Крохмаль	20	176	<b>Композиція I</b>	3000
Дріжджі кормові	20	176	<b>Композиція II</b>	3000
Кукурудзяний екстракт	10	88		
NaCl	2	17,6	<b>Композиція III</b>	2276
MgCl	0,1	0,9		
CaCl	0,5	4,4		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	2,6		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4	3,5		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1	0,9		
HCl	6	52,8		

### *ДР 3.5.1. ДР Приготування та стерилізація композиції I*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 176 кг крохмалю. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 3000 л холодної питної води.

Крохмаль поміщають в реактор змішувач об'ємом 5000 л та стерилізують за температури 112 °С на 20 хв.

### *ДР 3.5.2. Приготування та стерилізація композиції II*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 176 кг кормових дріжджів та 88 кг кукурудзяного екстракту. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 3000 л холодної питної води. Кормові дріжджі та кукурудзяний екстракт поміщають в реактор змішувач об'ємом 5000 л та стерилізують за температури 112 °С на 20 хв.

### *ДР 3.5.3. Приготування та стерилізація композиції III*

На ваговому дозаторі попередньо зважують 17,6 кг NaCl; 0,9 кг MgCl; 4,4 кг CaCl; 2,6 кг K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,5 кг MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,9 кг FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 52,8 кг HCl. Далі поміщають в реактор змішувач та додають 1140 л холодної води. NaCl; MgCl; CaCl; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O поміщають в ферментер об'ємом 16000 л та стерилізують за температури 131 °С на 30 хв.

## *ТП 4. Підготовка інокуляту і посівного матеріалу*

### *ТП. 4.1. Ведення музейної культури*

Культура продуцента періодично пересівається і робиться перевірка на однорідність як за морфологічними, так і фізіологічними ознаками. Кожні пів року музейна культура пересівається на свіже поживне середовище та зберігається в пробірках на скошеному агаризованому середовищі.

### *ТП. 4.2. Вирощування культури в колбах на качалках*

Етапи одержання посівної культури такі: Відновлення музейної культури на агаризованому середовищі, вирощування культури на рідкому середовищі в колбах на качалці, культивування продуцента в малому, а потім, якщо треба у великому інокуляторі. Частіше засівають колби із пробірок. Колби встановлюють на качалки, що струшують рідину в колбах і сприяють розчиненню кисню в середовищі, забезпечуючи нормальні умови

життєдіяльності мікроорганізмів. Культивування відбувається при температурі 27-28°C протягом 35 год, частота обертання 220-230 об/хв.

*ТП. 4.3. Культивування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 16 л*

Засів культури продуцента в інокулятор проводять в асептичних умовах із колб. В інокуляторах постійно підтримується стабільний температурний режим в межах (28+2)°C та здійснюється постійна подача стерильного повітря. Вирощування культури гриба *Beauveria bassiana* в апараті здійснюється при постійному перемішуванні культуральної рідини мішалкою. Культивування в інокуляторі проводиться з дотриманням усіх правил асептики з частотою обертання 220-230 об/хв, рН становить 4,5-5,6 протягом 33-34 годин. При максимальній кількості активної біомаси культуру передають насосом на наступну стадію.

*ТП. 4.4. Культивування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 160 л*

Засів культури продуцента в інокулятор проводять в асептичних умовах із колб. В інокуляторах постійно підтримується стабільний температурний режим в межах (28+2)°C та здійснюється постійна подача стерильного повітря. Вирощування культури гриба *Beauveria bassiana* в апараті здійснюється при постійному перемішуванні культуральної рідини мішалкою. Культивування в інокуляторі проводиться з дотриманням усіх правил асептики з частотою обертання 220-230 об/хв, рН становить 4,5-5,6 протягом 33-34 годин. При максимальній кількості активної біомаси культуру передають насосом на наступну стадію.

*ТП. 4.5. Культивування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 1600 л*

Засів культури продуцента в інокулятор проводять в асептичних умовах із колб. В інокуляторах постійно підтримується стабільний температурний режим в межах (28+2)°C та здійснюється постійна подача стерильного повітря. Вирощування культури гриба *Beauveria bassiana* в апараті здійснюється при постійному перемішуванні культуральної рідини мішалкою. Культивування в інокуляторі проводиться з дотриманням усіх правил асептики з частотою

обертання 220-230 об/хв, рН становить 4,5-5,6 протягом 33-34 годин. При максимальній кількості активної біомаси культуру передають насосом на наступну стадію.

### ТІІ. 5. Виробничий біосинтез

Після закінчення засіву з ферментера в асептичних умовах відбирають пробу для визначення, водневого показника, масової концентрації грибу, мікробіологічного стану культури. Температуру в процесі ферментації підтримують автоматично подачею холодної води в сорочку.

Засів ферментера виконується посівним матеріалом, що вирощений в посівному апараті. Засів виконують по посівній лінії, котру перед цим ретельно перевіряють, усувають виявленні дефекти і стерилізують гострою парою протягом однієї години при тиску 0,18-0,20 МПа і температурі  $1 \pm 32^{\circ}\text{C}$ , безпосередньо перед подачею посівного матеріалу у ферментер.

Вирощування *Beauveria bassiana* в ферментерах проводять таким самим чином як і в інокуляторі та посівному апараті. Процес розвитку мікроорганізму в ферментері проходить при строгому контролі всіх стадій, дуже точному виконанні розробленого регламенту умов розвитку продуцента препарату захисту рослин. Температура становить 25-28°C, рН 4,5-5,6. Час культивування становить 60 годин.

Через кожну годину за допомогою пробовідбірної пристрою з дотриманням вимог асептики відбирають проби дріжджової культуральної рідини для біохімічного і мікробіологічного аналізу.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Для забезпечення відповідності готової продукції вимогам НТД на підприємстві забезпечується (моніторинговий - постійний постадійний) контроль процесу та контроль готової продукції.

У процесі виробництва контролюють відповідність сировини, допоміжних матеріалів, напівпродуктів вимогам НТД, контролюють санітарний стан цехів та робочих місць, виконання регламентованих технологічних операцій і виконання технологічних режимів роботи. В табл. 5.1. наведена карта постадійного контролю до технологічної схеми виробництва біомаси грибу *Beauveria bassiana*.

Таблиця 7.1

**Карта контрольних точок виробництва боверину**

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
К <sub>x</sub> 1.2.1 Підготовка робочого розчину етилового спирту	Концентрація розчину етилового спирту	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 76 %
К <sub>x</sub> 1.2.2 Приготування робочого розчину Дезактину	Концентрація розчину Дезактину	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 5 %
К <sub>x</sub> 1.2.3 Приготування робочого розчину Гембару	Концентрація розчину Гембару	Хімічний метод, термометр технічний	Після приготування розчинів	C = 2%

					НУХТ БТЕК 05.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Онiстратенко			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Карлаш Ю.В.					50	391
Реценз.						52		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

К <sub>Т</sub> , К <sub>М</sub> 1.3.1, 1.3.2 Підготовка виробничих приміщень	М/б чистота поверхонь виробничих приміщень (стіни, підлога, двері)	Змиви тампонами або метод відбитків	Після прибирання	В змивах з площею 10 x 10 см допускається ріст не більше 50 м м/о (бактерій і грибів сумарно);
К <sub>Т</sub> 1.4.1 Технологічний контроль миття обладнань та комунікацій	Обладнання та комунікації, температура	Термометр технічний, годинник	Під час проведення миття	t = 40-50 °С, τ = 20 хв
К <sub>Т</sub> 1.4.2, 1.4.3 Технологічний контроль герметичності обладнання	Обладнання та комунікації, тиск	Датчик	Після миття та ополіскування обладнання	P = 0,02 Мпа, τ = 1 год
К <sub>Т</sub> , К <sub>М</sub> 1.4.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, режим стерилізації вузлів, тиск, температура, мікробна контамінація.	Манометр, термометр м/б метод, висіви на чашки Петрі	Температура та тиск визначаються безперервно під час виробничого процесу.	P = 0,003, 0,005 Мпа, t = 125-130°С, τ = 1 год
К <sub>Т</sub> 2.2 Попереднє очищення від пилу та механічних часточок	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 80%
К <sub>Т</sub> 2.3 Компресування повітря	Повітря, температура, тиск стиснення повітря	Термометр, манометр технічний	Після компресування повітря	p = 0,35 Мпа, t = 120-250 °С
К <sub>Т</sub> 2.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Повітря, температура, вологість повітря	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, видалення зайвої вологи	t = 25-40°С, W = 60-70%

К <sub>Т</sub> 2.5 Нагрівання повітря	Повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання	t = 40-50°C
К <sub>Т</sub> 2.6 Очищення на головному фільтрі	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очищення повітря у головному фільтрі	E = 95 %
К <sub>Т</sub> 2.7 Очищення повітря в індивідуальному у фільтрі	Повітря, ступінь чистоти	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	E = 99%
К <sub>М</sub> К <sub>Т</sub> 3.1.1, Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція I, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	V=750мл, t = 112 °C, τ = 20 хв,
К <sub>М</sub> К <sub>Т</sub> 3.1.2 Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція II, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	V=750мл, t = 112 °C, τ = 20 хв,
К <sub>М</sub> К <sub>Т</sub> 3.1.3 Приготування та стерилізація поживного середовища	Композиція III, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	V=750мл, t = 131 °C, τ = 30 хв,
К <sub>М</sub> К <sub>Т</sub> , 3.2.1 Приготування та стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 20 хв,
К <sub>М</sub> К <sub>Т</sub> , 3.2.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 20 хв,
К <sub>М</sub> К <sub>Т</sub> , 3.2.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура, час, стерильність	технічні ваги	мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °C, τ = 30 хв,
К <sub>Т</sub> , К <sub>М</sub> 3.3.1	Композиція I,	Манометр	Тиск	t = 112 °C,

Приготування та стерилізація композиції I	температура, час, тиск, стерильність	технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$\tau = 20$ хв, відсутність мікробіоти
$K_T, K_M$ 3.3.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 112$ °С, $\tau = 20$ хв, відсутність мікробіоти
$K_T, K_M$ 3.3.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 131$ °С, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
$K_T, K_M$ 3.4.1 Приготування та стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 112$ °С, $\tau = 30$ хв, відс. Мікробіоти
$K_T, K_M$ 3.4.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 112$ °С, $\tau = 20$ хв, відс. Мікробіоти
$K_T, K_M$ 3.4.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	$t = 131$ °С, $\tau = 30$ хв, відс. Мікробіоти
$K_M, K_T$ 3.5.1 Приготування та стерилізація композиції I	Композиція I, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний, годинник, м/б контроль	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після	$t = 112$ °С, $\tau = 20$ хв, відсутність мікробіоти

		об'ємний дозатор	стерилізації	
К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> 3.5.2 Приготування та стерилізація композиції II	Композиція II, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний,, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 20 хв, відс. Мікробіоти
К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> 3.5.3 Приготування та стерилізація композиції III	Композиція III, температура, час, тиск, стерильність	Манометр технічний,, м/б контроль об'ємний дозатор	Тиск визначається під час стерилізації, м/б контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 30 хв, відс. Мікробіоти
К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> 4.1. Підтримання колекційної культури	Температура, час, асептичність	Термометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура, час та зовнішній вигляд визначається безперервно під час підтримання культури	t = 3-4 °С, τ = 3-4 місяці., відсутність сторонньої мікробіоти
К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> 4.2 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	t = 27-28 °С, τ = 35 год, w=220 об/хв. Відсутність сторонньої мікробіоти
К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> 4.3 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 16 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в інокуляторі і в кінці процесу	t = 25-28 °С, τ = 35 год, w=220 об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
К <sub>т</sub> , К <sub>м</sub> 4.4	Посівний	Термометр	Під час	t = 25-28 °С,

Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 160 л.	матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу	$\tau = 35$ год, $w=220$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі 1600 л.	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, манометр, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування культури в посівному апараті і в кінці процесу	$t = 25-28$ °С, $\tau = 35$ год, $w=220$ об/хв. Відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 5 Виробниче культивування	Посівний матеріал, тривалість культивування швидкість перемішування, вміст лізину, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, рН метр, колориметричний метод	Під час вирощування культури у ферментері. Відбір проби культуральної рідини відбувається кожні 8 год	$t = 25-28$ °С, $\tau = 60$ год, $w=240$ об/хв., відсутність сторонньої мікробіоти титр Боверину

Для забезпечення відповідності препарату для захисту рослин Боверин вимогам нормативно-технічної документації на підприємстві забезпечують контроль процесу та самої готової продукції. Контролюють відповідність сировини, допоміжних матеріалів вимогам відповідних документів, також контролюють санітарний стан цехів та робочих мість, виконання регламентованих технологічних операцій і виконання технологічних режимів роботи.

Контроль виробництва проводять різними способами, в залежності від об'єкту. Наприклад, контроль підготовки виробництва проводять аспіраційним методом, оскільки проводять мікробіологічну чистоту повітря; приготування поживного середовища контролюють ваговим способом, тому що зважують всі компоненти середовища тощо [28].

### ***Визначення концентрації біомаси***

#### *Прямий метод( Метод Коха):*

В ряду послідовних десятикратних розведень досліджуваного зразка з 2 останніх розведень (ступінь розведення залежить від кількості КУО в 1 мл досліджуваного препарату). Роблять кілька послідовних десятикратних розведень культуральної рідини, орієнтовно 7-8 штук. Далі по 0,1 мл мікробної суспензії висівають на чашки Петрі з поживним середовищем ( МПА або Гаузе-2). Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища шпателем Дрігальського або за допомогою скляних бус до повного вбирання (висихання) суспензії. Чашки закривають і поміщають перевернутими догори дном в термостат для інкубації. Посіви інкубують при температурі  $(37 \pm 1) ^\circ \text{C}$  протягом 12- 24 год. Метод придатний для визначення лише живих клітин, та досить тривалий у часі.

Після інкувації підраховують кількість колоній, що вирости після неї та множать на розведення культуральної рідини і множать на їх кількість. Після число перемножують на 1 мл суспензії і отримують кінцеве значення [31].

#### *Непрямий метод :*

Концентрацію біомаси, а точніше концентрацію КУО в 1 мл культуральної рідини визначають за допомогою фотоелектроколориметра( ФЕК), а саме за різницею оптичної густини  $D$  клітинної суспензії та еталонного зразка і переводять відповідне значення оптичної густини за допомогою калібрувального графіка у КУО (концентрацію клітин утворюючих одиниць ) виражену у КУО/мл.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на кількість КУО за допомогою калібрувального графіка відносно еталонного зразка.

Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1мл культуральної рідини. Суміш збовтуємо і вимірюємо оптичну густину на фотоелектроколориметрі (при довжині хвилі 540 нм) [31].

### ***Визначення масової частки сухих речовин***

Метод ґрунтується на вимірюванні показників заломлення крохмалю за допомогою рефрактометра. Масову частку сухих речовин у крохмалі визначають у розчинах крохмалю, розведених дистильованою водою у співвідношенні 1:1. Масову частку сухих речовин Р у відсотках визначають за формулою:

$$P = 2P_1$$

де 2 – коефіцієнт;

$P_1$  – показання шкали рефрактометра [43-44].

### ***Метод визначення редукуючих речовин***

1. Йодометричний метод визначення редукуючих речовин із застосуванням реактиву Мюллера. Метод ґрунтується на відновленні іонів міді ( $Cu^{2+}$ ) з лужного розчину Мюллера до геміоксиду міді ( $Cu_2O$ ) редукуючими речовинами за умови додання надлишкової кількості розчину йоду та титрування надлишку його розчином тіосульфату натрію[45-46].

2. Йодометричний метод визначення редукуючих речовин із застосуванням розчину Оффнера. Метод ґрунтується на відновленні іонів міді ( $Cu^{2+}$ ) до геміоксиду міді ( $Cu_2O$ ) в лужному розчині Оффнера редукуючими речовинами під час нагрівання, переході осаду в розчин надлишкової кількості розчину йоду та титруванням надлишку йоду розчином тіосульфату натрію.

2. Визначення редукуючих речовин методом Найта і Алена (Метод ICUMSA). Метод ґрунтується на відновленні іонів міді ( $Cu^{2+}$ ) до геміоксиду міді ( $Cu_2O$ ) в лужному розчині редукуючими речовинами під час нагрівання.

Після охолодження залишкові іони міді титрують ЕДТА (етилендіамінтетраоцтовою кислотою) з використанням мурексиду як індикатору [47-48].

### ***Визначення титру Боверину в процесі культивування***

Рідкий препарат попередньо дивляться під мікроскопом для візуального визначення ступеня насичення конідіоспор при рясному спороношенні отриману суспензію розбавляють в 10 і 100 разів, для чого в мірні колби беруть піпеткою по 1 мл добре перемішаної суспензії і доводять водою до об'єму 10 і 100 мл відповідно потім вміст досліджуваної суспензії ще раз струшують, скляною паличкою по краплині наносять на два майданчики камери Горяєва, покривають покривним склом і добре притирають. Надлишки рідини видаляють фільтрувальною папером.

Камеру поміщають на предметний столик, при окулярі 10х і об'єктиві 10х знаходять середній ряд квадратів сітки, переводять об'єктив на збільшення 40х і підраховують число конідій. Підрахунок проводять в десяти великих квадратах камери, розташованих в середньому ряду сітки, пропустивши при цьому 2 перших і 2 останніх квадрата. Якщо число конідій у великому квадраті перевищує 50, для аналізу беруть суспензію з більшим розведенням, а при її відсутності розбавляють в 10 разів останній варіант розведеної суспензії [48-49].

Обчисливши середнє арифметичне числа конідій в одному великому квадраті, підставляють його в формулу для визначення титру (Т) а точніше культури:

$$T = 25 \times 10^4 \times ar,$$

де а – середньоарифметичне число конідій у великому квадраті; р – розведення (10; 100 і т. п).

### ***Визначення титру Боверину***

Виходячи з рекомендованої норми застосування сухого препарату, наприклад, 1 кг / га при розведенні 300 л робочого розчину готуємо суспензію 3,3 г.препарата в 1 л. води в колбі, ретельно перемішуємо,

фільтруємо через 2 шари марлі. Отримуємо суспензію препарату, аналогічно застосовуваної в виробничих умовах. Подальше визначення титру препарату проводимо так само. Як в попередньому випадку[48-49].

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. 1. Защита растений /С. М. Поспелов, М. В. Арсеньева, Г. С. Груздев; Под ред. Н. Г. Берима. — 2-е изд., перераб. и ДОП. — Л.: Колос. Ленингр. отд-ние, 1979. — 432 с., ил.— (Учебники и учеб. пособия для средн. с.-х. учеб. заведений).
2. Боверин БТ [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://biotekhnika.o.ua/uk/produksiia/mikrobiolohichni-preparaty/boveryn-bt>
3. Технології біопрепаратів для ветеринарії і сільського господарства [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Л.М. Буценко, А.Д. Конон. – К.: НУХТ, 2014. –106 с.
4. Сільськогосподарська біотехнологія : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» денної форми навчання / О. Ю. Сметана. – Миколаїв : МНАУ, 2017. – 132 с.
5. Виробництво біопрепаратів в Україні: мовою цифр і фактів [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://propozitsiya.com/ua/proizvodstvo-biopreparatov-v-ukraine-yazykom-cifr-i-faktov>
6. Використання біопрепаратів – перспективний напрямок вдосконалення агротехнологій/ М.О. Остапчук, канд. с.-г. наук, доцент І.С. Поліщук, канд. с.-г. наук, доцент О.В. Мазур, канд. с.-г. наук, доцент А.М. Максимов, канд. с.-г. наук, ст. викл.
7. Химическая и биологическая защита растений. Под ред. канд.с-к.наук П.А.Хижняка. -М: «Колос», 1971. - 251с.
8. Защита зеленых насаждений от вредителей и болезней в условиях городской среды: - М.: Стройиздат, 1985.-247 с.
9. Справочник агронома по защите растений. Под ред. А.Ф.Ченкина, К.П.Гриванова.М. «Россельхозиздат», .
10. Влияние биоинсектицида боверина на микробиоценоз кишечника в хроническом эксперименте// Орленкович Л.Н.//ООО «Медицина труда»

Института охраны труда и здоровья окружающей среды Рижского университета Страдыня//2017,193-198с.

11. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: Справочник.— Т. 2/Сост. Клисенко М. А., Калинина А. А., Новикова К. Ф. и др. — М.: Агропромиздат, 1992. — 416 с.
12. Борисов Б. А. Проблемы создания и использования микроинсектицидных препаратов. // Изучение энтомопатогенных микроорганизмов и разработка технологий производства и применения. Научн. раб. симп. СЭВ. Бухарест, 1990. С. 823.
13. Огарков Б. Н. Биологическое обоснование способов создания и использования грибных препаратов для борьбы с насекомыми: Автореф. дис. докт. биол. наук. Л., 1990. 44 с.
14. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. I перероб.- К.: НУХТ., 2010. – 632с.
15. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія: К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
16. Патент РФ № 2704859. Штамм гриба *Beauveria bassiana*, используемый для производства биопрепарата против колорадского жука, грибных патогенов и стимуляции роста картофеля в вегетационный период, биопрепарат на его основе и способ стимуляции роста картофеля в вегетационный период, защиты его от колорадского жука и ризоктониоза//Лемяк Александр Иванович 31.10.2019
17. Патент РФ №2034469. Штамм *Beauveria bassiana micromycet* використовується для виготовлення ентомопатогенного препарату//Анатолій Петрович Третьяков- 21.06.1993
18. Абрамова Ж.И. / Человек и противокислительные вещества // Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Л.: Наука, 1985. - 230 с.
19. Алешина О.А. Биологические особенности энтомопатогенных грибов и возможности промышленного получения боверина / Алешина О.А.,

- Кононова Э.В., Покидова Н.В. // Микробиологические средства защиты растений и бактериальные препараты. М., 1978. - С. 40 - 44.
20. Билай В.И. Фузарии. Киев. Из-во Академии Наук Украинской ССР. 1955. с. 320.
21. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др. Микроорганизмы - возбудители болезней растений. / Под ред. Билай В.И. Киев. Наукова думка, 1988. с. 552.
22. Билай В.И., Курбацкая З.А. Определитель токсинов - образующих микромицетов Киев. Наукова думка, 1990. с. 236.
23. Красноштанова А.А., Крылов И.А., Бабусенко Е.С. Основы биотехнологий. Учебное пособие. – М.: РХТУ им. Менделеева, 2001. – 84с.
24. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. Общая технология микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 264с.
25. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Белан С.Р. Справочник Пестициды и регуляторы роста растений. М.: "Химия", 1995. – 574 с.
26. Патент 1743019 Российская Федерация, А 01 N 63/00, С 12 N 1/20, 1989. Штамм бактерий *V. bassiana* (Bals.) Vuill для получения препарата против грибных возбудителей болезней злаковых культур / А.М.Мелентьев, Н.Г.Усанов, О.Н. Логинов. Заявл. 3.10.89; Опубл. 23.03.93.
27. Поиск и идентификация бактерий-антагонистов возбудителей корневых гнилей сельскохозяйственных растений: Отчет о НИР (Закл.) / Институт Биологии БНЦ УрО АН СССР; Руководитель А.И. Мелентьев. - № ГР 0189. 0916126. - Уфа, 1991. - 63 с.
28. Список пестицидов и ядохимикатов разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Справочное издание. Приложение к Журналу "Защита и карантин растений" № 3, 2001 г. 336 с.
29. Теппер Е.З., Шильшикова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по

- микробиологии. - М.: Колос, 1987. - 238 с.
30. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза авторы А.Ю. Винаров Л.С.Гордиев А.А. Кухаренко В.И Панфилов. – М.: Наука, 1987г.
31. Чулкина В.А., Коняева Н.М., Кузнецова Т.Т. Борьба с болезнями сельскохозяйственных культур в Сибири. - М.: Россельхозиздат, 1987.- 254 с.
- 32.Бондаренко Н. В. Системы защиты растений. М: Агропромиздат, 1988.
- 33.Бондаренко Н. В. Биологическая защита растений М: Агропромиздат, 1986.
- 34.ТУ У 24.2-00717867-004
35. Підгорський В. С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська, Т. П. Пирог // К.: Наук. думка, 2010. – 328 с.
36. Виестур У. Э. Биотехнология – биологические агенты, технология, аппаратура / У. Э. Виестур, И. А. Шмите, А. В. Жилевич // Рига: Зинатне, 1987. – 261 с.
- 37.Фильтр карманный грубой очистки воздуха G3-G4[Электронный ресурс] //Айс-климат. – Режим доступа:<http://air-klimat.prom.ua/p203201321-filtr-karmannyj-gruboj.html>
- 38.Алешина О.А. Биологические особенности энтомопатогенных грибов и возможности промышленного получения боверина / Алешина О.А., Кононова Э.В., Покидова Н.В. // Микробиологические средства защиты растений и бактериальные препараты. М., 1978. - С. 40 - 44.
39. Билай В.И. Фузариин. Киев. Из-во Академии Наук Украинской ССР. 1955. с. 320.
40. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др. Микроорганизмы - возбудители болезней растений. / Под ред. Билай В.И. Киев. Наукова думка, 1988. с. 552.
41. Билай В.И., Курбацкая З.А. Определитель токсинов - образующих

- микровицетов Киев. Наукова думка, 1990. с. 236.
42. Красноштанова А.А., Крылов И.А., Бабусенко Е.С. Основы биотехнологий. Учебное пособие. – М.: РХТУ им. Менделеева, 2001. – 84с.
43. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. Общая технология микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 264с.
44. Мельников Н.Н., Новожилов К.В., Белан С.Р. Справочник Пестициды и регуляторы роста растений. М.: “Химия”, 1995. – 574 с.