

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

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

«__» _____ червня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» _____ червня 2025 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності _____ 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

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

на тему: «Одержання біомаси *Mesorhizobium ciceri* для виробництва
бактерійного добрива»

Виконав: здобувач IV курсу, групи 2

_____ ВИСОЦЬКИЙ Олег Ігорович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник: _____ КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

Рецензент _____ Микита БУРИЙ
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

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

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” березня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВИСОЦЬКИЙ Олег Ігорович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання біомаси *Mesorhizobium ciceri* для виробництва бактерійного добрива»

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2025 р.

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент *Mesorhizobium ciceri* Інокулянт для нуту «Bionitro©НУТ»

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

Характеристика цільового продукту, вибір біологічного агента, морфолого-культуральний та біохімічний аналіз біологічного агента, розробка та обґрунтування технологічної схеми, специфікація обладнання, розробка апаратної схеми, розробки системи контролю виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема (формат А3), Апаратурна схема (формат А2)

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	01.03.25 - 07.03.25	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	07.03.25 - 14.03.25	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	14.03.25 - 21.03.25	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	21.03.25 - 01.04.25	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	01.04.25 - 14.04.25	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	14.04.25 - 21.04.25	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	21.04.25 - 01.05.25	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	01.05.25 - 14.05.25	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	14.05.25 - 28.05.25	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Олег ВИСОЦЬКИЙ _____
(ім'я та прізвище)

Вікторія КРАСІНЬКО _____
(ім'я та прізвище)

Реферат

Ця кваліфікаційна робота присвячена розробці технологічної та апаратурної схеми біосинтезу бактеріального добрива з використанням нового штаму бульбочкових азотфіксувальних бактерій *Mesorhizobium ciceri* ND-64. На основі широкого аналізу та порівняння закордонних та відчизнянних високоефективних штамів *M. ciceri*. Техніко-економічне обґрунтування показало, доцільність виробництва нового моноштамового інокулянту на дрібномасштабному виробництві. Технологічна схема біосинтезу добрива включає підготовчі роботи (підготовка стерильного аераційного повітря, підготовка розчину соляної кислоти для підкислення середовища під час стерилізації, підготовка розчину NaOH, для контролю рН середовища, приготування горохового бульйону та його подальша фільтрація, стерилізація композицій поживних середовищ) та основний технологічний процес (три стадії вирощування посівного матеріалу та біосинтез у ферментері об'ємом 0.3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6). Апаратурна схема включає в себе харчоварильне обладнання для заварювання сухого гороху, реактори стерилізатори для термічної стерилізації попередньо відфільтрованого горохового бульйону, інокулятор для отримання посівного матеріалу та ферментер об'ємом 300 л для виробничого культивування, як допоміжна стадія представлена системи очистки та стерилізації аераційного повітря. Технологія виробництва добрива передбачає використання одностадійної схеми культивування глибинним періодичним способом.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаних джерел та технологічної схеми (формат А3) та апаратної схеми (формат А2). Загальний обсяг роботи – 126 сторінок, 12 рисунків, 21 таблиця.

Ключові слова: бактеріальне добриво, *Mesorhizobium ciceri* ND-64, біосинтез, інокулянт, нут, ферментація, глибинне культивування.

ABSTRACT

This qualification project is dedicated to the development of a technological and equipment scheme for the biosynthesis of a bacterial fertilizer using a novel strain of nodule-forming nitrogen-fixing bacteria — *Mesorhizobium ciceri* ND-64. The strain was selected based on a comprehensive analysis and comparison of high-efficiency foreign and domestic strains of *M. ciceri*. The techno-economic justification demonstrated the feasibility of producing this new mono-strain inoculant at a small-scale production facility.

The technological scheme for fertilizer biosynthesis includes preparatory steps (sterile aeration air preparation, preparation of hydrochloric acid solution for medium acidification during sterilization, preparation of sodium hydroxide solution for pH control, preparation of pea broth and its subsequent filtration, sterilization of nutrient media compositions) and the main technological process (three-stage cultivation of the seed material and biosynthesis in a 0.3 m³ fermenter with a filling coefficient of 0.6). The equipment scheme includes food processing equipment for brewing dry peas, reactors-sterilizers for thermal sterilization of pre-filtered pea broth, an inoculator for obtaining seed material and a fermenter with a volume of 300 l for production cultivation, as an auxiliary stage, aeration air purification and sterilization systems are presented. The production technology of the fertilizer is based on a one-stage cultivation approach using a deep batch fermentation method.

The qualification thesis consists of an introduction, nine chapters, a list of references, a process flowchart (A3 format), and an equipment diagram (A2 format). The total volume of the work is 126 pages, 12 figures, and 21 tables.

Keywords: *biofertilizer, Mesorhizobium ciceri ND-64, biosynthesis, inoculant, chickpea, fermentation, submerged cultivation.*

Зміст

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1: Загальна характеристика бактеріального інокулянта для нуту на основі бульбочкових азотфіксувальних бактерій <i>Mesorhizobium ciceri</i> ND-64	10
РОЗДІЛ 2: Обґрунтування вибору біологічного агента	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	15
2.2. Розрахунок потенційної максимальної біомаси, яку можливо отримати на запропонованій суміші ростових субстратів для культивування <i>Mesorhizobium ciceri</i> ND-64	26
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Mesorhizobium ciceri</i> ND-64	29
2.2 Фізіолого-біохімічні ознаки	30
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	30
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва інокулянту для нуту на основі симбіотичних азотфіксуючих бактерій виду <i>Mesorhizobium ciceri</i>	32
3.1 Розрахунок потреби в інокулянті під нут	32
3.2 Розрахунок потужності виробництва біодобрива для нуту	35
3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера	37
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для виробництва інокулянту для нуту	38
РОЗДІЛ 4. Біосинтез біомаси азотфіксуючих симбіотичних бактерій виду <i>Mesorhizobium ciceri</i> для отримання біодобрива для вирощування нуту	42
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату <i>Mesorhizobium ciceri</i>	42
4.2 Біотрансформація глюкози у біомасу <i>Mesorhizobium ciceri</i> ND-64	45
РОЗДІЛ 5: ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>MESORHIZOBIUM CICERI</i> ND-64	52
5.1 Обґрунтування способу культивування та вибору ферментера для культивування <i>Mesorhizobium ciceri</i> ND-64	52
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	56
5.3 обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва інокулянту під нут	58
5.3.1 Методики очистки ферментаційного обладнання та реакторів для стерилізації поживного середовища.	59
5.3.2 Характеристика мийних та дезінфікуючих засобів для приміщення виробництва інокулянту під нут	63
5.3.3 Розрахунок площі приміщень та витрат мийних і дезінфікуючих засобів	68
5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.	80
5.5.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.	82
5.5.3 Приготування поживного середовища для виробничої ферментації об'ємом 300 літрів	88
5.6 Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів	91

5.6.1 Підготовка та стерилізація розчину піногасника.....	91
5.6.2 Обґрунтування та підготовка з стерилізацією 6% розчину NaOH	91
5.6.2.1 Розрахунок кількості приготування 6% розчину NaOH для культивування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л	92
5.6.2.2 Розрахунок кількості приготування 6% розчину NaOH для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 300 л	92
5.6.3 Обґрунтування Приготування 6%-го розчину HCl.....	92
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ІНОКУЛЯНТУ ПІД НУТ	94
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БІОДОБРИВА ПІД НУТ НА ОСНОВІ <i>MEZORHIZOBIUM CICERI</i> ND-64	99
РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ПРИГОТУВАННЯ ТОВАРНОЇ ФОРМИ ІНОКУЛЯНТУ ПІД НУТ НА ОСНОВІ <i>M. CICERI</i> ND-64	110
8.1 Характеристика та практика використання консервуючих та протекторних агентів для довготривалого зберігання життєздатної суспензії бактерій	110
РОЗДІЛ 9: КОНТРОЛЬ ДОПОМІЖНИХ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ТА ВИРОБНИЧОГО КУЛЬТИВУВАННЯ <i>M.CICERI</i>	116
9.1 Визначення концентрації цільового продукту (Біодобрива на основі <i>Mesorhizobium ciceri</i>) За допомогою спектрофотометрії. (Експрес метод).....	116
9.2 Контроль азотного живлення:.....	118
9.2.1 Визначення концентрації амонійного азоту методом Несслера	119
9.2.3 Визначення концентрації амінного азоту за допомогою нінгідринового реактиву ...	120
9.3 Методика визначення концентрації вуглецевого субстрату методом Лейна-Ейнона.....	121
9.4 Методика мікробіологічного контролю стерильності поживного середовища.....	123
СПИСОК ВИКОРИСТАННИХ ДЖЕРЕЛ	127
Додатки	139

ВСТУП

Вирощування бобових культур, таких як соя, квасоля, нут, горох, люцерна та інші, є одним з ключових елементів продовольчої безпеки на глобальному рівні. Це зумовлено тим, що високий вміст білка, його біологічна цінність та низька вартість роблять бобові рослини важливим засобом для подолання дефіциту білка в харчуванні людей і тварин, особливо в країнах, що розвиваються.[1] є симбіотичними азотфіксаторами, кожен вид яких має специфічну рослину-хазяїна, з якою відбувається симбіоз. Зокрема, для *Mesorhizobium ciceri* таким хазяїном є нут. Симбіоз реалізується через утворення бульбочок на коренях бобових рослин, де колонії *M. ciceri* отримують вуглеводи у вигляді маніту та забезпечують рослину значною кількістю фіксованого азоту у формі урейдів. [2]

Сьогодні використання добрив на основі азофіксуючих симбіотичних бульбочкових бактерій є розповсюдженою практикою у майже всіх регіонах світу, оскільки азотфіксуючі бактерії здатні фіксувати від 50 до 300 кілограмів азоту на гектар на рік, [1] причому ефективність азотфіксації залежить від виду рослини-хазяїна, рівня азоту в ґрунті, штаму бактерій та інших факторів. Використання азотфіксуючих мікроорганізмів є значно економічнішим та екологічно доцільнішим порівняно з використанням азотовмісних мінеральних чи органічних добрив. Тому пошук нових високопродуктивних штамів *Mesorhizobium ciceri* та розробка на їх основі біологічних добрив є перспективним і економічно вигідним напрямком досліджень.

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум	Підпис	Дата				
Розроб.	Висоцький О.І.				ВСТУП	Літ.	Лист	Листів
Перевір.	Красінько В.О.						1	2 8
Реценз.						НУХТ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стадніков В.П.							

Новітність кваліфікаційної роботи полягає у використанні новітнього високоефективного штаму *Mesorhizobium ciceri* ND-64, як біологічного агента добрива, який здатен утворювати стабільний та ефективний симбіоз зі всіма основними виробничими видами нуту в Україні, підвищуючи середній урожай від 35% до 45%. А також у дешевому напівнатуральному середовищі його культивування, а саме гороховому бульйоні у розчиненому в ньому наважками солей задля більш швидкого подолання лаг-фази продуцентом.

Основна проблематика виробництва біодобрив на основі азотфіксуючих симбіотичних бульбочкових бактерій полягає у селекції нових виробничих штамів, оскільки розбіжність між ефективністю симбіозу між штамми є досить велика, а в деяких випадках штами *M. ciceri* і зовсім не здатні створювати симбіоз з певними сортами нуту. Тому активна селекція нових штамів, які б охоплювали найбільш широкий спектр різновидів нуту є однією з ключових задач у цій сфері. Наразі здійснюються спроби генетичної модифікації певних штамів *M. ciceri* задля більшої спорідненості білків нодуляції та поверхневих білків нуту,[3] а також бактеріальних екзополісахаридів, які і відповідають за здатність до симбіозу та здатність до конкуренції між різними штамми. Але нараз ці дослідження знаходяться на початкових стадіях, тому методики селекції та виділення штамів з полів, де роками культивувався нут, залишаються найефективнішими методиками відкриття нових виробничих штамів. *M. ciceri* ND-64 був відкритий та досліджений саме з місць постійної культивації нуту в Україні.

Середовище для культивування також є одним з переваг даного штаму, оскільки гороховий бульйон, який є основою поживного середовища є досить багатим на поживні речовини, зокрема азотовмісні, проте його вартість нижча ніж в меляси, чи гідролізованих органічних субстратах. А деяка кількість мінеральних солей та сахарози забезпечують швидкий розвиток культури у період лаг-фази, оскільки гороховий бульйон є негідралізованим і бактерія доводиться синтезувати власні ферменти для засвоєння всіх речовин.

РОЗДІЛ 1: Загальна характеристика бактеріального інокулянта для нуту на основі бульбочкових азотфіксувальних бактерій *Mesorhizobium ciceri* ND-64

1) Цільовим продуктом є бактеріальне добриво на основі бульбочкових азотфіксувальних бактерій *Mesorhizobium ciceri* штаму ND 64 [4]

2) Бактерії роду *Mesorhizobium* належать до α -протеобактерій і є ключовими азотфіксувальними симбіонтами для нуту (*Cicer arietinum* L.). Вони здатні інфікувати кореневі волоски рослини, утворюючи клубеньки, де відбувається процес біологічної фіксації атмосферного азоту (N_2) за допомогою ферменту нітрогенази [5] Цей азот перетворюється на аміак (NH_3), який використовується рослиною для синтезу амінокислот і білків. Ефективність симбіозу залежить від специфічності штамів *Mesorhizobium*. Наприклад, *Mesorhizobium ciceri* та *M. mediterraneum* є найбільш адаптованими до нуту, забезпечуючи підвищення врожайності до 80% в залежності від умов.[6]

Переваги інокуляції для нуту

Зменшення залежності від мінеральних добрив – дозволяє економити кошти та знижує забруднення ґрунтів нітратами [7].

Покращення якості ґрунту – бактерії сприяють накопиченню органічної речовини та підвищують його мікробну активність.

Стійкість до стресу – деякі штами *Mesorhizobium* здатні виробляти фітогормони (наприклад, ауксини), що підвищує стійкість рослин до посухи [8].

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум	Підпис	Дата					
Розроб.		Висоцький О.І.			РОЗДІЛ 1: Загальна характеристика бактеріального інокулянта для нуту на основі бульбочкових азотфіксувальних бактерій <i>M.ciceri</i> ND-64	Лім.	Лист	Листів	
Перевір.		Красінько В.О.					1	10 10	
Реценз.						НУХТ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стадніков В.П.							

Характеристика кінцевого продукту

Органолептичні показники: Рідина жовтого кольору з вираженим ароматом гороху. [9]

Тара: Біла полікарбонатна ємність білого кольору, об'ємом 2 літри. Захищає від прямої дії сонячних променів. [10]

Норми використання: 2 літри рекомендовано використовувати не більше ніж на 2 тони насіння. Перед використанням розчин розводять у розрахунку 4,5 літри робочого розчину на тонну насіння, тобто 2 літри розчину доводять до 9 літрів перед використанням. Насіння оброблюється шляхом передпосівної інокуляції. [10]

Терміни та умови зберігання: Препарат зберігати за t° від $+2^{\circ}\text{C}$ до $+6^{\circ}\text{C}$ в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці. Після інокуляції треба провести посів не пізніше ніж за 15 діб.

Склад: Бульбочкові азотфіксувальні бактерії виду *Mesorhizobium ciceri* штаму ND-64 в титрі не менше $2 \cdot 10^9$ КУО на мл. Виробниками зазначено що також в продукті містяться продукти метаболізму бактерій, а саме амінокислоти, фітогормони (ауксини), вітаміни та ферменти що прискорюють зараження насіння нутом бактеріями. [10]

Сфера застосування в Україні: Біоінокулянт та вид бактерій *Mesorhizobium ciceri* загалом, використовується у сільському господарстві, у вигляді передпосівного інокулянту для вирощування рослин виду *Cicer arietinum* (нут звичайний). Активне використання BiNitro Нут ENZIM Agro та його аналогів зумовлене тим, що останніми десятиліттями на хвилі популяризації органічного землеробства широкої популярності набули біодобрива на основі



Рис. 1.1 Комерційне фото препарату BiNitro Нут ENZIM Agro [10]

мікроорганізмів, які здатні здійснювати позитивний вплив на ріст, розвиток та врожайність різних культур рослин. Наразі в Україні широко представлені різні препарати на основі живих клітин або ферментів мікроорганізмів, що мають імуномодельюючу, інсектицидну, фунгіцидну, гербіцидну активність або є симбіотичними мікроорганізмами, які здатні виконувати широкий спектр функцій допомагаючи нормальному розвитку сільськогосподарських культур.

Досвід використання інокулянтів для вирощування нуту

У технології вирощування нуту часто використовується бактеріальний інокулянт, що містить бактерії виду *Mesorhizobium ciceri*, що вступають в симбіоз з рослинами нуту (*Cicer arietinum*), в процесі якого формуються бульбочки на корінні рослини (рис. 1.2), в яких активно відбувається фіксація атмосферного азоту. Загалом *M. ciceri* у симбіозі з нутом здатна зафіксувати з атмосфери до 176 кг азоту на гектар на рік. [11], [12]

Висока активність нітрогеназного комплексу *M. ciceri* потенційно здатна забезпечити рослину сполуками азоту на 85%, [12] що потенційно достатньо задля повноцінного розвитку та отримання високо урожаю на оптимальних за вмістом азоту ґрунтах.

Загалом дані, отримані з проаналізованих досліджень, підтверджують, що вдалий підбір штаму *M. ciceri*, підвищує врожайність

на збагачених азотом ґрунтах (більше 50 кг азоту на гектар) на 5-25% (рис. 1.3), а на бідних азотом ґрунтах (менше 20 кг азоту на гектар) підвищує врожайність

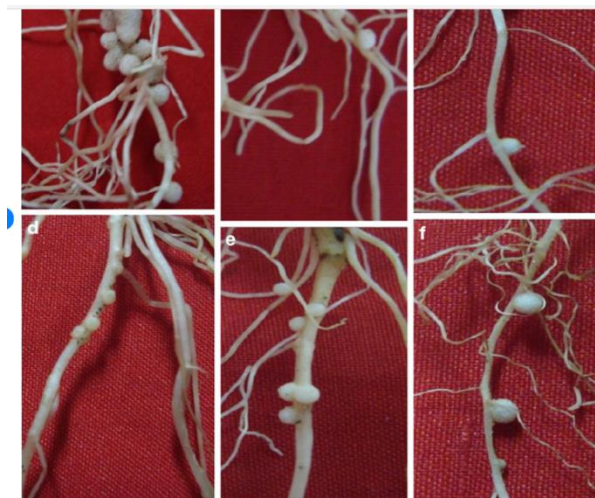


Рис 1.2. Вигляд бульбочок, що утворюються при інокуляції нуту штамми *M. ciceri*, на одній рослині може знаходитися одночасно до 50-60 окремих бульбочок [15]

на 20-80% в залежності від концентрації інших мікро- та макро- елементів у ґрунті.[13], [14],[15],[19], [20]

Дослідження, в яких проводився скринінг багатьох штамів, показав, що ключову роль у ефективності азотфіксації, підвищенні врожайності та стійкості до неблагочинних фізико-хімічних впливів є рівень спорідненості між *M. ciceri* та рослиною нуту, що виражається у структурі білків нодуляції та структурі бактеріальних екзополісахаридів, що ініціюють таксис бактерії у тканини коренів рослини нуту, підвищуючи конкурентну спроможність та культивість бульбочок на рослину. [16] [18]

Загалом рівень спорідненості та ефективності симбіозу може залежати від того, наскільки багато поколінь штам бактерії мав симбіотичні зв'язки з певним сортом нуту. Оскільки дослідження проведені в регіонах де не було власних аборигенних штамів *M. ciceri* (Україна, Австралія) показали, що найбільш ефективними симбіонтами іноді виявляються не референтні промислові штами бактерій, а їх нащадки, що були внесені у якості інокулянтів у минулих роках. [20],[16],[18] Так наприклад в Україні в 2019 році був виділений штам ND-64, що

Сорти	Варіанти дослідів	Урожайність, т/га	Приріст (до контролю)	
			т/га	%
Скарб	Контроль (без інокуляції)	1,44 ± 0,11	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,69 ± 0,07	0,25	17,4
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-101	1,82 ± 0,04	0,38	26,4
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,00 ± 0,09	0,56	38,9
Адмірал	Контроль (без інокуляції)	1,56 ± 0,03	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,71 ± 0,05	0,15	9,6
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-25	1,77 ± 0,08	0,21	13,5
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	1,92 ± 0,04	0,36	23,1
Одисей	Контроль (без інокуляції)	1,65 ± 0,03	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,86 ± 0,06	0,21	12,7
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-3	1,94 ± 0,05	0,29	17,6
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,06 ± 0,05	0,41	24,9
Буджак	Контроль (без інокуляції)	1,68 ± 0,03	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,89 ± 0,04	0,21	12,5
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-46	1,92 ± 0,01	0,24	14,3
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,04 ± 0,07	0,36	21,4
Тріумф	Контроль (без інокуляції)	1,66 ± 0,04	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,85 ± 0,05	0,19	11,4
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-50	1,77 ± 0,03	0,11	6,6
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,15 ± 0,04	0,49	29,5
Пам'ять	Контроль (без інокуляції)	1,62 ± 0,04	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,76 ± 0,05	0,14	8,6
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-601	1,79 ± 0,06	0,17	10,5
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	1,83 ± 0,05	0,21	13,0

Рис 1.3. Результати широкого порівняльного дослідження різних штамів *M. ciceri*, які демонструє суттєве підвищення врожайності при використанні штаму ND-64 [14]

має на 10-15% вищу ефективність симбіозу, ніж його попередник штам Н-12, який також був виділений з полів де вже вирощували нут у 2006-2007 роках. [20] Також схожі дослідження великої кількості штамів проводяться і в Австралії (рис. 1.4), де наразі виявляють більш ефективні штами ніж референтний CC1192. [19]

Table 2
Final grain yield, 100 seed weight and seed N content of 2019 Kununurra field experiment

Plant	Rhizobia	Yield (t/ha)	100 seed weight (g)	Seed N content (%)
Kyabra	CC1192	2.9ab	23.86	2.61
	3/4	2.6abc	23.17	2.58
	6/7	2.6abc	23.63	2.45
	N5	2.6bc	23.15	2.65
	N300	2.7abc	22.93	2.67
	K66	2.4c	22.69	2.62
	K188	2.4c	23.58	2.95
	-R/-N	2.4c	22.52	2.83
	-R/+N	3.0a	23.25	2.73
LSD, P = 0.05		0.25	0.89	0.02
Kimberley Large	CC1192	1.50	59.72	2.78
	3/4	1.70	60.41	2.39
	6/7	1.40	59.20	2.64
	N5	1.10	57.89	2.64
	N300	1.30	58.54	2.69
	K66	1.20	58.52	2.80
	K188	1.40	60.99	2.69
	-R/-N	1.30	59.40	2.64
	-R/+N	1.80	59.64	2.87
LSD, P = 0.05		0.52	3.08	0.01

Рис 1.4. Різниця використання різних штамів *M. ciceri* на збіднілих на азот ґрунтах (Австралія) [13]

Отже, розробка бактеріального біопрепарату - інокулянта на основі штаму *Mesorhizobium ciceri* ND-64 є важливим кроком до посилення біотехнологічного потенціалу України в контексті сталого сільського господарства. Його ефективність у симбіозі з нутом, зокрема здатність забезпечити до 85% потреб рослини в азоті, доводить доцільність широкого застосування препарату як альтернативи мінеральним добривам, що особливо актуально в умовах зростаючого інтересу до органічного землеробства.

Водночас для забезпечення стабільної якості та біологічної активності інокулянта критично важливо впровадження ефективних технологічних рішень на всіх етапах виробництва. Це включає не лише правильний підбір умов культивування, але й обґрунтований вибір мийних та дезінфекційних засобів для санітарного контролю виробництва, а також оптимізацію форми випуску та підбір післяферментаційних стадій з урахуванням біологічних властивостей культури.

РОЗДІЛ 2: Обґрунтування вибору біологічного агента

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

Широка популярність біодобрих на основі бактерій роду *Rhizobium* зумовило велике розмаїття методик аналізу та визначення ефективних штамів, що зумовило певні складності та великі розбіжності у ефективності препаратів, аж до того, що деякі з них не показують жодної ефективності у практичному використанні, що підриває довіру та доцільність вироблення таких добрив. [16]

Підбір високоефективного штаму – одне із основних задач створення якісного біодобрива, оскільки ефективність штаму залежить від фізико-хімічних, генетичних та фізіологічних ознак як бактерій так і рослини, тому для підбору біологічного агента варто застосовувати комплексний підхід, який би включав в себе, як і економічні показники, так і показники, що підтверджують здатність штаму створювати ефективний симбіоз.

Наразі кожен регіон світу має свої специфічні штами бактерій, які за різними показниками були виявлені як ефективні, і на основі яких в основному виробляють добрива в певних регіонах.[9]. Наприклад штам *M. ciceri* USDA 3100 є характерним для США, LMG 14989 характерний для європейського регіону, CC1192 є характерним для посушливих регіонів, таких як Австралія, Африка, Пакистан та Ізраїль.

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум	Підпис	Дата	1				
Розроб.	Висоцький О.І.				РОЗДІЛ 2: Обґрунтування виробу біологічного агента		Літ.	Лист	Листів
Перевір.	Красінко В.О.							1	16
Реценз.									15
Н. Контр.							НУХТ		
Затверд.	Стадніков В.П.								

Високоєфективні штами здатні підвищити врожайність рослин нуту від 4 до 50% у порівнянні з контролем, за нормального зовнішнього збагачення азотом та до 300% на бідних на поживні речовини та посушливих землях, це зумовлюється широким спектром дій *M.ciceri*, які полягають не тільки в фіксації атмосферного азоту, а і в солюбілізації фосфатів та сполук калію. [21] . Також варто відзначити здатність деяких штамів *M. ciceri*, до синтезу індолооцтової кислоти, яка згідно досліджень здатна стимулювати ріст та щільність коренів [17] .

У науковій літературі наявні дані щодо серії проведених досліджень взаємодії бактерій роду *Rhizobium* з іншими представниками азотфіксуючих родів бактерій та навіть грибами. Поєднання різних мікроорганізмів може провокувати ґрунтовні зміни на ґрунтовий мікробіом, пригнічуючи ріст патогенних мікроорганізмів, або створюючи мікоризну біоплівку навколо коренів рослин, захищаючи від негативного впливу навколишнього середовища. Але створення комплексних препаратів ще тільки проектується і більш глибокі симбіотичні відносини між різного роду ризосферними мікроорганізмами ще тільки встановлюються [15]

Методики визначення високоєфективних штамів органічно еволюціонували з плином часу та розвитком наукових досягнень, якщо раніше акцент у дослідженнях робився переважно на здатності бактеріального штаму до фіксації азоту, то зараз частіше використовується генетичний аналіз [1],[2]. на відповідність певних генів нодуляції, але наразі розуміння чого певні штами *M. ciceri* мають здатність до нодуляції на певних сортах нуту, а інші ні тільки з'ясовується. Відомо лише, що штами *M. ciceri* здатні поступово мутувати, і покращувати свою здатність до симбіозу з сортами нуту, які найчастіше зустрічаються вирощуються в певному регіоні. [2][16][17][20], Тому варто кожні декілька сезонів робити скрінінг наявних аборигенних штамів в ризосфері на наявність нових високоєфективних штамів.

Однією з головних проблем, які наразі не вирішені – це питання конкурентоспроможності різних штамів *M. ciceri*, оскільки як було виявлено здатність та ефективність нодуляції не корелює з азотфіксуючою активністю та у разі великої концентрації аборигенних штамів ризобій є великий шанс витіснення високоефективного виробничого штаму, менш ефективним диким, що безумовно призводить до зменшення врожайності. В Україні використовуються промислові штами *M. ciceri*, починаючи з 70-х років 20 століття, що створило певне видове різноманіття, яке наразі активно досліджується, і протягом останніх 20 років було 2 рази ґрунтовно проскановано різновиди штамів *M. ciceri* у ґрунтах України, що відображено в наступних дослідженнях: [4][17][22][23] та ін. За результатом першого скринінгу який був проведений у 2004-2006 роках було виведено високоефективний штам Н-12, який став наступником попереднього виробничого штаму 522. Він мав приблизно ідентичну активність нітрогенази, у порівнянні з попередником, але показував більшу ефективність симбіозу та ефективність з більшим числом сорту нуту [2] Другий скринінг у 2016-2017 роках показав еволюційну мутацію штамів, які мали ще більшу симбіотичну ефективність. Була виділена група штамів ND, з яких найефективнішим виявився ND-64, який показав стабільну ефективність на широкому спектрі сортів нуту, і стабільно випереджував всі інші штами, а також мав велику конкурентоспроможність [20] [24]

Одними з основних вимог до бактеріального добрива є підвищення урожайності с/г культури, висока конкурентна спроможність штаму, швидкість росту, та здатність до фіксації азоту.

Підвищення урожайності нуту виміряється різницею урожайності нуту контрольного поля без інокуляції та поля що було інокульовано, або ж різниця вирізняється відсотком приросту маси врожаю у порівнянні з контролем, де контроль приймають за 100%, а все, що перевищує цей показник вважається прибавкою, пов'язаною з використанням біопрепарату. Також для більш швидкого аналізу часто користуються методикою порівняння сухої біомаси зеленої

рослини нуту на різних періодах вегетації. Цей метод дозволяє прослідкувати ефективність симбіозу в динаміці. В таблиці 2.1 результати підвищення урожайності нуту були проаналізовані на основі даних з декількох статей, де було позначено мінімальний зафіксований показник та максимальний. [25]

Оскільки методики визначення конкурентоспроможності є дуже варіабельними та багато дослідників все ще ігнорують цей фактор [26], то конкурентна спроможність різних штамів азотфіксуючих бактерій була орієнтовно визначена кількістю бульбочок, що утворює штам на нуті. Є гіпотеза, що кількість бульбочок показує ефективність хемотаксису бактерій в епітелій коріння нуту.

Згідно аналізу літератури, досліджувані штами *M. ciceri* були поділені на ті що ростуть до сприйнятливої концентрації КУО 120 годин та 72 години. Сприйнятною концентрацією КУО на мл було позначено як не менше 2×10^9 , оскільки згідно аналізу біодобров, як і вітчизняного так і закордонного зразків концентрація нижче 1 мільярду КУО на мілілітр виявлено не було.

Орієнтовна концентрація біомаси була встановлена як не більше 15 грам на літр, оскільки більшу концентрацію згідно розрахунку представленого в розділі 2.2 отримати неможливо

Здатність фіксації азоту була проаналізована ацетилен-етиленовим методом, який вимірює кількість синтезованого етилену з ацетилену в ході реакцій фіксації атмосферного азоту за допомогою нітрогеназного комплексу. Цей метод надійно показує, що бульбочки *Mesorhizobium ciceri* фіксують атмосферний азот і дає певне числове позначення цього, але згідно досвіду дослідників активність нітрогеназного комплексу не завжди корелює з приростом урожайності, особливо на ґрунтах, які були збагачені азотом.

Завдяки літературним джерелам були детально проаналізовані наступні штами *M. ciceri*: CC1192, ND-64, LGM17149, H-12, USDA 3100, LGM 14989, які

є досить популярними виробничими штамми які показали себе як вкрай ефективно у певних біоагроценозах.

На основі порівняльного аналізу характеристик штаму, витрат на поживне середовище та вартості умовної одиниці продукції було встановлено, що *Mesorhizobium ciceri* ND-64 виявився найбільш конкурентоспроможним. Це пов'язано з його високою активністю нітрогенази, найвищим рівнем симбіотичної ефективності, швидкістю росту 72 години та економічно вигідним середовищем культивування. Найближчими конкурентами виявилися два попередні штамми, Н-12 та LGM17149, які вирізняються схожістю середовища культивування та тривалістю росту, проте відстають на 20-30% за показниками симбіотичної ефективності

Таблиця 2.1

Склад композицій поживного середовища та умове культивування штамів *Mesorhizobium ciceri*

Мікроорганізм	Склад поживного середовища		Тривалість культивування	Особливості процесу біосинтезу	Нітрогеназна активність, нмоль C ₂ H ₄ /росл. за год.	Мінімальний допустимий титр бактерій на мл	Кількість азотфіксуючих бульбочок на рослину	Ефективність симбіозу*	Джерела
	Компоненти середовища	Концентрація г/л							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>M. ciceri</i> CC1192	Глюкоза Манитол MgSO ₄ *7H ₂ O NaCl Дріжджовий екстракт CaCl ₂ *2H ₂ O K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ FeSO ₄ *7H ₂ O	5 5 0,8 0,1 1,25 0,2 0,16 0,13 0,1	120	Культивування в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (t = 28C; n = 220 об/хв) pH 7-7,5. рівень внесеного інокулянту 10%	1020	2*10 ⁹ КУО/мл	20-36	83-126%	1.Hill, Y., Colombi, E., Bonello, E., Haskett, T., Ramsay, J., O'Hara, G., & Terpolilli, J. (2021). Evolution of diverse effective N ₂ -fixing microsymbionts of Cicer arietinum following horizontal transfer of the Mesorhizobium ciceri CC1192 symbiosis integrative and conjugative element. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 87(5), e02558-20. [2] 2. Oparah, I. A., Deaker, R., Hartley, J. C., Sohail, M., Gemell, L. G., Hartely, E., & Kaiser, B. N. (2022). Symbiotic efficiency, rhizosphere competence and nodule occupancy of chickpea root-nodule bacteria from Australian soils. [19]

Продовження таблиці 2.1

<i>M. ciceri</i> ND-64	(NH ₄)SO ₄ K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O CaCO ₃ Сахароза Гороховий бульйон (100g/l)	1 0,5 0,5 0,2 1 10 1000	72	Культиування в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (t = 28С; n = 220 об/хв) рН 6.8-7 рівень внесення інокулянту 10%	638-3600**	2*10 ⁹ КУО/мл	15-43	112-154%	1. Логоша, О. В., Воробей, Ю. О., Волкова, І. В., & Усманова, Т. О. (2021). ШТАМ MESORHIZOBIUM CICERI ND-64 — ЕФЕКТИВНИЙ МІКРОСИМБІОНТ НУТУ СУЧАСНИХ СОРТІВ. <i>Сільськогосподарська мікробіологія</i>, 32, 3-17. https://doi.org/10.35868/1997-3004.32.3-17 [20] 2. Lohosha, O., Vorobei, Y., & Leonova, N. (2023). Symbiotic Efficiency and Cytokinin Activity of New Mesorhizobium ciceri Strains. <i>Mikrobiolohichnyi Zhurnal</i>, 85(1), 3-11. https://doi.org/10.15407/microbiolj85.01.003 [4] 3. Lohosha, O., & Vorobei, Y. (2021). Dynamics of formation and functioning of legume-rhizobial symbiosis' Mesorhizobium ciceri-Cicer arietinum'(variety Pam'iat'). <i>Australian Journal of Crop Science</i>, 15(1), 129-136.
------------------------	---	---	----	--	------------	-----------------------------	-------	----------	---

Продовження таблиці 2.1

<i>M. ciceri</i> MC-285	-	-	-	-	-	2*10 ⁹ КУО/мл		117%	1.СІПЛІВЕНКО, К. І. Вплив елементів технології на продуктивність нуту в умовах ФГ «Яник» с. Гольма Балтського району Одеської області..
<i>M. ciceri</i> H-12	(NH ₄)SO ₄ K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O CaCO ₃ Сахароза Гороховий бульйон (100g/l)	1 0,5 0,5 0,2 1 10 1000	72	Культивування в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (t = 28С; n = 220 об/хв) рН 7-7,5 рівень внесення інокулянту 10%	450-2301	2*10 ⁹ КУО/мл	9-21	111-121%	1. Логоша, О. В., Воробей, Ю. О., Волкова, І. В., & Усманова, Т. О. (2021). ШТАМ MESORRHIZOBIUM CICERI ND-64 — ЕФЕКТИВНИЙ МІКРОСИМБІОНТ НУТУ СУЧАСНИХ СОРТІВ. <i>Сільськогосподарська мікробіологія</i> , 32, 3-17. https://doi.org/10.35868/1997-3004.32.3-17 [20] 2. Дідович, С. В., & Толкачов, М. (2007). Ефективність нітрагінізації сортів <i>Cicer arietinum</i> L. штамми <i>Mesorhizobium ciceri</i> в умовах південного степу України. 3. Lohosha, O., & Vorobei, Y. (2021). Dynamics of formation and functioning of legume-rhizobial symbiosis' <i>Mesorhizobium ciceri</i> - <i>Cicer arietinum</i> '(variety Pam'iat'). <i>Australian Journal of Crop Science</i> , 15(1), 129-136.

Закінчення таблиці 2.1

<i>M. ciceri</i> LGM 17149(522)	(NH ₄)SO ₄ K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O CaCO ₃ Сахароза Гороховий бульйон (100g/l)	1 0,5 0,5 0,2 1 10 1000	72	Культивування в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (t = 28C; n = 220 об/хв) рН 7-7,5 рівень внесення інокулянту 10%	1600-2925	2*10 ⁹ КУО/мл	74-79	122%	1.Ефективні штами <i>Mesorhizobium ciceri</i> для виготовлення ризобіфіту під нут (<i>Cicer arietinum</i>) / С.В. Дідович, М.З. Толкачов, І.О. Каменева // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. — Чернівці, 2006. — Вип. 4. — С. 147-158. — Бібліогр.: 6 назв. — укр.
<i>M.ciceri</i> USDA 3100	K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O NaCl СаСО ₃ Дріжджовий екстракт Манітол	0,5 0,2 0,1 4 1 10 1000	72	Культивування в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (t = 28C; n = 220 об/хв) %	-	2*10 ⁹ КУО/мл	44-55	82-129%	1. Imran, A., Mirza, M. S., Shah, T. M., Malik, K. A., & Hafeez, F. Y. (2015). Differential response of kabuli and desi chickpea genotypes toward inoculation with PGPR in different soils. <i>Frontiers in microbiology</i> , 6, 859. [15]
<i>M.ciceri</i> LMG 14989	K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O NaCl СаСО ₃ Дріжджовий екстракт Манітол	0,5 0,2 0,1 4 1 10	120	Культивування в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (t = 28C; n = 220 об/хв)	-	2*10 ⁹ КУО/мл	-	104%	Wanjofu, E. I., Venter, S. N., Beukes, C. W., Steenkamp, E. T., Gwata, E. T., & Muema, E. K. (2022). Nodulation and Growth Promotion of Chickpea by <i>Mesorhizobium</i> Isolates from Diverse Sources. <i>Microorganisms</i> , 10(12), 2467. [16]

*Ефективність симбіозу розраховувалася за формулою $\left(\frac{\text{врожай}}{\text{врожай(контроль)}} \right) * 100 = \text{Ефективність симбіозу}$

** Показники можуть значно коливатися, оскільки рівень нітрогеназної активності в більшості залежить від сорту

Таблиця 2.2

**Розрахунок вартості поживних середовищ для культивування
*Mesorhizobium ciceri***

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>M. ciceri</i> CC1192	Глюкоза	5	57,60	0,288	3
	Манітол	5	228	1,14	3
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,8	26,4	0,02112	1
	NaCl	0,1	11,40	0,00114	1
	Дріжджовий екстракт	1,25	703	0,87875	2
	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,2	35	0,007	3
	K ₂ HPO ₄	0,16	261	0,04176	2
	KH ₂ PO ₄	0,13	125	0,01625	2
	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,1	39,5	0,003	1
Загальна вартість 2,39 грн на літр					
<i>M. ciceri</i> ND-64	(NH ₄) ₂ SO ₄	1	26,4	0,0264	1
	K ₂ HPO ₄	0,5	261	0,1305	2
	KH ₂ PO ₄	0,5	98	0,049	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	26,4	0,00528	1
	CaCO ₃	1	4	0,004	1
	Сахароза	10	25	0,25	1
	Гороховий бульйон (100g/l)	100	11	1,1	2
Загальна вартість 1.56 грн					
<i>M. ciceri</i> H-12	(NH ₄)SO ₄	1	26,4	0,0264	1
	K ₂ HPO ₄	0,5	261	0,1305	2
	KH ₂ PO ₄	0,5	98	0,049	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	26,4	0,00528	1
	CaCO ₃	1	4	0,004	1
	Сахароза	10	25	0,25	1
	Гороховий бульйон (100g/l)	100	11	1,1	2
Загальна вартість 1.56 грн					

Закінчення таблиці 2.2

<i>M. ciceri</i> LGM 17149(522)	(NH ₄)SO ₄	1	26,4	0,0264	1
	K ₂ HPO ₄	0,5	261	0,1305	2
	KH ₂ PO ₄	0,5	125	0,049	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	26,4	0,00528	1
	CaCO ₃	1	4	0,004	1
	Сахароза	10	25	0,25	1
	Гороховий бульйон (100g/l)	1000	11	1,1	2
Загальна вартість 1,56 грн					
<i>M. ciceri</i> USDA 3100	K ₂ HPO ₄	0,5	261	0,1305	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	26,4	0,00528	1
	NaCl	0,1	11	0,0011	1
	CaCO ₃	4	4	0,016	1
	Дріжджовий екстракт	1	703	0,703	2
	Манітол	10	228	2,28	3
Загальна вартість 3,13 грн					
<i>M. ciceri</i> LMG 14989	K ₂ HPO ₄	0,5	261	0,1305	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	7,5	0,00528	1
	NaCl	0,1	11	0,0011	1
	CaCO ₃	4	4	0,016	1
	Дріжджовий екстракт	1	703	0,703	2
	Манітол	10	228	2,28	3
Загальна вартість 3,13 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2025 р. 1. <https://novohim.com.ua/> 2. <https://prom.ua/ua> 3. <https://www.systopt.com.ua>

Умовна вартість 1 г біодобрива синтезованого на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Норма внесення інокулянту з розрахунку на 200 кг насіння мл	Тривалість культивування, год	Виробництво гектарної норми препарату % в годину в одному літрі середовища.	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>M. ciceri</i> CC1192	200	120	2.13%	2,39	0.0024
<i>M. ciceri</i> ND-64	200	72	4.6%	1.56	0.0015
<i>M. ciceri</i> H-12	200	72	4.6%	1.56	0.0015
<i>M. ciceri</i> LGM 17149(522)	200	72	4.6%	1.56	0.0015
<i>M. ciceri</i> USDA 3100	200	72	4.6%	3,13	0.031
<i>M. ciceri</i> LMG 14989	200	120	2.7%	3,13	0.031

2.2. Розрахунок потенційної максимальної біомаси, яку можливо отримати на запропонованій суміші ростових субстратів для культивування *Mesorhizobium ciceri* ND-64

Розрахунок концентрації карбону, що міститься в 1 літрі поживного середовища

Потреби для синтезу біомаси: Як джерело вуглецю для синтезу біомаси використовується сахароза у концентрації 10 г/л та гороховий бульйон на основі 100 грам сухого гороху. У біомасі міститься 50 % Карбону, оскільки з літературних джерел невідома точна біомаса, яка необхідна для створення біодобрива, то варто розрахувати яка максимальна концентрація біомаси може бути синтезована із запропонованого поживного середовища.

Оскільки основним цукром горохового бульйону є сахароза та крохмаль[27], які знаходяться там у відносній концентрації 50 грам на літр, то отримаємо загальну концентрацію вуглеводів в поживному середовищі 60 грам на літр ($10+50=60$). Оскільки в масова частка карбону в сахарозі та глюкозі дорівнює 42%, то за наступними розрахунками отримуємо ($60*0,42$) 25.2 грам карбону в літрі середовища. Оскільки як відомо 40% джерела карбону виходить на холосте окиснення ($25.2*0.6$), то потенційно, опираючись тільки на дані джерела карбону ми можемо отримати 15.12 грам біомаси в літрі середовища.

Розрахунок концентрації азоту, що міститься в 1 літрі поживного середовища

У запропонованому поживному середовищі джерелами азоту виступають 1 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та гороховий бульйон зі 100 грам сухого зеленого гороху. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ містить 21% відсоток азоту, згідно цієї інформації у 1 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ міститься 0.21 г азоту. Згідно джерела відомо, що в 1 літрі 17 грам білку, а оскільки білок в середньому складається за азоту на 16% [25], то отримаємо 2.72 грам азоту. Загалом концентрація азоту в середовищі дорівнює ($2.72+0.21$) 2.93 грам азоту. Припустимо клітина *M.ciceri* складається з 10% азоту, то тоді максимальний рівень біомаси згідно азотного живлення має не перевищувати 29,3 грам на літр ($2.93*10$).

Розрахунок концентрації фосфору, що міститься в 1 літрі поживного середовища

В поживному середовищі джерелами фосфору виступають K_2HPO_4 та KH_2PO_4 у концентраціях по 0.5 грам кожного, з чого отримуємо 1 грам солей фосфору у літрі середовища. Також варто відзначити, що джерелом фосфорного живлення також виступає гороховий бульйон, який згідно джерела має концентрацію фосфору 0.4 г на літр. Тепер варто визначити відсотковий склад фосфору у солі K_2HPO_4 . Оскільки відомо що масова частка фосфору у K_2HPO_4 становить 22.84%, то 0.5 містять $(0.5 \cdot 0.228)$ 0.114 грам фосфору. KH_2PO_4 містить 23% частку фосфору, що становить $(0.5 \cdot 0.23)$ 0.115 грам фосфору на літр. Сумуючі всі дані $(0.114 + 0.115 + 0.4)$ ми отримуємо 0.629 грам фосфору на літр середовища. Оскільки відомо, що в середньому бактеріальна клітина складається з фосфору на 3%, то ми можемо припустити, що максимальний рівень біомаси, який може бути досягнений при культивуванні за такої концентрації фосфору буде $((0.629/3) \cdot 100)$ 20.9 грам на літр

Інші компоненти середовища.

Інші компоненти середовища представляють собою елементи солей, наприклад K_2HPO_4 та KH_2PO_4 також виступають джерелами іонів K^+ , джерелом сірки виступає $(NH_4)_2SO_4$ та $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, джерелом магнію $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, джерелом кальцію $CaCO_3$, також ця сполука може виступати як буфер проти закислення середовища в результаті метаболізму бактерій. Джерелом інших мікроелементів виступає гороховий відвар, який згідно джерела потенційно містить всі необхідні мікроелементи.

Висновок: згідно аналізу запропонованого поживного середовища,

максимальна потенційна концентрація біомаси буде 15.12 грам на літр, і головним обмежуючим елементом буде виступати карбон. Підняття рівня загального карбону до 32 г/л може збільшити рівень біомаси до 20 грам на літр, і тоді вже головним обмежуючим фактором потенційно буде фосфор.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Mesorhizobium ciceri* ND-64

3.1. Морфолого-культуральні ознаки

Mesorhizobium ciceri є одним з поширених видів мікроорганізмів, що мешкають у ґрунті, його природня концентрація у ґрунті залежить від кількості бобових рослин що ростуть у певному біоагроценозі [1].

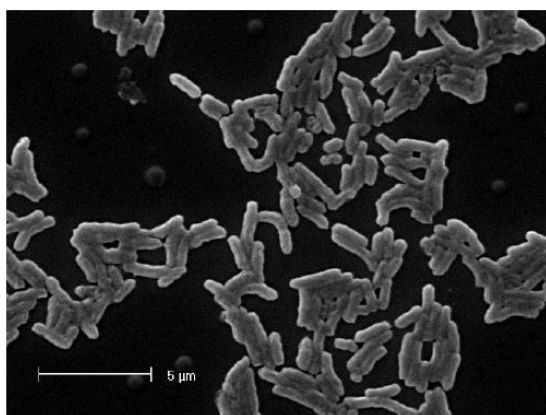


Рис. 5.1 Група бактерій *M. ciceri* під електронним мікроскопом [2]



Рис. 5.2 Колонія бактерій *M. ciceri* на твердому агаризованому середовищі [2]

Згідно патенту на *M. ciceri* ND-64 [28] він має наступні морфолого-культуральні ознаки. Культура бактерій неспороносна, аеробна, грамнегативна. Клітини рухомі, мають форму злегка зігнутих паличок. Колонії на бобовому агаризованому середовищі досягають на 4-5 добу 1-2 мм

В

діаметрі округлі, помірно опуклі, слизисті, напівпрозорі з рівним краєм. Штрих посіву слизуватий,

опуклий, білого кольору. Оптимум росту спостерігається при рН 6,8-7,0; температурі 25-30 °С

2.2 Фізіолого-біохімічні ознаки

Аероб. Молоко з лакмусом не пептонізує, знижує рН середовища до кислого. На поверхні молока утворює прозору зону.

Відношення до джерел вуглецю.

Штам добре росте на середовищах з арабінозою, рамнозою, мальтозою, сахарозою, глюкозою, ксилозою, лактозою, сорбітом, фруктозою та галактозою, помірно використовує маніт та сорбіт.

На рідкому середовищі Козера рН змінюється до 6,0. Відношення до джерел азоту. Штам добре росте на середовищах з амонійними нітратними, амідними солями, найкраще росте на середовищі з амонієм молібденокислим. На м'ясо-пептонному агарі та м'ясо-пептонному бульйоні не росте.

Штам чутливий до більшості досліджених антибіотиків:

рифампіцину, цефалексину, ампіциліну, амоксициліну, ципрофлоксацину, стрептоміцину, гентаміцину, нітрофурантоїну, тетрацикліну, левоміцетину, поліміксину, оксациліну, цефтриаксону,

резистентний до канаміцину, еритроміцину та нілідіксової кислоти.

Ознаки штаму стійкі. Штам патогенних властивостей не має (належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних доінвазії у внутрішні органи теплокровних тварин.

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Філогенетичну класифікацію для *M. ciceri* наведено згідно наукової бази даних «LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature» [29]

Домен: *Bacteria*

Тип: *Pseudomonadota*
Клас: *Alphaproteobacteria*
Ряд: *Hyphomicrobiales*
Родина: *Phyllobacteriaceae*
Рід: *Mesorhizobium*
Вид: *Mesorhizobium ciceri*
Штам: *Mesorhizobium ciceri* ND-64

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва інокулянту для нута на основі симбіотичних азотфіксуючих бактерій виду *Mesorhizobium ciceri*

3.1 Розрахунок потреби в інокулянті під нут

Потреба в підвищенні виробництва інокулянту під нут на основі бактерій виду *Mesorhizobium ciceri* зумовлена потенційним підвищенням посівних площ під нут, що витікає з багатьох кліматичних та економіко-соціальних факторів, а саме:

- Стрімкою зміною кліматичної ситуації у Південних областях України
- Підвищеним попитом нуту у країнах ЄС
- Стрімких розвитком дієт, що не передбачають вживання їжі тваринного походження

Зміна кліматичної ситуації в Південних областях України зумовлено загальносвітовою проблемою глобального потепління[30] Наразі підвищення середньої температури Південному регіоні зазначається на рівні 2-3°C, що поступово підводить ці області до кліматичної зони оптимальної для вирощування посухостійких, теплолюбних рослин, одною з яких є нут. Також варто зазначити, що руйнування Каховської ГЕС, внаслідок повномасштабних воєнних дій зруйнувало також і систему зрошення полів, що знаходяться в Запорізькій, Херсонській та Миколаївській областях, що призвело до суттєвого дефіциту вологи на оброблюваних землях.[31]

Наразі в країнах Європейського союзу спостерігаються досить активні міграційні процеси в рамках яких кількість мігрантів з Близького сходу, Центральної Азії та Африки суттєво збільшилася. Як відомо нут користується популярністю саме в зазначених регіонах, що призводить до досить великого попиту на цю зерново-бобову культуру, що може стати перспективним ринком експорту при підвищенні посівних площ під цю культуру. [32]

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ			
Змн.	Лист	. № докум	Підпис	Дата				
Розроб.		Висоцький О.І.			РОЗДІЛ 3: Техніко-економічне обґрунтування виробництва інокулянту для нута на основі симбіотичних азотфіксуючих бактерій виду <i>Mesorhizobium ciceri</i>	Літ.	Лист	Листів
Перевір.		Красінько В.О.					1	5 32
Реценз.						НУХТ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стадніков В.П.						

Нут, як і будь-яка зерново-бобова культура є багатим на білок, в середньому до складу 100 г сухих бобів нуту входить 19 грам білку, що є досить середнім показником серед інших бобових, наприклад в сухому гороху 23.1 грам білка, а в сої 36 грам білка на 100 грам сухого продукту. Але потенційно більш економічна вигідність та стресостійкість культури може стати підґрунтям для її вирощування замість інших бобових культур.

Наразі в Україні за результатами соціального опитування за 2021 рік від 2 до 4 млн людей утримуються від споживання м'яса, та від 600-800 тис. людей не споживають будь-які продукти тваринного походження, що в сумі становить від 7 до 10% відсотків популяції в Україні,[32] хоча ринок так званих замінників м'ясної продукції становить менше 0.2%[33] Низький попит на замінники м'яса рослинного походження зумовлений високою ціною через складну технологічну схему виробництва та низький попит. Але вирощування більш економічно вигідної сировини, може зменшити ціну на кінцеву продукцію і як наслідок розширити цей ринок для більшого числа потенційних споживачів.

Необроблений нут є непопулярним товаром в Україні, через більш дешевші та традиційні аналоги, наприклад горох або квасоля, але нут є привабливою культурою для експорту, так згідно статистичних даних Держстату за 2023 рік в Україні всього було зібрано 6.2 тис тон нуту, з яких 4.05 тис тон було експортовано в інші країни, тобто потенційно об'єм внутрішнього ринку нуту становить всього 2.15 тис тон в рік. [34]

Загалом збір урожаю нуту за останні роки скорочуються через бойові

Рік посівної	Загальна площа висіву тис. га.
2017	13.7
2018	46.9
2019	30.4
2020	11.5
2021	8.5
2022	3.4
2023	4.4
2024	8.9

Таблиця 3.1 Динаміка зміни посівних площ під нут в період з 2017-2023 роки. [35]

дії на сході та на півдні країни, так, якщо в 2020 році загалом було зібрано 14.22 тис тон нуту, то в 2023 всього 6.2 тис тон. Загалом посівні площі скоротилися з 11.5 тис гектар в 2020 до 4.4 тис гектар в 2023 (табл.1.1). [35]

Цільовим продуктом біосинтезу в рамках курсового проєкту є біодобриво на основі бульбочкових симбіотичних азотфіксуючих бактерій *Mesorhizobium ciceri*, загалом норма використання при концентрації $2 \cdot 10^9$ КУО/мл або КУО/г в

препараті складає 2 л на 1 т насіння рідкої форми препарату або 2 кг твердої форми препарату з ідентичним

титром життєздатних мікроорганізмів. Як відомо норма висіву нуту на 1 гектар складає від 100 до 200 кг[36] на гектар в залежності від технології вирощування. Якщо взяти максимальне значення в 200 кг насіння на гектар, то один літр препарату це 5 гектарних норм внесення.

Згідно посівних площ за 2024 рік, всього для закриття потреб для вирощування необхідно розрахувати:

$$5 \text{ га} - 1 \text{ л}$$

$$8900 \text{ га} - x$$

$$x = 8900/5 = 1780 \text{ л}$$

Вихідні дані для розрахунку потреби інокулянту для нуту

Потенційні зацікавлені споживачі	Гектарна норма внесення	Площа посівів нуту для оброблення 1 л біопрепарату	Кількість обробленого насіння на 1 літр препарату	Норма висіву нуту на гектар	Середні посівні площі під нут за період 2017-2023 роки	Об'єм висіву у 2024 році	Загальна річна потреба у препараті на 2024 рік
1	2	3	4	5	6	7	9
Агротехнічні холдінги, великі/малі фермерські господарства, приватні особи	200 мл	5 га	1 т	100-200 кг	16960 га	8900 га	1780 л

Вихідні дані для розрахунку потреби інокулянту для нуту

Примітки: Розрахунок гектарної норми препарату був взятий на основі препарату «BioNitro Нут» від компанії «Enzim» з аналогічною концентрацією КУО/мл.

Норма висіву нуту гектар була взята з огляду різних технологічних схем вирощування нуту [36]

3.2 Розрахунок потужності виробництва біодобрива для нуту

Здійснений аналіз українського ринку інокулянтів для нуту, дав зрозуміти, що останніми роками нут втрачає площі висіву, виробники лише в окремих випадках виробляють моноштамовий препарат під нут, найчастіше можна побачити широкий спектр бактерій роду *Rhizobium* у препараті, серед яких в невідомій концентрації містяться бактерії виду *Mesorhizobium ciceri*.

Імпортних моноштамових препаратів на ринку України не представлено. Загальна річна потреба в інокулянті для нуту згідно розрахунків у підрозділі 3.1 становить 880 л препарату на 2023 рік, але вже в 2024 році річна потреба в препараті склала 1780 л, що говорить про високу варіабельність посівів нуту протягом років. Як найактуальнішу на даний момент інформацію пропонується брати річну потребу за 2024 рік

Таблиця 3.3

Комерційні інокулянти під нут, що представлені на ринку України

Препарат	Компанія	Форма випуску	Концентрація КУО/мл	Джерело
1	2	3	4	5
Інокулянт для нуту «BiNitro Нут»	Enzim	Рідка/суха	2×10^9 КУО/мл /г	https://agro.enzim.biz/inokulyant-dlya-nutu.html
Ризоактив Бобові	Bionorma	Рідка/суха	2×10^9 КУО/мл /г*	https://bionorma.ua/inokulyanty/ryzoaktiv-bobovi-0-25-l/
БІОІНОКУЛЯНТ-БТУ-р® - для бобових	BTU centre	рідка	2- 6×10^9 КУО/мл *	https://btu-center.com/promisloviy-sektor/roslinnistvo/b-o-nokulyanti/b-o-nokulyant-btu-r/

* препарат містить консорціум бактерій роду *Rhizobium* під різні бобові культури, інформація про концентрацію КУО показує загальну життєздатність препарату по всім зазначеним видам бульбочкових бактерій.

Оскільки як відомо, біологічний агент *Mesorhizobium ciceri* ND-64, на запропонованому поживному середовищі також досягає концентрації 2×10^9 КУО/мл, то 1 л культуральної рідини відповідають зазначеним розрахункам, тобто 1 л або кг відповідає 5 гектарним нормам, тобто для закриття 50% потреб ринку необхідно створити 890 л культуральної рідини.

Як відомо [37]. рідка форма препарату при зберіганні в холодильному приміщенні при 4°C може зберігатися не більше 3 місяців після виробництва, тому пропонується використовувати рідку форму препарату з приготуванням поживного середовища з 75% компонентів та додаванням гліцерину, полівінілпіролідону та трегалози, що забезпечить продовжений термін зберігання до 6 місяців. Але виходячи з технологічного процесу фасування, помилок апаратури, людського фактору, залишків у ферментері та центрифугування. приймаємо орієнтовну величину витрат 15%. З яких 13% припадає на центрифугування [38].

3.3 Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення 50% річної потреби в інокулянті під нут згідно розрахунку (п1.2) необхідно синтезувати 890 літрів культуральної рідини бактерій *Mesorhizobium ciceri* ND-64 з концентрацією КУО не менше $2 \cdot 10^9$ на мл.

Враховуючи потенційні втрати в 15% отримуємо:

$$890 \cdot 1.15 = 1125 \text{ л}$$

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

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 1125 / 30 = 37,5 \text{ л/день}$$

Кількість культуральної рідини для створення біодобрива за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,2 \cdot 0.0375 \cdot 80) / 24 = 0.15 \text{ м}^3 / \text{цикл}$$

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

Визначивши об'єм КР за один цикл і знаючи коефіцієнт заповнення K_z , визначаємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}} / K_z = 0.15/0,6 = 0.25 \text{ м}^3.$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер $V_{\Phi} = 0.25 \text{ м}^3$. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_z = 0.15/0.25 = 0,6 \text{ – не перевищує заданого значення}$$

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для виробництва інокулянту для нуту

1. Початковий об'єм культуральної рідини:

Для виробничого циклу обрано ферментер об'ємом $0,25 \text{ м}^3$ (250 л), який забезпечує отримання 150 літрів культуральної рідини за один виробничий цикл. Втрати культуральної рідини внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря становлять 10%. Таким чином, з урахуванням втрат, об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед біосинтезом визначається за формулою:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\Phi}) = 0.150 * 1,1 = 0.165 \text{ м}^3 \text{ де:}$$

- $V_{\text{кр}}$ – об'єм культуральної рідини, який дорівнює 150 л;
- E_{Φ} – втрати через краплевинос (10%).

Розрахунок робочого та геометричного об'єму ферментера

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

$$V_{\Phi} = V_{\text{роб.1}} / 0.6 = 165 \text{ л} / 0.6 = 275 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер на 250 л.

Уточнений коефіцієнт заповнення для даного ферментера становить:

$$K_{z.1} = 165 \text{ л} / 250 \text{ л} = 0,66$$

Цей коефіцієнт знаходиться поза межами, допустимих для аеробних процесів (0,55-0,65), тому пропонується взяти ферментер об'ємом 300 л, тоді коефіцієнт заповнення буде дорівнювати $165/300 = 0.55$, що є допустимим для аеробних процесів.

Розрахунок кількості посівного матеріалу для ферментера

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища:

$$V_{\text{пм.1}} = V_{\text{роб.1}} \times 0,1 = 165 \text{ л} \times 0,1 = 16,5 \text{ л}$$

Таким чином, об'єм поживного середовища у ферментері після відбору посівного матеріалу буде:

$$V_{\text{пс.1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм.1}} = 165 \text{ л} - 16,5 \text{ л} = 148,5 \text{ л}$$

Розрахунок робочого об'єму посівного апарату

Для виробництва 16,5 л посівного матеріалу в посівному апараті необхідно врахувати втрати культуральної рідини на рівні 10%. Робочий об'єм посівного апарату розраховується за формулою:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм.1}} \times (1 + E_{\text{ф}}) = 16,5 \text{ л} \times 1,1 = 18,15 \text{ л}$$

За коефіцієнта заповнення 0,6 геометричний об'єм посівного апарату становить:

$$V_{\text{па.2}} = 18,15 \text{ л} / 0,6 = 30,25 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий стандартний посівний апарат об'ємом 30 л.

Коефіцієнт заповнення для цього апарата:

$$K_{\text{з.2}} = 18,15 \text{ л} / 30 \text{ л} = 0,6$$

Цей показник трохи нижчий за рекомендовані межі (0,55-0,65), однак він прийнятний для даного виробничого процесу.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора об'ємом 30 л

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату визначається аналогічно попередньому кроку:

$$V_{\text{пм.2}} = V_{\text{роб.2}} \times 0,1 = 18,15 \text{ л} \times 0,1 = 1,815 \text{ л}$$

Після відбору посівного матеріалу об'єм поживного середовища у посівному апараті:

$$V_{\text{пс.2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм.2}} = 18,15 \text{ л} - 1,815 \text{ л} = 16,335 \text{ л}$$

Визначення об'єму посівного матеріалу для інокулятора об'ємом 30л

Одержання посівного матеріалу $V_{\text{пм4}} = 1,815 \text{ л}$ (1815 мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням *Mesorhizobium ciceri* ND-64 у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750 \text{ мл}$ з коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зк}}) = 1815 / (750 * 0,2) = 12 \text{ колб}$$

Таким чином, після проведених розрахунків можна зробити висновок, що для виробничого біосинтезу необхідно використовувати ферментер об'ємом 300 л, посівний апарат на 30 л та 12 колб для отримання необхідного об'єму культуральної рідини та посівного матеріалу.

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

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$, м ³ (л)	Уточнений об'єм культуральної рідини $V_{роб.}$, м ³ (л)	Об'єм посівного матеріалу $V_{пм}$, м ³ (л)	Об'єм поживного середовища $V_{пс}$, м ³ (л)	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Геометричний об'єм ферментера $V_{ст}$, м ³ (л)
III	0,150 (150)	0,165(150)	0,0165 (16,5)	0,1485 (148,5)	0.55	0,3 (300)
II	0,0165 (16,5)	0,01815 (18,15)	0,001815 (1,815)	0,016335 (16,35)	0,6	0,03 (30)
I	0.001815 (18,15)	-	-	0.001815 (18,15)	0.2	12 колб

Примітка:

* З урахуванням $E_{ф}$

** Об'єм КР за один виробничий цикл, значення розраховано у п.1.3

Пояснення. Зміст стовпчика 3 розраховується: $V_{роб.} = V_{кр} \cdot (1 + E_{ф})$

Зміст стовпчика 4 розраховується: $V_{пм} = V_{роб.} \cdot X_{ф}$ і переноситься до стовпчика 2 наступного рядка

Зміст стовпчика 5 розраховується: $V_{пс} = V_{роб.} - V_{пм}$

Зміст стовпчика 7 спочатку розраховується, як: $V_{па(ф)} = V_{роб.} / K_{зап}$, а потім обирається найближче значення стандартного об'єму $V_{ст}$ згідно додатку 4

РОЗДІЛ 4. Біосинтез біомаси азотфіксуючих симбіотичних бактерій виду *Mesorhizobium ciceri* для отримання біодобрива для вирощування нуту

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату *Mesorhizobium ciceri*

Під час виробничої ферментації бактерій виду *Mesorhizobium ciceri* було використано поживне середовище з наступними ростовими субстратами: гороховий бульйон (співвідношення гороху до води 1:10) та сахароза 1% концентрації.

Як відомо з літературних джерел[39], основним джерелом вуглецю в гороховому бульйоні виступає крохмаль. Оскільки концентрація крохмалю та сахарози у поживному середовищі є майже еквівалентними, можна вважати, що ці ростові субстрати під час ферментації будуть використовуватися почергово або одночасно(дані відсутні, але перший варіант вірогідніший). З бази даних NCBI та KEGG відомо, що *M. ciceri* має власну глюкоамілазу [40,41] але α -амілази та β -амілази відсутні, що забезпечує досить повільне, але все ж таке розчеплення крохмалю напряду до глюкози.

Виходячи з вище описаних даних, мною було прийняте рішення розглядати катаболізм 2 цих ростових субстратів.

Оскільки *M. ciceri* є аеробним організмом, то йому властивий катаболізм ростового субстрату через гліколіз з подальшим переходом до Циклу Трикарбонових Кислот.

Ростовий субстрат катаболізований до глюкози фосфорилується до глюкозо-6-фосфату ферментом Глюкокіназою (КФ 2.7.1.2), потім ізомерується до фруктозо-6-фосфат фосфат залежною фосфотрикарбоксикіназою [КФ: 2.7.1.11], після чого додатково фосфорилується до 1,6 фруктозодифосфату, після чого руйнується фруктозо-бісфосфатазою [КФ: 4.1.2.13] до двох C_3 сполук,

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум	Підпис	Дата					
Розроб.	Висоцький О.І.				РОЗДІЛ 4: Біосинтез біомаси азотфіксуючих симбіотичних бактерій виду <i>Mesorhizobium ciceri</i> для отримання біодобрива для вирощування нуту		Літ.	Лист	Листів
Перевір.	Красінько В.О.							1	4
Реценз.							НУХТ		
Н. Контр.									
Затверд.	Стадніков В.П.								

а саме Діоксиацетонфосфат та гліцеральдегід-3-фосфату, які є взаємо перетворювальними завдяки ферменту тріозофосфатізомеразі [КФ: 5.3.1.1]. Після чого ферментом гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназою [КФ: 1.2.1.12] відбувається реакція перетворення гліцеральдегід-3-фосфату до Дифосфогліцерату. Після чого відбувається дефосфоризація до 3-фосфогліцерату фосфогліцераткіназою [КФ: 2.7.2.3] Потім відбувається реакція ізомеризації з 3-фосфогліцерату до 2-фосфогліцерату 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза [КФ: 5.4.2.11]. Наступний крок гліколізу реалізується за фосфопіруватгідратази [КФ: 4.2.1.11], який перетворює 2-фосфогліцерат до фосфоенолпірувату. І завершальний крок це дефосфорилювання фосфоенолпірувату ферментом піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40] до пірувату.

Схема катаболізму ростового субстрату представлена на схемі 4.1.

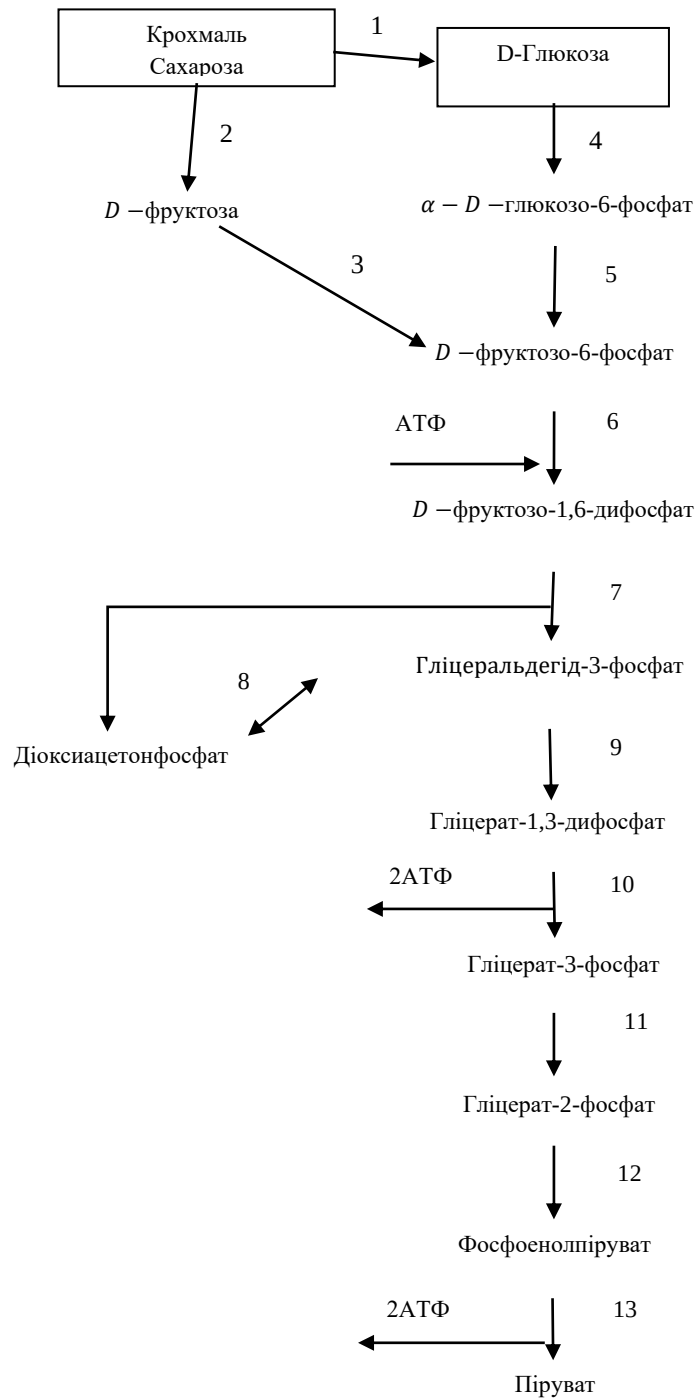


Схема 4.1 Катаболізм ростового субстрату

- 1) глюкоамілаза [КФ: 3.2.1.3]; 2) альфа-глюкозидаза [ЕС: 3.2.1.20]; 3) фруктокіназа [ЕС: 2.7.1.4]; 4) Глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 5) Глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 6) Фруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 7) Фруктоза-бифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 8)-

Тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 9)- Гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 10)-Фосфогліцерат кіназа (КФ 2.7.2.3); 11) — 2,3-бісфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 12)- Енолаза (КФ 4.2.1.11); 13)- Піруват кіназа (КФ 2.7.1.4)

4.2 Біотрансформація глюкози у біомасу *Mesorhizobium ciceri* ND-64

Аналіз представлений в цій самостійній роботі зроблений на базі сиквенсу ДНК *Mesorhizobium ciceri* CC1192, що був проведений австралійськими дослідниками в 2020 році. [2]

Біосинтез амінокислот: *M. ciceri* синтезує всі 20 протеїногенних амінокислот через анаплеротичні реакції ЦТК та гліколізу. Всі родини амінокислот синтезуються за загальною схемою, що предсталена в цій роботі. Однак варто відмітити, що згідно KEGG амінокислота лізін синтезується з оксалоацетату через аспартат та серин через гомосерин. Для синтезу лізину через аспартат утворюються 3 проміжні продукти, а саме: тетрагідродипіколінат, діамінопемілат, діаміногептадіоат, остання сполука піддається дії декарбоксилювання (діамінопімелатдекарбоксилаза [КФ: 4.1.1.20]) з утворенням лізину.

Біосинтез Нуклеїнових кислот: Біосинтез нуклеїнових кислот відбувається класичним шляхом через проміжні продукти пентозо-фосфатного циклу, а саме з ростового субстрату синтезується фруктозо-6-фосфат, який переходить у пентозо-фосфатний цикл, де декарбоксилюється до робозо-5-фосфату з подальшим переходом дифосфорибозил-5-фосфат. Після чого зазначена сполука використовується для синтезу всіх нуклеїнових кислот: цитозину, тиміну, аденіну, урацилу та гуаніну. Варто зазначити, що синтез цитозину не до кінця відкритий у бактерій роду *Mesorhizobium* оскільки всі ферменти для синтезу цитидіну (прямого попередника цитозину) присутні, але жоден з

існуючих відомих ферментів, що каталізує перетворення цитидину на цитозин відсутні, оскільки як вже зазначалося схема в KEGG, побудована на секвенуванні ДНК *Mesorhizobium ciceri* CC1192 у 2020 році, автори у статті не давали жодних коментарів з цього приводу, тому маю припущення, то вході еволюції послідовність нуклеотидів цього фермента настільки змінилася, що має надто низьку спорідненість з аналогічними ферментами інших мікроорганізмів.

Біосинтез Пептидоглікану. *M. ciceri* є грам негативною бактерією, тому пептидоглікан складає лише приблизно 10% сухої маси клітинної стінки бактерії. Але все ж він є одним з ключових захисних бар'єрів бактеріальної клітини, тому варто детально розглянути систему його біосинтезу. Згідно бази даних KEGG існує 3 підвиди пептидоглікану і відповідно 3 шляхи його біосинтезу, а саме 1) лізиновмісний пептидоглікан, 2) ізглютамініл-лізиновмісний пептидоглікан 3) та діамінопіменоїл вмісний пептидоглікан. В клітині *M. ciceri* синтезується діамінопіменоїл вмісний пептидоглікан, для синтезу якого необхідна УДФ-ацетилмурамова кислота та амінокислоти: L-аланін, D-аланін, діамінопіменоїл та γ -глутамін.

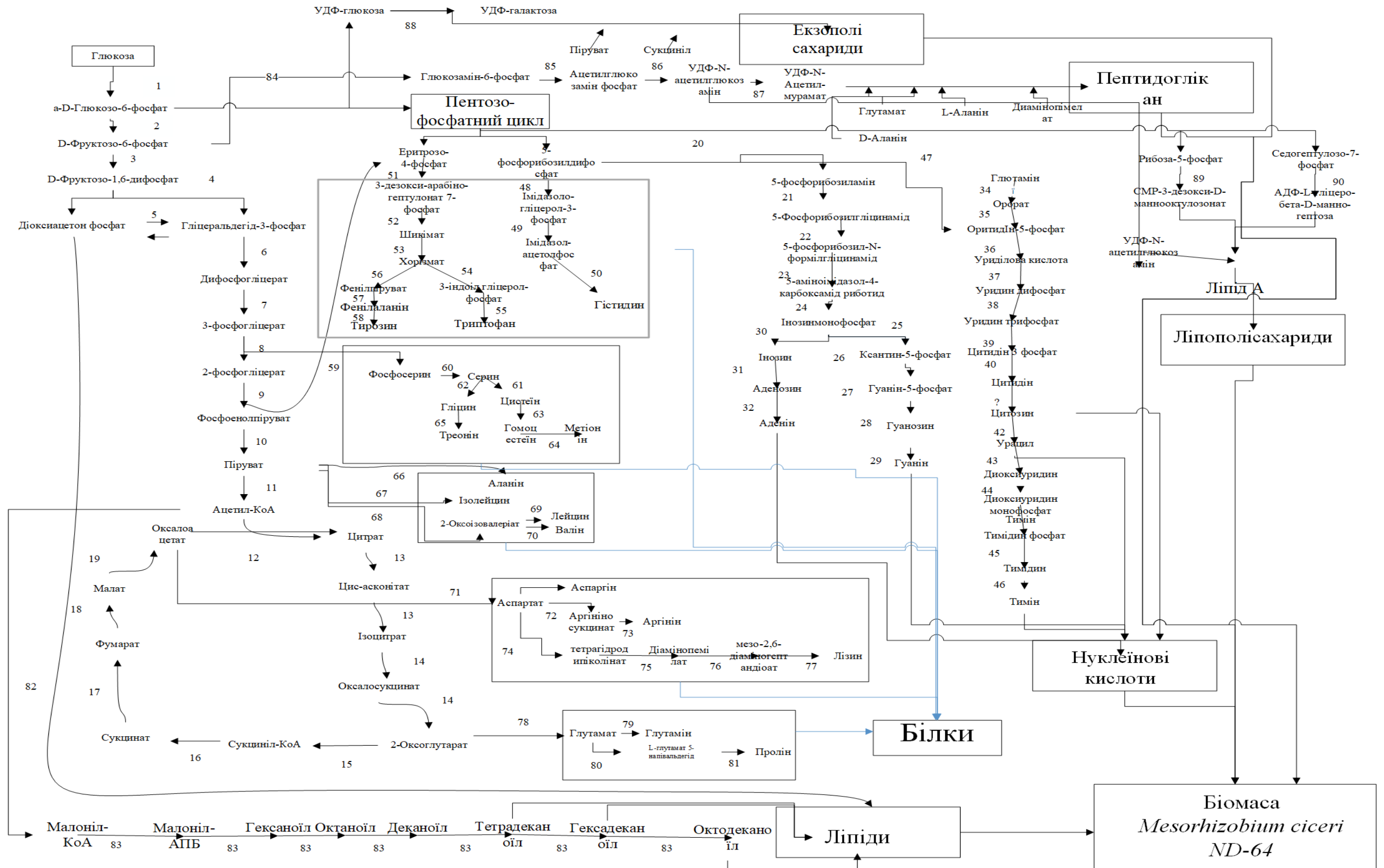
Біосинтез Ліпополісахаридів: Ліпід А в *M. ciceri* синтезуються на основі 3 попередників, Рибози-5-фосфату, седогептулози 7 фосфату та УДФ-ацетилглюкозаміну. Варто відмітити, що в процесі біосинтезу ліпиду А кінцевим продуктом біосинтезу є Додеканоїл-KDO2-ліпід IV(A), а не Додеканоїл-(тетрадеканоїл)-KDO2-ліпід IV(A), бо згідно бази даних KEGG фермент Лецитинхолестеринацилтрансфераза [КФ 2.3.1.43], що каталізує фінальну реакцію відсутня в *M. ciceri*. Після синтезу Додеканоїл-KDO2-ліпід IV(A) до нього приєднуються моносахариди, що найчастіше представлені глюкозою, галактозою та рамнозою. [42]

Біосинтез Ліпідів: Жирні кислоти для синтезу ліпідів синтезуються з ацетил-КоА шляхом подовження C_2 ланцюга до C_{14} , C_{16} та C_{18} Ферментним комплексом: S-малонілтрансфераза [КФ: 2.3.1.39] 3-оксоацил-[ацил-переносний білок] синтаза I [КФ: 2.3.1.41], 3-оксоацил-[ацил-переносний протеїн] синтаза II [КФ: 2.3.1.179] 3-оксоацил-[ацил-переносний білок] редуктаза [КФ: 1.1.1.100], 3-гідроксіацил-[білок-носій ацилу] дегідратаза / транс-2-деценоіл-[білок-носій ацилу] ізомераза [КФ: 4.2.1.59 5.3.3.14], 3-гідроксіацил-[ацил-переносний білок] дегідратаза [КФ: 4.2.1.59], еноіл-[білок-носій ацилу] редуктаза I [КФ: 1.3.1.9 1.3.1.10]. Паралельно з цим з циклу трикарбонових кислот діоксиацетон фосфат шляхом 1 реакції переходить у Гліцерол 3 фосфат до якого потім приєднується 2 жирні кислоти, утворюючи фосфоліпіди.[43]

Біосинтез екзополісахаридів: Як відомо бактерії роду *Rhizobium* продукують екзополісахариди, які необхідні для ініціації бобово-ризобіального симбіозу. Бактерії використовують екзополісахаридну плівку, щоб втриматися на зернах бобових рослин, а також екзополісахариди виступають розчинниками білків нодуляції, структура яких і визначає здатність штаму вступати в симбіоз з бобовими рослинами

Різобіальні екзополісахариди складаються з двох моносахаридів, а саме β -глюкози та β -галактози, що з'єднані між собою 4,6 та 3,6 зв'язками з окремими включеннями пірувати та сукцинату. Синтез екзополісахаридів відбувається завдяки ферментному комплексу 7 екзополісахарид продукуючих протеїнів.

Схема 2. Біосинтез біомаси *Mesorhizobium ciceri*



Ферменти що приймають участь у Біосинтезі біомаси *Mesorhizobium ciceri* ND-64

Ферменти згідно номерів: 1) Глюкокіназа (КФ 2.7.1.2); 2) Глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3) Фруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4) Фруктоза-бисфосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13); 5) Триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6) Гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7) Фосфогліцерат кіназа (КФ 2.7.2.3); 8) — 2,3-бисфосфогліцератзалежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9) Енолаза (КФ 4.2.1.11); 10) Піруват кіназа (КФ 2.7.1.40); 11) Цитрат синтаза (КФ 2.3.3.1); 12) аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3); 13) ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 14) Компонент 2-оксоглутаратдегідрогенази Е1 (КФ 1.2.4.2); 15) дигідроліпоамідсукцинілтрансфераза (КФ 2.3.1.61); 16) альфа-субодиниця сукциніл-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.5); 17) сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 18) фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2); 19) малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 20) амідофосфорибозилтрансфераза [КФ: 2.4.2.14]; 21) фосфорибозилгліцинамідформілттрансфераза 1 [КФ: 2.1.2.2]; 22) фосфорибозилформілгліцинамідинсинтаза [КФ: 6.3.5.3]; 23) фосфорибозилформілгліцинамідин циклолігаза [КФ: 6.3.3.1]; 24) — фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формілттрансфераза [КФ: 2.1.2.3 3.5.4.10]; 25) фосфорибозиламіноімідазолкарбоксамід формілттрансфераза / IMP циклогідролаза [КФ: 2.1.2.3 3.5.4.10]; 26) 5'/3'-нуклеотидаза [КФ: 3.1.3.5 3.1.3.6]; 27) IMP дегідрогеназа [КФ: 1.1.1.205]; 28) — GMP синтаза (гідролізуюча глютамін) [КФ: 6.3.5.2]; 29) — 5'/3'-нуклеотидаза [КФ: 3.1.3.5 3.1.3.6]; 30) - пурин-нуклеозидфосфорилаза [КФ: 2.4.2.1]; 31) - пурин-нуклеозид/S-метил-5'-тіоаденозинфосфорилаза/аденозиндезаміназа [КФ: 2.4.2.1 2.4.2.28 3.5.4.4]; 32) - пурин-нуклеозидфосфорилаза [КФ: 2.4.2.1]. 33) мала субодиниця карбамоїлфосфатсинтази [КФ: 6.3.5.5] 34) дигідрооротатдегідрогеназа [КФ: 1.3.5.2]. 35) оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза [КФ: 4.1.1.23]; 36) уридилаткіназа [КФ: 2.7.4.22]; 37) Нуклеозиддифосфаткіназа [КФ: 2.7.4.6]; 38) СТР-синтаза [КФ: 6.3.4.2]; 39) нуклеозиддифосфаткіназа [КФ: 2.7.4.6]; 12) цитозин/креатиніндезаміназа [КФ: 3.5.4.1 3.5.4.21]; 40) тимідинфосфорилаза [КФ: 2.4.2.4]; 41) тимідинкіназа [КФ: 2.7.1.21]; 42) тимідилатсинтаза [КФ: 2.1.1.45]; 43) — 5'-нуклеотидаза [КФ: 3.1.3.89]; 44)-

тимідинфосфорилаза [КФ: 2.4.2.4]; 47)- оротатфосфорибозилтрансфераза [КФ: 2.4.2.10];

48) фосфорибозил-АТФ пірофосфогідролаза, фосфорибозил-АМФ циклогідролаза, фосфорибозилформіміно-5-аміноімідазол карбоксамід риботид ізомераза, імідазолгліцеролфосфатсинтаза [КФ: 3.6.1.31], [КФ: 3.5.4.19], [КФ: 5.3.1.16]; 49) імідазолегліцерин-фосфатдегідратаза [КФ: 4.2.1.19]; 50) гістидинол-фосфатамінотрансфераза, гістидинол-фосфатаза,], гістидинолдегідрогеназа [КФ: 2.6.1.9], [КФ: 3.1.3.15], [КФ: 1.1.1.23];

51) 3-дезоксигептулоноатсинтаза [КФ: 2.5.1.54]; 52) 3-дегідрокінатдегідратаза II, шикімаатдегідрогеназа [КФ: 4.2.1.10], [КФ: 1.1.1.25]; 53) шикімааткіназа, 3-фосфошкімаат-1-карбоксивінілтрансфераза, хоризматсинтаза [КФ: 2.7.1.71], [КФ: 2.5.1.19], [КФ: 4.2.3.5]; 54) компонент I антранілатсинтази, антранілатфосфорибозилтрансфераза, індол-3-гліцеролфосфатсинтаза [КФ: 4.1.3.27], [КФ: 2.4.2.18], [КФ: 4.1.1.48]; 55) триптофансинтаза [КФ: 4.2.1.20]; 56) Хоризмат мутаза, префенатдегідратаза [КФ: 5.4.99.5], [КФ: 4.2.1.51]; 57) трансаміназа ароматичних амінокислот [КФ: 2.6.1.57]; 58) Хоризмат мутаза, трансаміназа ароматичних амінокислот [КФ: 5.4.99.5];

59) D-3 фосфогліцерат дегідрогеназа, фосфосеринамінотрансфераза [КФ: 1.1.1.95] [КФ: 2.6.1.52]; 60) фосфосеринфосфатаза [КФ: 3.1.3.3]; 61) Гліцин гідроксиметилтрансфераза [КФ: 2.1.2.1]; 62) треонін-альдолаза [КФ: 4.1.2.48]; 63) цистатіонін бета-синтаза [КФ: 4.2.1.22]; 64) цистатіонін-гамма-ліаза, цистеїн-S-кон'югат бета-ліаза [КФ: 4.4.1.1], [КФ: 4.4.1.13]; 65) 5-метилтетрагідрофолат — гомоцистеїн метилтрансфераза [КФ: 2.1.1.13]; 66) Аланін дегідрогеназа [КФ: 1.4.1.1]; 67) амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом, дигідроксикисла дегідратаза, редуктоізомераза кетолової кислоти, велика субодиниця ацетолактатсинтази I/II/III [КФ: 2.6.1.42], [КФ: 4.2.1.9], [КФ: 1.1.1.86], [КФ: 2.2.1.6]; 68) амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом, дигідроксикисла дегідратаза, редуктоізомераза кетолової кислоти [КФ: 2.6.1.42], [КФ: 4.2.1.9], [КФ: 1.1.1.86]; 69) амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [КФ: 2.6.1.42]; 70) 2-ізопропілмалатсинтаза, Велика субодиниця 3-ізопропілмалат, 1-2-метилмалатдегідратази, 3-ізопропілмалатдегідрогеназа, амінотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом [КФ: 2.3.3.13], [КФ: 4.2.1.33], [КФ: 4.2.1.35], [КФ: 1.1.1.85]; 71) аспаратамінотрансфераза [КФ: 2.6.1.1] 72) аспарагінсинтаза (гідролізує глутамін) [КФ: 6.3.5.4], 73) аргініносукцинатсинтаза [КФ: 6.3.4.5]; 32)

аргініносукцинатліаза [КФ: 4.3.2.1]; 74) аспартаткіназа, аспартат-семіальдегіддегідрогеназа, 4-гідрокси-тетрагідродипіколінатсинтаза, 4-гідрокси-тетрагідродипіколінатредуктаза [КФ: 2.7.2.4] [КФ: 1.2.1.11] [КФ: 4.3.3.7], [КФ: 1.17.1.8]; 75) 2,3,4,5-тетрагідропіридин-2,6-дикарбоксилат N-сукцинілтрансфераза, ацетилорнітин/N-сукцинілдіамінопімелат амінотрансфераза, сукцинілдіамінопімелатдКФукцинілаза [КФ: 2.3.1.117], [КФ: 2.6.1.11], [КФ: 2.6.1.17], [КФ: 3.5.1.18]; 76) діамінопимелат епімераза [КФ: 5.1.1.7]; 36) діамінопімелатдекарбоксилаза [КФ: 4.1.1.20]. 77) діамінопимелат епімераза [КФ: 5.1.1.7]; 78) малий ланцюг глутаматсинтази (NADPH) [КФ: 1.4.1.13]; 26) глутамінсинтетаза [КФ: 6.3.1.2]; 80) глутамат-5-напівальдегіддегідрогеназа, глутамат-5-кіназа [КФ: 1.2.1.41], [КФ: 2.7.2.11]; 81) пірролін-6-карбоксилатредуктаза [КФ: 1.5.1.2]; 82) ацетил-КоА-карбоксилаза, субодиниця біотинкарбоксилази [КФ: 6.4.1.2 6.3.4.14]; 83) S-малонілтрансфераза [КФ: 2.3.1.39]

3-оксоацил-[ацил-переносний білок] синтаза I [КФ: 2.3.1.41], 3-оксоацил-[ацил-переносний протеїн] синтаза II [КФ: 2.3.1.179] 3-оксоацил-[ацил-переносний білок] редуктаза [КФ: 1.1.1.100], 3-гідроксіацил-[білок-носій ацилу] дегідратаза / транс-2-деценііл-[білок-носій ацилу] ізомераза [КФ: 4.2.1.59 5.3.3.14], 3-гідроксіацил-[ацил-переносний білок] дегідратаза [КФ: 4.2.1.59], еноіл-[білок-носій ацилу] редуктаза I [КФ: 1.3.1.9 1.3.1.10];

84) фосфоглюкозамінмутаза, біфункціональна UDP-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилаза / глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза [КФ: 5.4.2.10], [КФ: 2.7.7.23], [КФ: 2.3.1.157]; 85) біфункціональна UDP-N-ацетилглюкозамінпірофосфорилаза / глюкозамін-1-фосфат N-ацетилтрансфераза [КФ: 2.7.7.23 2.3.1.157] 86) UDP-N-ацетилглюкозамін 1-карбоксивінілтрансфераза, UDP-N-ацетилмураматдегідрогеназа [КФ: 2.5.1.7], [КФ: 1.3.1.98]. 87) UTP—глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза [КФ: 2.7.7.9]. 88) 3-дезоксидманно-октулозонатцитидилілтрансфераза (CMP-KDO синтетаза) : 2-дегідро-3-дезоксифосфооктонатальдоза (KDO 8-P синтаза) : арабіноза-5-фосфат ізомераза [КФ: 2.7.7.38] [КФ: 2.5.1.55] [КФ: 5.3.1.13], 89) трансальдоза [КФ: 2.2.1.2]; 90) D-седогептулозо-7-фосфат-ізомераза D-бета-D-гептоза 7-фосфаткіназа D-гліцеро-D-манно-гептоза 1,7-бісфосфат фосфатаза ADP-L-гліцеро-D-манно-гептоза 6-епімераза [КФ: 5.3.1.28] [КФ: 2.7.1.167] [КФ: 3.1.3.82] [КФ: 5.1.3.20]

РОЗДІЛ 5: ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ КУЛЬТИВУВАННЯ *MESORHIZOBIUM CICERI* ND-64

5.1 Обґрунтування способу культивування та вибору ферментера для культивування *Mesorhizobium ciceri* ND-64

Mesorhizobium ciceri є бактерією ризосфери землі, що зумовлює певні відмінності у культивуванні, що зумовлено природнім ареалом існування цих бактерій:

Оптимальні умови культивування *M. ciceri* ND-64:

Оптимальна температура росту	28°C
Оптимальний рН	6.8-7
Відношення до кисню	Облігантний аероб

Згідно з зазначеними характеристиками штаму, можна впевнитися в необхідності проведення асептичного культивування, оскільки більшість мікроорганізмів, що відносяться до бактерій та грибів, можуть бути культивовані у схожих умовах, тому ризик контамінації сторонньою мікрофлорою є досить великим, що недопустимо для цільового продукту, оскільки концентрація життєздатних клітин напряду виражає вагу насіння, яка може бути цим препаратом оброблена. З дослідження ко-культивування відомо, що при наявності сторонньої мікрофлори, концентрація клітин *M. ciceri* може падати до 10^5 - 10^7 КУО/мл, що зменшує кількість ефективно обробленого насіння в сотні разів. [44]

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ			
Змн.	Лист	. № докум	Підпис	Дата				
Розроб.	Висоцький О.І.				РОЗДІЛ 5: ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>MESORHIZOBIUM</i> <i>CICERI</i> ND-64	Літ.	Лист	Листів
Перевір.	Красінько В.О.						1	38 52
Реценз.						НУХТ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стадніков В.П.							

Культивування буде проводитися глибинним методом, оскільки в цьому режимі є можливість забезпечити асептичні умови та більш ефективний розвиток бактеріальної маси. Більш того в процесі пошуку наукової літератури, досліджувалися лише оптимізації ферментації саме глибинним методом[45]

Асептичні умови культивування, будуть забезпечені попередньою стерилізацією обладнання, комунікації, поживного середовища та піногасників. Культивування буде проводитися за підвищеного тиску 0.05 МПа задля контролю герметичності процесу. [46]

Оснащення для культивування *M. ciceri* ND-64 представляє собою ферментер, який би відповідав наступним вимогам:

Оскільки *M. ciceri* ND-64 є облігатним аеробом, то наявність системи подачі стерильного повітря та барботера є обов'язковою. Згідно досліджень було встановлено, що концентрація розчиненого кисню та швидкість росту біомаси напряду корелюють [47], тому реалізація перемішування за допомогою барботера та турбінної мішалки, швидкість якої від 100 до 500 об/хв є необхідною складовою ферментера.

Оскільки *M. ciceri* ND-64 активно закиплює середовище під час розвитку культури, і при рН нижче за 5 спостерігається значне інгібування росту, тому стерильне внесення розчину титрантів є необхідною функцією ферментера.

Контроль концентрації цільового продукту є ключовим аналітичним відстеженням процесу культивування, тому у ферментері має бути присутня функція стерильного відбирання проб у вигляді пробовідбірника придатного для відбору проб в полум'ї кругового пальника

Фізико-хімічні показники є ключовими в аналізі процесу культивування, тому ферментер має бути оснащений датчиками рН, концентрації розчиненого кисню, датчиками температури та паровою термо-сорочкою, яка б підтримувала стабільну температуру культивування.

Оскільки в процесі культивування передбачається використання стерильного аераційного повітря, тому важливими компонентами ферментера також є патрубок виходу відпрацьованого повітря.

Оскільки процес культивування *M. ciceri* ND-64 є асептичним, ферментер має бути повністю герметичним та здатним підтримувати умови стерилізації та підвищеного тиску.

Оскільки поживне середовище для культивування *M. ciceri* ND-64 включає в себе гороховий бульйон, очікується високий рівень піноутворення, що є згубним для процесу. Високий рівень піноутворення можна ефективно видалити силіконовими піногасниками, які варто стерильно вносити в поживне середовище у концентрації 0.1-0.5% від загального об'єму. [48]

Ферментер «Techfors 300» [49]

Таблиця 5.1
Характеристика ферментера
«Techfors 300»

Показник	Характеристика
Макс. Робочий об'єм	200 л
Мін. Робочий об'єм	35 л
Висота	1600 мм
Діаметр	500 мм
Співвідношення сторін	3.2:1
Робочі температури	-10°C до 150°C (сорочка/ємність)
Макс. Робочий тиск	Від -1 бар до +4 бар ємність, від -1 бар до +3.5 бар сорочка
Датчик рН (InPro 3253i, ISM)	Діапазон вимірювань від 0 до 12
Датчик розчиненого кисню (DO) (InPro6860i, ISM)	Діапазон 0% - 285% (100% рівень кисню в атмосфері), допустима темп. Межа 60°C
Насоси (Перистальтичний насос 114DV)	3 (Кислота, луг, піногасник) 2 (підживлення) Максимальна продуктивність при 200 об/хв 172 мл в год.

Характеристика ферментера «Techforse 300» представленої в таблиці 5.1 можна дійти висновку, що

даний ферментер повністю підходить для реалізації технологічного процесу культивування *M. ciceri* ND-64 оскільки він має робочий об'єм 200 л, датчики рН, DO та термопару, можливість підтримувати надлишковий тиск, технології SiP (Sterilization in Place) та CiP (Cleaning in Place).

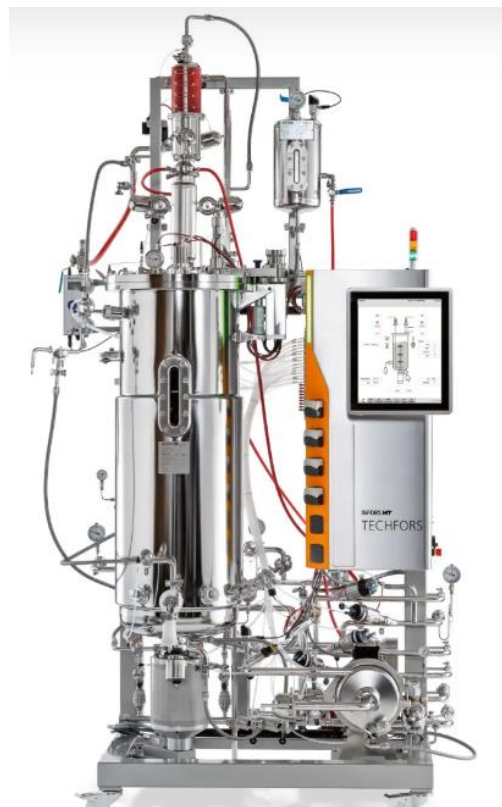


Рис 5.1 Ферментер «Techfors 300» [49]

Dimensions impellers [mm]		75 L	150 L	300 L	750 L
	A	105	132	150	230
	B	21	26	30	45
	C	26	33	42	60

Рис 5.2 Схема та розміри мішалки ферментера «Techforse 300» [49]

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Mesorhizobium ciceri є облігантним аеробом, який потребує для ефективного росту та розвитку 40 л повітря на 1 л за годину [47] оскільки якість кінцевого продукту визначається його рівнем життєздатності, що має складати не менше 2×10^9 КУО / мл, то подача стерильного повітря протягом усіх 72 годин культивування є необхідною умовою отримання кінцевого продукту.

За цикл культивування буде використано інокулятор об'ємом 30 л, у якому знаходиться 18,15 л культуральної рідини (тривалість культивування 36 год) та виробничий ферментер об'ємом 300 л з 165 л культуральної рідини (тривалість культивування 72 год). Таким чином, виходячи з того, що рівень подачі стерильного повітря дорівнює $40 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$, система очистки повітря має працювати з ефективністю не менше 6,60 м³ повітря за годину (пік споживання у фазі роботи ферментера).

Розрахунок потреби чистого повітря для виробничих процесів:

$$Q = V_{\text{інок}} \times t_{\text{інок}} \times R + V_{\text{ферм}} \times t_{\text{ферм}} \times R$$

де

$V_{\text{інок}} = 18,15 \text{ л}$ (0,01815 м³);

$t_{\text{інок}} = 36 \text{ год}$;

$V_{\text{ферм}} = 165 \text{ л}$ (0,165 м³);

$t_{\text{ферм}} = 72 \text{ год}$;

$R = 40 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ (0,04 м³ · л⁻¹ · год⁻¹).

$Q = 18,15 \times 36 \times 40 + 165 \times 72 \times 40 = 26\,136 \text{ л} + 475\,200 \text{ л} = 501\,336 \text{ л} = 501,3 \text{ м}^3$ за весь цикл.

Або:

Загальна тривалість циклу становить 36 год + 72 год = 108 год.

Середньогодинна витрата дорівнює

$Q/t = 501,3 \text{ м}^3 / 108 \text{ год} = 4,64 \text{ м}^3 \text{ повітря за год в середньому протягом культивування}$

Під час роботи лише ферментера фактичний газовий потік сягає

$$0,165 \text{ м}^3 \times 40 \text{ м}^3 \text{ м}^{-3} \text{ год}^{-1} = 6,60 \text{ м}^3 \text{ год}^{-1}$$

З урахуванням 15% резерву приймаємо мінімальну продуктивність системи фільтрації та компресора $7,6 \text{ м}^3 \text{ год}^{-1}$.

Перевірка масоперенесення кисню KLa

Для підтвердження, що така подача газу забезпечує потрібний перенос O_2 , обчислюємо коефіцієнт масопередачі за кореляцією Cooper & Fernandes: [50]

$$KLa = 0,037 \left(\frac{P}{V} \right)^{0,4} \left(\frac{Q_g}{V} \right)^{0,5},$$

де P/V — питома потужність мішалки (Вт м^{-3}), Q_g/V — об'ємний газовий потік ($\text{м}^3 \text{ м}^{-3} \text{ с}^{-1}$).

Норма $40 \text{ л л}^{-1} \text{ год}^{-1}$ відповідає $0,667 \text{vvm}$ або $0,0111 \text{ с}^{-1}$.

Для інокулятора беруть $P/V = 100 \text{ Вт м}^{-3}$

$$KLa_{\text{інок}} = 0,037 (100)^{0,4} * (0,0111)^{0,5} \approx 0,0246 \text{ с}^{-1} = 88 \text{ год}^{-1}.$$

Для ферментера беруть $P/V = 20 \text{ Вт м}^{-3}$:

$$KLa_{\text{ферм}} = 0,037 (20)^{0,4} (0,0111)^{0,5} \approx 0,0129 \text{ с}^{-1} = 47 \text{ год}^{-1}.$$

Літературно встановлений мінімум для штамів *Rhizobium* — приблизно 31 год^{-1} . Отже, 88 год^{-1} в інокуляторі й 47 год^{-1} у ферментері забезпечують достатню швидкість масоперенесення кисню ($OTR \geq 30 \text{ ммоль } O_2 \text{ л}^{-1} \text{ год}^{-1}$), що потрібно для досягнення кінцевої життєздатності $2 \times 10^9 \text{ КУО мл}^{-1}$. [51]

Згідно з розрахунків ферментера його геометричний об'єм має складати $0,3 \text{ м}^3$, в такому випадку аналізуючи стандартні розміри ферментера його висота складає $1,6 \text{ метра}$, враховуючи висоту стін 6 м та скіс даху

підприємства 4 метрів відбір повітря буде проходити на висоті 3 метри від найвищої точки виробництва, що складає 13 метрів.

- 1) Першою стадією в системі очистки повітря виступає закачка повітря із зовнішнього середовища за допомогою забірника повітря, вихідна повітрозабірна труба має довжину 13 метрів.
- 2) Після чого повітря поступає на фільтр грубого очищення, класу G1-G4, який має затримувати до 90% часточок розміром 10 мкм та більше.
- 3) Наступним етапом після попереднього очищення буде поступання повітря в компресор, де повітря буде нагріватися до 120-250°C за рахунок стиснення до 0,35–0,5 МПа
- 4) Для охолодження нагрітого під час стиснення повітря та видалення вологи у краплєвловлювачі, повітря охолоджують за допомогою водяного теплообмінного апарату;
- 5) Для остаточного видалення конденсованої вологи та вирівнювання тиску повітря подають у ресивер.
- 6) Після ресиверу повітря подається через фільтрувальну систему з 3 фільтрів M5, M6 та F7 класу, в яких затримується до 98% часточок розміром від 3 до 10 мкм, та до 90% часточок розміром 0.3-3 мкм.
- 7) На комунікаціях подачі повітря ферментера та інокулятора встановлюються фільтри тонкої очистки (ФТО) F8-F9 класу, які затримують 99,999% часточок розміром від 0.3 до 1 мкм або більше.

Оскільки всі запропоновані фільтри мають волокнисту структуру та за своїми технічними властивостями є тканиною, задля знищення посторонньої мікрофлори всі фільтри мають пройти процес стерилізації гострою парою за температури 130°C протягом 40 хв

5.3 обґрунтування вибору мийних та дезинфікуючих засобів для виробництва інокулянту під нут

Для підтримання належного санітарного стану ділянки виробництва та стабільного виробництва продукції з максимальним зменшенням впливу будь-

яких зовнішніх факторів на біотехнологічний процес виробництво має впровадити протокол очистки виробничого приміщення, обладнання та комунікацій.

5.3.1 Методики очистки ферментаційного обладнання та реакторів для стерилізації поживного середовища.

Для очистки ферментаційного обладнання пропонується використовувати систему CiP (Cleaning in Place), яка здатна якісно очистити обладнання від залишок культуральної рідини, сольових відкладень та інших видів забруднень, використовуючи форсунки, що здатні направляти потоки миючого розчину або води малого діаметру під високою швидкістю за рахунок тиску. Оскільки форсунка здатна направляти потоки на 360°, то система CiP ефективно очищує всю внутрішню площу реактора.

Для реалізації системи CiP необхідні наступні компоненти: Відцентровий насос з кислото- та луговитравалих матеріалів, збірник для зберігання та використання води для очищення, збірник для зберігання та використання розчину кислоти та збірник для зберігання та використання лужного розчину, збірник для зберігання та використання дезінфікуючого розчину.

Загалом очистка за системою CiP включає в себе наступні кроки.

- 1) Попередня очистка водопровідною водою для знаття легкорозчинного забруднення
- 2) Очистка водою розчином лугу для очистки та нейтралізації жирового забруднення
- 3) Очистка водою для нейтралізації залишків лугу після попереднього етапу
- 4) Очистка розчином кислоти для розчинення мінеральних забруднень
- 5) Нейтралізація залишків кислоти осмотичною водою

3) У статті [52] описано систему Clean-in-Place (CIP) для біореакторів, яка включає попереднє ополіскування водопровідною водою (5–6 хвилин), циркуляцію 2% NaOH при 75–80 °C протягом 15–20 хвилин,

ополіскування деіонізованою водою (25–35 °C), а також етап кислотного очищення (1% соляної кислоти при 60 °C) і санітарної обробки гарячою осмотичною водою. Рекомендується забезпечити швидкість потоку 1,5–2 м/с з числом Рейнольдса $\geq 10\,000$, використовуючи об'єм розчину 4–12 л на квадратний метр внутрішньої поверхні. Система автоматизована з контролем температури, провідності та інших параметрів для забезпечення ефективного очищення і зменшення ризику забруднення. Валідація включає перевірку залишків миючих засобів, визначення рівня органічних залишків і тестування ефективності очищення.

Таблиця 5.2

Розрахунок кількості очисної води, миючих та дезінфікуючих засобів для проведення очищення системою СіР виробничого ферментера об'ємом 300 л

Порядок операцій	Тип розчину	Ціль використання	Об'єм розчину від об'єму реактора л
1	Водопровідна або оборотна вода	Попереднє очищення від забруднення	1178.1 л
2	Очищення лужним розчином	Розчинення органічних забруднень	30 л
3	Змивання лужного розчину осмотичною водою	Нейтралізація луку	90 л
4	Промивання кислотним розчином	Очищення мінеральних забруднень	30 л
5	Змивання кислотного розчину осмотичною водою	Нейтралізація кислоти	90 л

Розрахунок витрат очисних розчинів для системи СіР:

1. Попереднє промивання:

При діаметрі трубопроводу 50 мм при промиванні водою протягом 5 хв на швидкості 2 м/с необхідний об'єм водопровідної води складає:

Розраховуємо діаметр поперечного перерізу труби за формулою:

$$A = \frac{\pi d^2}{4}$$

$$A = \frac{3.1416 \times (0.05)^2}{4} = \frac{3.1416 \times 0.0025}{4} = \frac{0.007854}{4} = 0.0019635 \text{ м}^2$$

Розраховуємо об'ємний потік води за формулою:

$$Q = v \times A$$

$$Q = 2 \times 0.0019635 = 0.003927 \text{ м}^3/\text{с}$$

Та розраховуємо загальний об'єм води, що був поданий за 5 хв:

$$V = Q \times t$$

$$V = 0.003927 \times 300 = 1.1781 \text{ м}^3$$

Або

$$1178.1 \text{ л за 5 хв}$$

2. Згідно джерела рекомендується застосовувати 4-12 л миючого розчину на квадратний метр ферментера, габаритні розміри ферментера складають 1600 мм висота та 500 мм діаметр, таким чином внутрішня площа ферментера складає:

Розраховуємо радіус реактора:

$$R = D/2 = 0.5/2 = 0.25 \text{ м}$$

Обчислюємо площу бічної поверхні (стінки циліндра):

Формула:

$$A_{\text{бічне}} = 2\pi RH$$

Підставляємо значення:

$$A_{\text{бічне}} = 2 \times 3.1416 \times 0.25 \times 1.6 = 2.513 \text{ м}^2$$

Обчислюємо площу дна та кришки (два круги):

Формула:

$$A_{\text{дно + кришка}} = 2\pi R^2$$

Підставляємо значення:

$$A_{\text{дно + кришка}} = 2 \times 3.1416 \times (0.25)^2 = 0.393 \text{ м}^2$$

Загальна площа поверхні реактора:

$$A_{\text{загальна}} = A_{\text{бічне}} + A_{\text{дно + кришка}}$$

$$A_{\text{загальна}} = 2.513 + 0.393 = 2.91 \text{ м}^2$$

Виходячи з цього беремо 10 л миючого розчину на 1 м² ферментера:

$$10 \times 2.91 = 29.1 \text{ л}$$

Для спрощення технологічного процесу пропонується брати 30 л миючого розчину на очистку ферментера.

Для очищення осмотичною водою пропонується брати 3 об'єми води для 1 об'єму миючого розчину, тобто:

$$30 \text{ л} \times 3 = 90 \text{ л}$$

Вираховування внутрішньої площі реакторів для визначення об'ємів очисних розчинів для СіР мийки всіх реакторів

Для вираховування внутрішньої площі реакторів необхідно знати їх об'єм та співвідношення сторін або внутрішній діаметр та висота.

Також в рамках апаратурної схеми представлені 2 харчоварильні котли, які пропонується мити вручну через зменшені вимоги до очищення через те що в них не будуть проводитися жодні стерильні операції та їх особливості конструкції не дозволяють проводити там СіР мийку за класичною схемою, через відсутність комунікацій. Також на апаратурній схемі представлені реактор-стерилізатор та інокулятор, їх очищення та дезінфекція через систему СіР не є доцільною через малі габарити

Тому для очищення цих апаратів рекомендується схема очищення з заповненням очищуючими розчинами на 90% об'єму при працюючій мішалці.

5.3.2 Характеристика мийних та дезінфікуючих засобів для приміщення виробництва інокулянту під нут Бактифом [53]

Склад:

Діюча речовина: дидецилдиметиламоній хлорид – 6,93–7,30% **Допоміжні речовини:** вода та катіонні ПАВ 7%

Державна реєстрація: Комісія з державної санітарно-епідеміологічної експертизи при головному державному санітарному лікарєві України Наукового центру превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України від 13.01.2021 №12.2-18-5/197 Наказ від 16.02.2021 №270 до 16.02.2026

Загальний опис: БАКТИФОМ — Концентрований засіб для дезінфекції, що має вигляд прозорої, безбарвної рідини з високим рівнем рН (у межах 12–14), призначений для застосування в широкому спектрі об'єктів, що мають підвищене епідеміологічне значення. Його використовують для поточної та фінальної обробки приміщень у медичних установах, підприємствах харчової та агропромислової галузей, закладах освіти, соціального захисту, оздоровчих і санаторно-курортних закладах, а також в інших організаціях, де необхідний належний санітарно-гігієнічний контроль.

Препарат має доведену ефективність проти бактерій, грибків і вірусів, що підтверджено відповідністю стандартам EN 1276, EN 1650 та EN 14476. Під час використання робочі розчини цього засобу одночасно виконують функції миття, знежирення та знезараження, що оптимізує технологічний процес. Засіб легко змішується з водою, не пошкоджує нержавіючі сталеві поверхні, керамічні матеріали, лінолеум і вироби з полімерів. Він не належить до

речовин, що можуть горіти або вибухати, що підвищує безпеку його зберігання та застосування.

Концентрація робочого розчину

Робочі розчини готують розведенням концентрату у воді (не вище 30 °С) при перемішуванні. Концентрація залежить від умов застосування:

Бактерицидна дія:

0,5% – 5 хв (чисті умови)

1,5% – 5 хв (брудні умови)

Фунгіцидна дія:

0,5% – 15 хв (чисті умови)

1,0% – 15 хв (брудні умови)

Віруліцидна дія:

0,5–1,0% – 5–30 хв (залежно від типу вірусу та умов)

Термін придатності підготовлених робочих розчинів – 7 діб за умови зберігання у промаркованій тарі із закритою кришкою. Робочі розчини використовують з метою дезінфекції та очищення одноразово.

Безпека

Концентрат: відноситься до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпечності); проявляє виразну подразнюючу дію при надходженні на шкіру та слизові оболонки очей; при інгаляційному надходженні може викликати подразнення дихальних шляхів.

Робочі розчини: класифікуються як малонебезпечні при надходженні на шкіру та слизові оболонки очей.

Бланідаз Марка А [54]

1. Склад: 1-бром-3-хлор-5,5-диметилгідантоїн (20,0-22,0%) 5,5 диметилгідантоїн натрію, триполіфосфат, поверхнево-активні речовини інгібітори корозії, кухонна сіль (до 100%)

Вміст активного хлор-броду: не менше 19,5%.

2. Відомості про державну реєстрацію: Державна установа "Інститут медицини праці НАМН України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/13854 від 24.06.2020 р. до 15.07.2025

3. Загальний опис:

Дезінфікуючий засіб «Бланідаз (Blanidas®)», марка А — це порошок від білого до світло-жовтого кольору з помірним запахом хлору. Він добре розчиняється у воді (не менше 20 мг/л), утворюючи прозорі безбарвні розчини. Засіб має змочувальні, емульгуючі та мийні властивості, не пошкоджує поверхні з металу, скла, гуми, полімерів тощо. рН 1% розчину: 5,5-7,0.

4. Призначення:

- **Дезінфекція обладнання та виробничих приміщеннях біотехнологічних, харчових та фармацевтичних виробництв**
- **Спектр дії:**
 - Бактерії (включаючи туберкульоз, MRSA, кишкові інфекції).
 - Віруси (гепатити, ВІЛ, грип, SARS).
 - Гриби (кандидози, дерматомікози).

Таблиця концентрацій:

Використовувати гарячу воду ($60 \pm 5^{\circ}\text{C}$) для прискорення розчинення.

Поверхні приміщень:

1% розчин, 30 хв (протирання/зрошення).

Термін зберігання робочих розчинів:

До 3 діб (у закритій тарі).

Для достерилізаційного очищення — до 14 діб.

Токсичність та безпечність засобу: Засіб Blanidas® (марка А) є малонебезпечним при потраплянні в організм через рот або на шкіру.

У чистому вигляді та у високих концентраціях (2,5%) Blanidas® може викликати подразнення слизових оболонок очей і дихальних шляхів.

Однак у рекомендованих для дезінфекції концентраціях засіб не подразнює шкіру та очі.

Він не всмоктується через шкіру, не викликає алергії та не має мутагенних, ембріотоксичних або канцерогенних властивостей.

Миючий засіб SUPRA б/п [55]

Безпінний концентрований лужний миючий засіб з дезинфікуючим ефектом для використання для систем СіР. Підходить для таких поверхонь: бетон, пластик, нержавіюча сталь. Ефективно видаляє органічні забруднення, які в рамках технологічної схеми виражаються залишками горохового бульйону та сахарози.

Склад:

Вода демінералізована, гідроксид натрію, 10-15% неіоногенні ПАВ, барвник, піногасник.

Для зручного дозування пропонуємо використовувати мірну пляшку та рукавички для захисту рук.

Застосування:

Перед використанням засіб необхідно збовтати. Рекомендована температура використання від 20 до 80°C.

Застосовувати згідно з інструкцією до миття обладнання. Концентрація: 20 мл на кожні 10 л води. При генеральному прибиранні допускається збільшення концентрації до 50-100 мл на 10 л води.

Відповідає вимогам системи якості НАССР / ХАССП

Для сильних забруднень використовують 2% розчин миючого засобу

Кислотний миючий засіб Акваклін СіП [56]

Акваклін СіП кислотний миючий засіб для очищення та декальцинації обладнання у молочній та харчовій промисловості.

Акваклін СіП - це кислотний миючий засіб для видалення кальцію та стійких неорганічних відкладень.

До складу Акваклін СіП входить азотна кислота та фосфорна кислота:

Зволожувальні поверхнево-активні речовини збільшують миючу властивість продукту.

Відсутність силікатів та піноутворення робить цей миючий засіб придатним для застосування в системі СіР

Застосування та показання:

Акваклін СіП використовується для очищення біотехнологічного обладнання між циклами виробництва, використовується після обробки лужним засобом.

Попередньо промити оброблювані поверхні теплою водою.

Обробити обладнання робочим розчином Акваклін СіП у співвідношенні 50 г на 10 л води за температури 40°C протягом 8 хвилин (0,5% розчин).

Після очищення ретельно промити обладнання холодною водою.

Умови зберігання:

Продукт зберігають та транспортують за температури від +5°C до +30°C у щільно закритій тарі у захищеному від сонячного світла та нагрівальних приладів місці.

Гарантійний термін зберігання: 36 місяців з дати виготовлення.

Дезінфікуючі засіби для персоналу

DEZOQUATUM [57]

Склад: 72-77% спирт ізопропіловий, вода підготовлена, гліцерин, 0,15% алкілдиметилбензиламоній хлорид. ТУ У 20.2-31287090-008:2020

Відомості про державну реєстрацію: Державна установа “Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва Національної академії медичних наук України” від 31.07.2020 №12.2-18-5/17302 до 04.01.2026 року

Вартість: 231 грн/л

Dezoquatium 10 — це готовий до використання антисептичний розчин, призначений для дезінфекції шкіри рук. Його формула базується на високому вмісті ізопропілового спирту (близько 72-77%), який є більш дешевшим та ефективнішим аналогом спирту етилового.

Призначення та ефективність:

Дезінфікуючі властивості: Засіб ефективно знищує широкий спектр бактерій (грампозитивні та грамнегативні), а також плісняві гриби та їх спори

Призначення: Дезінфекція рук персоналу протягом виробничої зміни

5.3.3 Розрахунок площі приміщень та витрат мийних і дезінфікуючих засобів

Таблиця 5.3

Габаритні розміри обладнання для культивування *M. ciceri* ND-64 для створення інокулянту під нут

Обладнання	Геометричний об'єм л	Діаметр мм	Висота мм	Співвідношення сторін	Внутрішня площа
Інокулятор	30	300	1600	3:1	-
Реактор стерилізатор	30	300	1600	3:1	-
Ферментер	300	500	1600	3.2:1	2.91 м ²
Реактор стерилізатор	300	500	1600	3.2:1	2.91 м ²
Харчоварильний котел	30	600	800	1:1	-
Харчоварильний котел	200	800	850	1:1	-

Об'єм обладнання для ручної мийки	290
Загальний об'єм л	890

Розрахунок площі підлоги та стін виробничого приміщення

Оскільки лінія виробництва інокулянту є малогабаритною з максимальним об'ємом апарату 300 л, то пропонується використовувати будівлю зі стандартною висотою стін 6 м. довжина кімнати складає 12 м включаючи виробничу лабораторію ширина кімнати складає 6 м.

Таким чином загальна площа підлоги кімнати складає:

$$12 * 6 = 72 \text{ м}^2$$

А площа стін складає:

$$12 * 6 * 2 + 6 * 6 * 2 = 216 \text{ м}^2$$

Площа стін для омивання після кожного циклу: $12 * 2.5 * 2 + 6 * 2.5 * 2 = 90 \text{ м}^2$

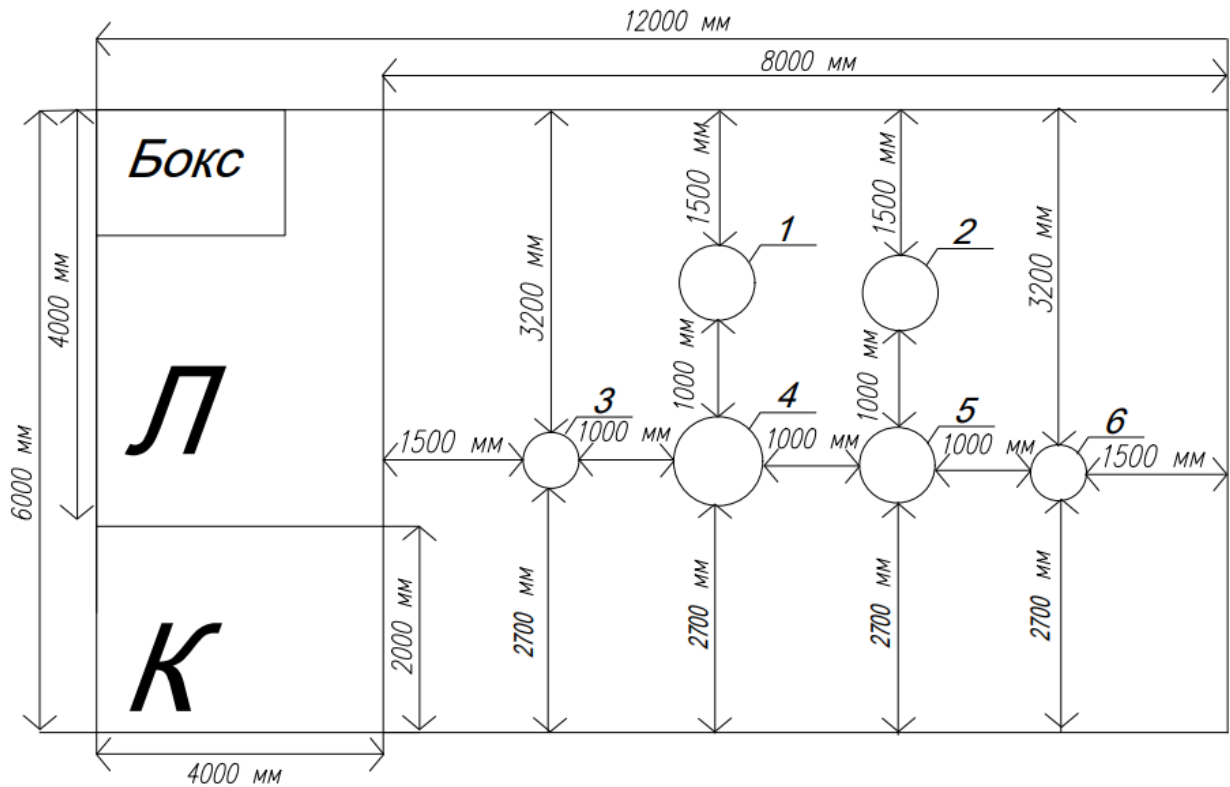


Рис. 5.3. Ескіз плану виробничого приміщення для виробництва біомаси *M. ciceri* для виготовлення інокулянту під нут (А – цех виробничого біосинтезу (1 – харчоварильний котел об’ємом 200 л, 2 – харчоварильний котел об’ємом 30 л, 3 – реактор стерилізатор об’ємом 200 л, 4 – ферментер об’ємом 300 л, 5 – інокулятор об’ємом 30 л, 6 – реактор-стерилізатор для приготування композиції А; Л – мікробіологічна лабораторія; К – приміщення з качалками).

Загалом для чистки приміщень пропонується використовувати 100 мл дезінфікуючого робочого розчину на 1 м²

В такому випадку для сезону виробництва необхідно обробити 2304 м² підлоги, 216 м² стін та вікон під час генерального прибирання та 270 м² стін під час миття стін після кожного циклу та 72,9 м² обладнання.

Таблиця 5.4

Загальна площа обладнання та виробничого приміщення для розрахунку мийних та дезінфікуючих розчинів

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання (кожен цикл виробництва)	8.9	9	80.1
Підлога (щоденне)	72	32	2304
Стіни, двері, вікна (генеральне)	216	2	432
Стіни, двері, вікна (щодня циклу)	90	9	270

Враховуючи той факт, що на 1 м² підлоги планується використовувати 100 мл робочого дезінфікуючого розчину, то необхідно 230,4 л дезінфікуючого розчину на сезон виробництва для прибирання підлоги та 27 л для миття стін після кожного циклу виробництва. 43.2 л для миття стін та вікон (генеральне прибирання) та 7.3 л для миття обладнання.

Для мийки обладнання з середини планується використовувати 0.8 об'єму мийного розчину на 1 об'єм апарату, тобто враховуючи об'єми представлені в таблиці 2.2 це 232 літрів кожного мийного засобу. Всього планується 9 циклів, тож загалом (232*9) планується використати 2088 літрів кожного розчину в рамках ручної чистки обладнання.

Враховуючи дані, обраховані в таблиці 5.4 щодо використання розчинів очищення в системі CiP, необхідно розрахувати скільки буде використано лужного та кислотного розчину. Два апарати будуть підключені до системи CiP, тож дані таблиці варто помножити на 2, виходить 60 л лужного розчину та 60 л кислотного розчину, оскільки буде проведено 9 циклів виробництва, то:

$$60 * 9 = 540 \text{ л кожного з розчинів на сезон виробництва}$$

Таблиця 5.5

Розрахунок витрат робочих розчинів мийних та дезінфікуючих засобів

Назва розчину	Кількість розчину мл на 1 м ²	Мийка підлога л	Мийка стін та вікон (що циклу) л	Мийка стін та вікон (генеральне) л	Мийка зовнішньої частини обладнання л	Мийка внутрішньої частини обладнання л	Мийка обладнання (CiP) л	Сумарний об'єм розчину л
Миючий лужний засіб для обладнання (SUPRA б/п)	-*	-	-	-	-	2088	540	2628
Миючий кислотний засіб для обладнання (Foxcid)	-*	-	-	-	-	2088	540	2628
Дезінфікуючий засіб: Бланідас Марка А	100	115	14	22	4	-	-	155

Закінчення таблиці 5.5

Дезінфікуючи й засіб Бактіфоам	100	115	13	21	4	-	-	153
--------------------------------------	-----	-----	----	----	---	---	---	-----

* Зазначені миючі засоби використовуються тільки для миття обладнання, і розрахунки їх використання базуються на об'ємі апаратів

Таблиця 5.6

Характеристика обраних дезінфікуючих розчинів для приміщення виробничої лінії інокулянту для нуту

Назва засобу	Склад г/л	Антимікробна дія	Характеристика	Сумісність з оброблюваними поверхнями	Спосіб застосування (концентрація робочого розчину)	Відомості про державну реєстрацію	Вартість грн/л	Джерело
<i>Засоби для дезінфекційної обробки обладнання та робочих поверхонь</i>								
«Бактофом»	дидецилдиметиламоній хлорид – 6,93–7,30, вода та катіонні ПАВ 7%	Бактерії, віруси, гриби, спори (подовження експозиція)	Рідкий миючо-дезінфікуючий засіб на основі ЧАС, робочі розчини препарату підходять як для дезінфекції так і для стерилізуючої обробки.	Добре змішується з водою. Рекомендується використовувати для обладнання, виготовленого зі нержавуючої сталі, алюмінію, оцинкованого заліза, емалі, гуми.	розчини препарату з концентрацією 0.5-1.5% готують розведенням концентрату питною водою безпосередньо перед використанням. Термін зберігання робочого розчину 7 діб	України Наукового центру превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя Міністерства охорони здоров'я України від 08.12.2020 №12.2-18-5/27592 до 16.02.2026	222 грн	[55]

Закінчення таблиці 5.6

<i>.Бланідаз</i> <i>Марка А</i>	1-бром-3-хлор-5,5-диметилгідантоїн (20,0-22,0%) 5,5 диметилгідантоїн натрію, триполіфосфат, поверхнево-активні речовини інгібітори корозії, кухонна сіль (до 100%)	Бактерії, віруси, гриби, спори (підвищена концентрація)	Дезінфікуючий засіб «Бланідаз (Blanidas®)», марка А — порошок білого кольору з жовтуватим відтінком, може продаватися як в таблетованій так і в порошкоподібній формі	Робочі розчини не чинять карозійної дії на вироби з нержавуючої сталі або скла, але можуть залишати розводи	Застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації 0.5%. Способи обробки: ручний, механізований	Державна установа "Інститут медицини праці НАМН України", висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 12.2-18-5/5657 від 19.03.2020 р. до 15.07.2025	476	[54]
--	---	--	--	--	---	--	------------	-------------

Таблиця 5.7

Об'єм використання та вартість мийних та дезінфікуючих засобів для приміщення з виробництва інокулянту під нут

Назва мийного/дезінфікувального засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ²	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
1	2	3	4	5	6	7	8
SUPRA б/п (Вода гідроксид натрію, 10-15% неіоногенні ПАР, барвник, піногасник) [55]	Обладнання (внутрішнє)	2	8010 (м ²)л	2628	94	1.88	4940
PRIMA МК (Вода соляна кислота, неіоногенні ПАР не більше 5%)[58]	Обладнання (внутрішнє)	2	8010 (м ²)л	2628	139	2.79	7332

Продовження таблиці 5.7

«Бактифом» дидецилдиметиламоній хлорид – 6,93–7,30, вода та катіонні ПАР 7% [53]	Підлога, металеві поверхні. стіни, робочі	1	1520	153	222	2,22	340
Бланідаз Марка А 1-бром- 3-хлор-5,5- диметилгідантоїн (20,0- 22,0%) 5,5 диметилгідантоїн натрію, триполіфосфат, поверхнево-активні речовини інгібітори корозії, кухонна сіль (до 100%) [54]	Підлога, металеві поверхні, стіни, робочі	0.5	1550	155	476	2,38	370
Дезанол екстра (пероксид водню 50%) [60]	Підлога, металеві поверхні, стіни, робочі	2	1550	155	480	9,6	1382,4

Закінчення таблиці 5.7

ПРОФІ 236 (лужний засіб рН 14) [59]	Обладнання (внутрішнє)	2	8010 (м ²)л	2628	109	2.18	5729
Бланідаз Марка А 1-бром-3-хлор-5,5-диметилгідантоїн (20,0-22,0%) 5,5 диметилгідантоїн натрію, триполіфосфат, поверхнево-активні речовини інгібітори корозії, кухонна сіль (до 100%) [54]	Підлога, стіни, металеві робочі поверхні,	0.5	1550	155	476	2,38	370

Висновок:

Виходячи із площі приміщення, об'ємів та площі апаратів загалом за весь період виробництва буде використано 4 засоби, Акваклін СП, як кислотний миючий засіб, Supra б/п як лужний миючий засіб, Бактофом та бланідас Марка А як дезінфікуючі засоби, які будуть змінюватися кожні 2 тижні.

Загальний об'єм робочих миючих та дезінфікуючих розчинів складає 5565 л на загальну вартість 8540 грн

5.4. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.

Для культивування *Mesorhizobium ciceri* ND-64 згідно джерела [20] використовується середовище наступного складу:

Таблиця 5.8

Склад поживного середовища для культивування *Mesorhizobium ciceri*
ND-64

Компонент середовища	г/л
(NH ₄)SO ₄	1
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
CaCO ₃	1
Сахароза	10
Гороховий бульйон (100г/л гороху)	1000

. 5.4.1 Обґрунтування приготування горохового бульйону

Ціллю приготування горохового бульйону є екстракція водорозчинних поживних речовин (Водорозчинного крохмалю, вітамінів, вільних цукрів, вільних амінокислот) з колотого гороху, тому варто зберігати саме співвідношення сухого гороху до фінального об'єму інокульованого поживного середовища, а об'єм води що використовується для варіння гороху, може бути змінним, але не має бути меншим за співвідношення гороху до води 1:5 для запобігання перенавантаженню фільтрувальних системи, високою концентрацію зважених часточок в бульйоні. Також відомо, що вологість звареного гороху становить 65% [61]., вирогідніше за все вологість сухого колотого гороху становить в межах 10% тобто під час варіння 1 г гороху поглинає $(0.65/(1-0,65))*0.9 = 1.67$ г води, тобто при варінні 1815 г гороху, буде поглинуто $(1815*1,67) = 3031$ г води, при варінні гороху для стадії

культивування посівного матеріалу в інокулятор об'ємом 30 л, відповідно для етапу культивування в колбах на качалках буде поглинуто 303,1 г води, а для виробничої ферментації ($16\ 500 \cdot 1,67 = 27\ 555$) 27 555 г води. Виходячі з цього розрахунку, необхідно враховувати додатковий об'єм води під час приготування горохового бульйону.

Для приготування горохового бульйону береться наважка колотого сухого гороху з розрахунку робочого об'єму ферментера, наприклад для інокулятора об'ємом 30 л за об'ємом інокульованого середовища 18.15 л це складає 1815 г або 10% м/об фінального середовища та вариться протягом 40 хв при 95-100°C в об'ємі води де співвідношення гороху до води є 1:7 або 1815 г гороху на 12700 мл води, після чого при перемішуванні через верхній патрубок відбувається через трубу діаметром 50 мм та ситами «грубого очищення» 0.5 мм [62], «середнього очищення» з діаметром пор 0.1 мм [63] та «тонкого очищення» з діаметром пор 5 мкм [64]

Багатоступенева система очистки горохового бульйону необхідна для унеможливлення утворення осаду з крохмалю, лушпіння та інших твердих часточок у реакторі стерилізаторі та ферментері та насосі відцентрової дії. Наявність органічного осаду під час стерилізації може бути перешкодою для якісного проведення процесу стерилізації через те, що осад під час перемішування може осідати в грудки на дні ємності, або на стінках реактора утворюючи стійкі конгломерати частинок що мають набагато нижчу теплопровідність і при температурі 112°C не повністю стерилізуються, а в рамках технологічного процесу підвищення температури стерилізації не є можливим, оскільки в гороховому бульйоні міститься широкий спектр термолабільних компонентів (вітаміни, вільні амінокислоти, цукри), які при підвищенні температури можуть деградувати.

5.5.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.

Композиція А

Враховуючі той факт, що для композиції Б, В та Г закладається по 100 мл рідини, таким чином дізнаємося необхідну кількість горохового бульйону, яку необхідно приготувати:

$$1815 - 300 = 1515 \text{ мл}$$

Як відомо з *таблиці 5.3* для цієї стадії одержання посівного матеріалу необхідно приготувати 1.815 літри поживного середовища, для такої кількості поживного середовища необхідно приготувати гороховий бульйон на основі 181,5 г гороху (10% від фінального об'єму). Для визначення кількості води необхідної для варіння бульйону необхідно врахувати наступні показники: коефіцієнт випарювання 5% (закрита тара), та вологопоглинання гороху під час варіння

Тож для приготування горохового бульйону необхідно:

$$1515 + (1515 * 0,05) + (181,5 * 1,67) = 1893 \text{ мл води} \approx 1900 \text{ мл}$$

В ємність з нержавіючої сталі об'ємом 5 л заливають 1900 мл води водопровідної відібраної мірним циліндром об'ємом 2 літри, ставлять на лабораторну електроплитку та користуючись лабораторним термометром чекають нагріву води до $95^{\circ}\text{C} \pm 3$, подають 181,5 г гороху сухого колотого в ємність з водою та варять протягом 40 хв. Фільтрують через сита з діаметром пор 0.5 мм та 0.1 мм, отриманий бульйон в отриманий бульйон подають наважку сахарози 18,15 г та зливають у колбу об'ємом 3 л та стерилізують за наступних умов: 112°C протягом 30 хв при надлишковому тиску 0.05 МПа.

Підготовка та стерилізація композиції Б

Композиція Б складається з фосфорних солей K_2HPO_4 , KH_2PO_4 в рамках процесу культивування посівного матеріалу в колбах на качалках ці солі будуть стерилізовані окремо, через потенційну реакційну здатність з солями

Mg^{2+} з подальшим утворенням осаду. Для цього етапу наважки солей по 0,9 г кожна будуть стерилізуватися в колбах в автоклаві у вигляді розчину об'ємом 100 мл за наступних умов стерилізації 131°C протягом 40 хв.

Підготовка та стерилізація композиції В

Композиція В складається з наважок солей 1.815 г $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0.36 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, вони будуть стерилізовані в колбі в автоклаві у вигляді розчину об'ємом 100 мл при наступних умовах стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

Підготовка та стерилізація композиції Г

Композиція Г складається з 1.815 грамів CaCO_3 ця соль не може бути стерилізована з іншими солями ні при яких умовах, через свою наднизьку розчинність у воді, тому ця сіль виведена в окрему композицію і буде стерилізована у вигляді 100 мл розчину в автоклаві при наступних умовах стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

Таблиця 5.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі 1815мл г/л	Композиц ія	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Сухий колотий горох	100	181,5	А	1.515
Сахароза	10	18,15		
вода	1515			
KH ₂ PO ₄	0.5	0.9	Б	0.1
K ₂ HPO ₄	0.5	0.9		
вода	100			
(NH ₄)SO ₄	1	1.815	В	0.1
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2	0.36		
вода	100			
CaCO ₃	1	1.815	Г	0.1
вода	100			

5.5.2 Приготування поживного середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 літрів

Для приготування поживного середовища об'ємом 16,335 л необхідно приготувати та стерилізувати наступні композиції поживного середовища

Композиція А

Враховуючі той факт, що для композиції Б та В закладаються в сумі з 300 мл рідини, таким чином дізнаємося необхідну кількість горохового бульйону, яку необхідно приготувати (враховуючи конденсат):

$$16\,335 - 300 = 16,035 / 1,1 = 14\,577 \text{ мл або } 14,58 \text{ л до стерилізації}$$

Як відомо з *таблиці 5.4* для цієї стадії одержання посівного матеріалу необхідно приготувати 16,335 л поживного середовища, для такої кількості поживного середовища необхідно приготувати гороховий бульйон на основі 1815 г гороху (10% від фінального об'єму). Для визначення кількості води необхідної для варіння бульйону необхідно врахувати наступні показники: коефіцієнт випарювання 5% (закрита тара), та вологопоглинання гороху під час варіння

Тож для приготування горохового бульйону необхідно:

$$(14\,577 + (1815 \cdot 1.67)) / 0,95 = 18,53 \text{ л води}$$

В харчоварильний котел об'ємом 30 л заливають 18,53 л води водопровідної, та чекають нагріву води до $95^{\circ}\text{C} \pm 3$, подають 1815 г гороху сухого колотого в харчоварильний котел з водою та варять протягом 40 хв при постійному перемішуванні. Після чого необхідно відфільтрувати бульйон від зважених часточок, після закінчення варіння додають наважку сахарози 181,5 г перемішують розчин ще 5 хв та зупиняють мішалку після чого очікують 5-10 хв для того щоб всі зважені часточки осіли, після чого запускають відцентровий насос і через патрубок що знаходиться на рівні 20 см від дна харчоварильного котла починають перекачку бульйону в реактор стерилізатор. В патрубку встановлена серія фільтрів-сит з діаметром пор 0.5

мм та 0.1 мм а також рідинний фільтр з діаметром пор 5 мкм. Перекачений бульйон в реакторі стерилізаторі стерилізують за наступних умов: 112°C протягом 30 хв при надлишковому тиску 0.05 МПа.

Композиція Б

Композиція Б складається з 9,1 г KH_2PO_4 , 9,1 г K_2HPO_4 , 18,15 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та буде стерилізована в колбі у вигляді розчину об'ємом 200 мл з доведенням рН 6% розчином HCl для запобігання реакції між фосфорними солями та солями магнію в умовах підвищеного тиску та температури під час стерилізації, колба з розчином стерилізується в автоклаві при температурі 130°C на 40 хвилин

Композиція В

Композиція В складається з 18,15 г CaCO_3 ця соль не може бути стерилізована з іншими солями ні при яких умовах, через свою наднизьку розчинність у воді, тому ця сіль виведена в окрему композицію і буде стерилізована у вигляді 100 мл розчину в автоклаві при наступних умовах стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

Таблиця 5.10

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 з робочим об'ємом 18.15 л та об'ємом поживного середовища 16,335 л

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі мл г/л	Композиція	Об'єм композиції, л
Горохове борошна	100	1815	А	16,035
Сахароза	10	181,5		
вода	14,58 л			
конденсат	1,458 л			
КН ₂ РO ₄	0.5	9.1	Б	0.2
К ₂ НРO ₄	0.5	9.1		
(NH ₄)SO ₄	1	18.15		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2	3,6		
вода	200			
CaCO ₃	1	18,15	Г	0.1
вода	85			

5.5.3 Приготування поживного середовища для виробничої ферментації об'ємом 300 літрів

Для приготування поживного середовища об'ємом 148,5 літрів необхідно приготувати та стерилізувати наступні композиції поживного середовища

Композиція А

Враховуючі той факт, що для композиції Б та В закладаються в сумі з 300 мл рідини, таким чином дізнаємося необхідну кількість горохового бульйону, яку необхідно приготувати (враховуючи конденсат):

$$148,5 - 2 = 146,5 / 1,1 = 133,3 \text{ л}$$

Як відомо з *таблиці 5.5* для виробничого культивування необхідно приготувати 146,5 л поживного середовища, для такої кількості поживного середовища необхідно приготувати гороховий бульйон на основі 16,5 кг гороху (10% від фінального об'єму). Для визначення кількості води необхідної для варіння бульйону необхідно врахувати наступні показники: коефіцієнт випарювання 5% (закрита тара), та вологопоглинання гороху під час варіння. Тож для приготування горохового бульйону необхідно:

$$(133,3 + (16,5 * 1,67)) / 0,95 = 169,19 \text{ л води}$$

В харчоварильний котел об'ємом 200 л заливають 169,19 л води водопровідної, та чекають нагріву води до $95^{\circ}\text{C} \pm 3$, подають 1815 г гороху сухого колотого в харчоварильний котел з водою та варять протягом 40 хв при постійному перемішуванні. Після чого необхідно відфільтрувати бульйон від зважених часточок, після закінчення варіння додають наважку сахарози 1,65 кг перемішують розчин ще 5 хв та зупиняють мішалку після чого очікують 5-10 хв для того щоб всі зважені часточки осіли, після чого запускають відцентровий насос і через патрубок що знаходиться на рівні 20 см від дна харчоварильного котла починають перекачку бульйону в реактор стерилізатор. В патрубку встановлена серія фільтрів-сит з діаметром пор 0.5 мм та 0.1 мм а також рідинний фільтр з діаметром пор 5 мкм. Перекачений

бульйон в реакторі стерилізаторі стерилізують за наступних умов: 112°C протягом 30 хв при надлишковому тиску 0.05 МПа.

Композиція Б

Композиція Б складається з 82,5 г KH_2PO_4 , 82,5 г K_2HPO_4 , 165 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 33 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та буде стерилізована в колбі у вигляді розчину об'ємом 1 л з доведенням рН 6% розчином HCl для запобігання реакції між фосфорними солями та солями магнію в умовах підвищеного тиску та температури під час стерилізації, колба з розчином стерилізується в автоклаві при температурі 130°C на 40 хвилин

Композиція В

Композиція В складається з 165 г CaCO_3 ця соль не може бути стерилізована з іншими солями ні при яких умовах, через свою наднизьку розчинність у воді, тому ця сіль виведена в окрему композицію і буде стерилізована у вигляді 100 мл розчину в автоклаві при наступних умовах стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

Таблиця 5.11

Композиції стерилізації компонентів поживного середовища для виробничого культивування в ферментері об'ємом 300 літрів з робочим об'ємом 165 л та об'ємом поживного середовища 148,5 л

Компонент	Концентрація, г/л	Вміст в поживному середовищі г/л	Композиція	Об'єм композиції, л
1	2	3	4	5
Горохове борошно	100	16,5 (кг)	А	146,5
Сахароза	10	1,65 (кг)		
вода	133,3			
конденсат	13,2			
КН ₂ РО ₄	0.5	82,5	Б	1
К ₂ НРО ₄	0.5	82,5		
(NH ₄)SO ₄	1	165		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2	33		
вода	750*			
CaCO ₃	1	165	В	1
вода	850*			

*кількість води була врахована з потенційним заміщенням об'єму солями

5.6 Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів

5.6.1 Підготовка та стерилізація розчину піногасника

Оскільки технологічний процес культивування *Mesorhizobium ciceri* ND-64 передбачає використання середовища основою якого є гороховий бульйон, то високий рівень утворення піни на межі поділу фаз є передбачуваним, тому необхідно підготувати стерильний розчин піногасника, задля використання під час культивування. Піногасник SILFOAM® SE 4260 має бути внесений у концентрації 0.2% від об'єму середовища. Для культивування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л (18,15л середовища) необхідно стерилізувати $(18,15/100 \cdot 0.2 = 36,3)$ 36,3 г піногасника. Для зручності буде стерилізовано 50 г піногасника в колбі об'ємом 100 мл. Для виробничого культивування необхідно приготувати $(165/100 \cdot 0.2 = 330)$ 330 г піногасника, для зручності буде стерилізовано 400 мл в колбі об'ємом 1000 мл стерилізація буде відбуватися в автоклаві за наступних умов 130°C 60 хв 0.15 МПа.

5.6.2 Обґрунтування та підготовка з стерилізацією 6% розчину NaOH

Лужний титруючий агент в рамках технологічної схеми необхідний для доведення рН до діапазону 6.8-7.2 після стерилізації та внесення підкисленого розчину солей (композиція Б). Оскільки середовище має потенційно високу буферність через вміст фосфорних солей KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , та горохового бульйону який є складним органічним субстратом, то пропонується створення лужного титруючого агента 6%-го розчину NaOH, з розрахунку 4 мл на 1 л середовища для виробничої ферментації, та 3 мл розчину на 1 л середовища для створення посівного матеріалу, через зменшений час культивування і тим самим меншу кількість спожитих цукрів і менший рівень закислення середовища.

5.6.2.1 Розрахунок кількості приготування 6% розчину NaOH для культивування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л

В інокуляторі об'ємом 30 л буде знаходитися на момент початку культивування 18.5 л культуральної рідини, як було зазначено в *підрозділі 5.3.2* необхідно підготувати 3 мл 6%-го розчину NaOH на 1 л середовища, з цього отримуємо:

$$3 \cdot 18.5 = 55,5 \text{ мл } 6\text{-го розчину NaOH}$$

Для зручності приготування титруючих агентів і зважаючи на їх малий об'єм пропонується приготувати 100 мл розчину 6%-го розчину NaOH

Стерилізація буде відбуватися в колбі об'ємом 200 мл при наступних умовах стерилізації 131°C 40 хв 0,15 МПа

5.6.2.2 Розрахунок кількості приготування 6% розчину NaOH для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 300 л

В інокуляторі об'ємом 300 л буде знаходитися на момент початку культивування 165 л культуральної рідини, як було зазначено в *підрозділі 5.3.2* необхідно підготувати 4 мл 6%-го розчину NaOH на 1 л середовища, з цього отримуємо:

$$3 \cdot 165 = 495 \text{ мл } 6\text{-го розчину NaOH}$$

Для зручності приготування титруючих агентів і зважаючи на їх малий об'єм пропонується приготувати 500 мл розчину 6%-го розчину NaOH

Стерилізація буде відбуватися в колбі об'ємом 500 мл при наступних умовах стерилізації 131°C 40 хв 0,15 МПа

5.6.3 Обґрунтування Приготування 6%-го розчину HCl

6% розчин HCl виступає кислотним титруючим агентом і необхідний лише для підкислення композиції солей (композиції Б) до значення рН 4, для етапів приготування поживного середовища для створення посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 30 л та виробничої ферментації в ферментері об'ємом 300 л. 6% розчин HCl буде приготований з розрахунку що 2 мл % розчину підкислюють 1 л середовища. Як відомо за *таблиці 5.4* об'єм композиції Б для культивування посівного матеріалу складає 200 мл, та з

таблиці 5.5 відомо що об'єм композиції Б для виробничого культивування складає 1 л, таким чином загалом для 1 циклу культивування необхідно $2 * 1.2 = 2.4$ мл 6% розчину HCl, виходячи з невеликого об'єму пропонується приготувати його 1 раз на весь сезон виробництва (9 циклів), таким чином отримуємо $2,4 * 9 = 21,6$ мл, для зручності виробничих процесів пропонується приготувати 30 мл 6% розчину HCl.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ІНОКУЛЯНТУ ПІД НУТ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки підготовчих робіт та виробничого біосинтезу біомаси для інокулянту під нут

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Матеріал: нержавіюча сталь, діаметр 100 мм, виробник «Navyflex» Польща, назва «NavyFlex VLB100» [65]
ФГО-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Матеріал: вологостійкий полімерний, розміри 594 x 594 x 95 мм, пропускна здатність 4250 м ³ год ⁻¹ , назва «AmAir 300 GT», назва виробника «AAF international». Клас очистки G4 [66]
К-3	Компресор	1	Матеріал: сталь, назва LZ 10-10, виробник «Atlascopco», допустимий максимальний тиск 10 bar, потужність 10.8 м ³ год ⁻¹ [67]
ТО-4	Теплообмінник охолоджувач	1	Промисловий фреоновий охолоджувач повітря фреонового типу, продуктивність 1300 м ³ год ⁻¹ 400x500x200 мм розмір, назва «С-ФКО-40-20», виробник ТОВ «смайткомплект» [68]

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум	Підпис	Дата					
Розроб.		Висоцький О.І.			РОЗДІЛ 6: СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ІНОКУЛЯНТУ ПІД НУТ	Літ.	Лист	Листів	
Перевір.		Красінько В.О.					1	5 94	
Реценз.						НУХТ			
Н. Контр.									
Затверд.		Стадніков В.П.							

РС-5	Ресивер	1	Максимальний робочий тиск 11,5 бар Вага ресивера - 167 кг Діаметр ресивера - 600 мм Висота ресивера - 2110 мм Об'єм 500 л[69]
ТН-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник Roen Est трирядний 90-50 робочий тиск: 1,6 МПа; Максимальна продуктивність: 8 100 м3/год габаритні розміри, мм: 960x560x200 [70].
Ф-7	Головна фільтр-система очистки	1	Панельний фільтр класу М5, матеріал скловолокно (Dust Stop, Hydro Stop і Paint Sto), Фільтр вугільний тонкої очистки F7 Meltem M-WRG-II FK класу F7[71].

Продовження таблиці 6.1

Ф-8	Фільтр тонкої очистки	1	АНФ 600*600*120 Н11 НЕРА Filter, фільтрувальний матеріал скловолокно, клас фільтрування Н11[72]
ДЗ-9	Ваговий дозатор для гороху	1	Ваги технічні, максимальна вага для зважування 10 кг [73]
КП-10	Котел харчоварильний 30 л	1	Котел Пщеварковий кпе-30, об'єм 30 л, електричний нагрів, датчик температури [74]
Ф-11 Ф-18	Система фільтрів для горохового бульйону	2	Фільтр сито, діаметр пор 0.5 мм [62] Фільтр сито діаметр пор 0.1 мм, [63] фільтр сито діаметр пор 5 мкм. [64]
Н-12	Відцентровий насос для перекачування горохового бульйону в реактор-стерилізатор	1	Підйомна сила 2 метри, швидкість потоку 4-6 л/хв [75]
Р-13	Реактор-змішувач-стерилізатор для стерилізації композиції А об'ємом 30 л	1	Реактор «Techfore» об'ємом 30 літрів, без додаткового оснащення для проведення ферментаційних процесів Висота: 646 мм Діаметр: 250 мм Парова сорочка до 150°C Температура стерилізації до 130°C [76]

Продовження таблиці 6.1

ІН-14	Інокулятор об'ємом 30 літрів	1	Інокулятор «Techfore S-30» Об'єм 30 л Робочий об'єм 20 л Висота: 646 мм Діаметр: 250 мм Парова сорочка до 150°C Температура стерилізації до 130°C Максимальна швидкість мішалки 600 об/хв [76]
ІФ-15	Індивідуальний фільтр для інокулятора об'ємом 30 л	1	Фільтр картриджний з діаметром пор 0.2 мкм. [77]
ДЗ-16	Ваговий дозатор для зважування гороху для виробничого культивування	1	Ваги технічні, максимальна допустима вага 20 кг [78]
КП-17	Котел харчоварильний 200 л	1	Котел об'ємом 200 л Довжина 1150 мм Ширина 800 мм Висота 850 мм [79]

Н-19	Відцентровий насос для перекачування горохового бульйону в реактор-стерилізатор	1	Насос Pico 600 Продуктивність 600 л/хв[80]
Р-20	Реактор-змішувач-стерилізатор для стерилізації композиції А об'ємом 300 л	1	Реактор «Techfore 300» без додаткового оснащення для проведення ферментаційних процесів Висота: 1600 мм Діаметр: 500 мм Парова сорочка до 150°C Температура стерилізації до 130°C [49]
Н-21	Перистальтичний насос для перекачування стерильної композиції А з реактора стерилізатора до ферментера	1	Перистальтичний насос з регульованою потужністю від 0.12 до 3300 л/год [81]
ФР-22	Ферментер об'ємом 300 літрів	1	Ферментер «Techfore 300» Об'єм 300 л Робочий об'єм 200 л Висота 1600 мм Діаметр 500 мм Сорочка та ємність здатні підтримувати режим стерилізації до 150°C Максимальна швидкість обертів мішалки: 600 об/хв [49]
ІФ-23	Фільтр індивідуальної очистки повітря ферментера	1	Aervent® 0.2 µm, Cartridge, матеріал гідрофобне скловолокно, діаметр пор 0.2 мкм, внутрішній об'єм 5 л. Країна виробник: Німеччина

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БЮДОБРИВА ПІД НУТ НА ОСНОВІ *MEZORHIZOBIUM CICERI* ND-64

Технологічна схема біосинтезу інокулянту під нут включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, очистка та стерилізація обладнання, приготування та стерилізація допоміжних розчинів та приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – підготовка посівного матеріалу та виробниче культивування *Mesorhizobium ciceri*.

ДР 1 Підготовка та очистка атмосферного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирається через вертикальну трубу з повітрозабірником (ПЗ-1), розташованим на висоті $H = 13$ м, що на 3 метри вище за найвищу точку даху виробничого цеху.

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Попереднє очищення повітря здійснюється за допомогою тканинного фільтра грубого очищення (ФГО-2), який забезпечує ефективність очищення $E = 90\%$ і затримує частинки діаметром понад 20 мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря в компресорі

Для забезпечення аерації, подолання гідравлічного тиску рідини у ферментері та інших виробничих потреб, повітря стискають у компресорі (К-3), що призводить до його нагрівання до 120-200 °С при тиску 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря в теплообміннику та видалення вологи

Стиснене повітря з ДР 1.3 охолоджується до температури 25-30 °С в теплообміннику-осушувачі (ТО-4)

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум	Підпис	Дата			
Розроб.	Висоцький О.І.				РОЗДІЛ 7: ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БЮДОБРИВА ПІД НУТ НА ОСНОВІ <i>MEZORHIZOBIUM</i> <i>CICERI</i> ND-64	Лім.	Лист
Перевір.	Красінько В.О.						Листів
Реценз.							1
Н. Контр.							1099
Затверд.	Стадніков В.П.					НУХТ	

ДР 1.5. Видалення вологи в ресивері

Після чого використовується ресивер (РС-5), який також усуває пульсації повітряного потоку, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів.

ДР 1.6. Стабілізація показників повітря

В теплообміннику нагрівачі (ТН-6) стабілізація показники повітря стабілізуються температура повітря на виході складає 50°C та рівень вологості 70%

ДР 1.7 Очищення в головному фільтрі

З ресиверу повітря подається через групу фільтрів тонкої очистки (Ф7-Ф8), що затримує 99% часток розміром більше 0.2 мкм, після чого повітря подається на індивідуальні фільтри посівного апарату та ферментера.

ДР 1.8 Очищення в індивідуальних фільтрах

Після чого повітря подається на індивідуальні фільтри посівного апарату та ферментера, де повітря проходить остаточну очистку на індивідуальних фільтрах тонкої очистки (ІФ-15, ІФ-23)

ДР 2 Підготовка та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 2.1 Приготування та стерилізація розчину піногасника

ДР 2.1.1 Приготування та стерилізація піногасника для створення посівного матеріалу

На лабораторних вагах у відтарованій колбі об'ємом 250 мл зважують 50 г піногаснику після чого щільно закривають колбу ватно-марлевым короком та ставлять в автоклав на стерилізацію за температури 131 °C протягом 40 хв.

ДР 2.1.2 Приготування та стерилізація піногасника для виробничого культивування

На лабораторних вагах у відтарованій колбі об'ємом 1 л зважують 330 г піногаснику після чого щільно закривають колбу ватно-марлевым короком та ставлять в автоклав на стерилізацію за температури 131 °C протягом 40 хв.

ДР 2.2. Приготування 6%-го розчину HCl

Для приготування 30 мл 6% розчину *HCl* необхідно в асептичних умовах за допомогою мірного циліндру відібрати 25 мл стерильної дистильованої води, після в рукавичках піпеткою відібрати в асептичних умовах 5 мл розчину 36% соляної кислоти та поступово подати в зазначену стерильну колбу з водою, після повного внесення розчину закрити колбу притертою кришкою та ретельно перемішати обертовими рухами.

ДР 2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 2.3.1 Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для культивування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 30 л.

Для приготування 100 мл 6%-го розчину NaOH необхідно на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані відважити 6 г безводного NaOH, після чого переставити стакан з наважкою на магнітну мішалку і при включеній магнітній мішалці додати 30-50 мл води дистильованої очікуючи повного розчинення NaOH. Після повного розчинення наважки розчин зі стакану переливають у мірний циліндр об'ємом 100 мл та доводять дистильованою водою до 100 мл, після чого розчин переливають у колбу об'ємом 200 мл, закривають ватно-марлевым короком та ставлять на стерилізацію в автоклав за температури 131°C протягом 40 хв.

ДР 2.3.2 Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для виробничої ферментації в ферментері об'ємом 300 л

Для приготування 500 мл 6%-го розчину NaOH необхідно на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані відважити 30 г безводного NaOH, після чого переставити стакан з наважкою на магнітну мішалку і при включеній магнітній мішалці додати 200 мл води дистильованої очікуючи повного розчинення NaOH. Після повного розчинення наважки розчин зі стакану переливають у мірний циліндр об'ємом 500 мл та доводять дистильованою водою до 500 мл, після чого розчин переливають у колбу

об'ємом 1000 мл, закривають ватно-марлевим короком та ставлять на стерилізацію в автоклав за температури 131°C протягом 40 хв.

ДР 3 Підготовка та стерилізація поживного середовища

ДР 3.1 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування в колбах на качалках

ДР 3.1.1 Приготування і стерилізація композиції А для культивування в колбах на качалках

На технічних лабораторних вагах відважують 181,5 г сухого гороху та 18,15 г сахарози. В нержавіючу ємність об'ємом 5 л наливають 1.9 л води водопровідної відібраної мірним циліндром об'ємом 2 літри та ставлять на лабораторну електроплитку та користуючись лабораторним термометром чекають нагріву води до 95°C±3, після чого беруть наважку сухого гороху 181,5 г і висипають її в нержавіючу ємність та варять протягом 40 хв. Після чого використовуючи сита з діаметром отворів 0.5 мм та 0.1 мм, фільтрують попередньо перемішаний гороховий бульйон та зливають 1515 мл, додають 18,15 г сахарози та зливаються у колбу об'ємом 3 літри, , закривають ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав на стерилізацію за наступних умов: 112°C протягом 30 хв

ДР 3.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б для культивування в колбах на качалках

Наважки 0.9 г KH_2PO_4 та K_2HPO_4 зважують на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані та заливають 50 мл води дистильованої очікуючи повного розчинення наважки, після чого розчин зливають у мірний циліндр об'ємом 100 мл та доводять до об'єму 100 мл дистильованою водою, далі розчин зливають у колбу об'ємом 200 мл після чого закривають колбу ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав за наступних умов стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

ДР 3.1.3 Приготування і стерилізація композиції В для культивування в колбах на качалках

Наважки 1.82 г $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ та 0.36 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ зважують на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані та заливають 50 мл води дистильованої очікуючи повного розчинення наважки, після чого розчин зливають у мірний циліндр об'ємом 100 мл та доводять до об'єму 100 мл дистильованою водою, далі розчин зливають у колбу об'ємом 200 мл після чого закривають колбу ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав за наступних умов стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

ДР 3.1.4 Приготування і стерилізація композиції Г для культивування в колбах на качалках

Наважку 1.82 г CaCO_3 зважують на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані та заливають 50 мл води дистильованої обертовими рухами досягають рівномірної оптичної щільності розчин, після чого розчин зливають у мірний циліндр об'ємом 100 мл та доводять до об'єму 100 мл дистильованою водою, далі розчин зливають у колбу об'ємом 200 мл після чого закривають колбу ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав за наступних умов стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

ДР 3.2 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 30 літрів.

ДР 3.2.1 Приготування і стерилізація композиції А для культивування в інокуляторі об'ємом 30 літрів

На технічних вагах (ДЗ-9) відважують 1815 г сухого гороху та 181,5 г сахарози. В харчоварильний котел «КПЕ-30»(КП-10) об'ємом 30 літрів наливають 18,53 л води з виробничого крану з лічильником потоку води, після чого ставлять харчоварильний котел на підігрів вбудованим ТЕНом, та очікують нагрів води до температури 95°C±3 після чого беруть заздалегідь відважену наважку сухого гороху вагою 1,815 кг. Сухий горох варять при

температурі $98^{\circ}\text{C} \pm 3$ протягом 40 хв, після чого зупиняють нагрів та додають 181,5 г сахарози, після 5 хв перемішування припиняють перемішування та очікують 10 хв задля осадження нерозчинних компонентів, далі через патрубок за допомогою відцентрового насосу (Н-12) перекачують композицію А в реактор стерилізатор (Р-13), подаючись в реактор стерилізатор розчин має пройти ситові фільтри з діаметром отворів 0.5 мм, 0.1 мм та рідинний фільтр з діаметром пор 5 мкм (Ф-11), Після повного перекачування композиції А в сорочку апарату середовище нагрівають до 70°C , після чого подають гостру пару в апарат до нагріву до температури 112°C і витримують протягом 30 хв.

ДР 3.2.2 Приготування і стерилізація композиції Б для культивування в інокуляторі об'ємом 30 літрів

Наважки по 9,1 г KH_2PO_4 та K_2HPO_4 , 18,15 г $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ та 3,6 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ зважують на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані та заливають 100 мл води дистильованої очікуючи повного розчинення наважки, після чого розчин зливають у мірний циліндр об'ємом 500 мл та доводять до об'єму 200 мл дистильованою водою, після чого доводять рН розчину 6% соляною кислотою (від ДР 2.2) до рН 4, далі розчин зливають у колбу об'ємом 500 мл після чого закривають колбу ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав за наступних умов стерилізації: 131°C протягом 40 хв

ДР 3.2.3 Приготування і стерилізація композиції В для культивування в інокуляторі об'ємом 30 літрів

Наважку 18,2 г CaCO_3 зважують на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані та заливають 50 мл води дистильованої обертовими рухами досягають рівномірної оптичної щільності розчин, після чого розчин зливають у мірний циліндр об'ємом 100 мл та доводять до об'єму 100 мл дистильованою водою, далі розчин зливають у колбу об'ємом 200 мл після чого закривають колбу ватно-марлевим короком та ставлять в автоклав за наступних умов стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

ДР 3.3 Підготовка та стерилізація поживного середовища для виробничої ферментації

ДР 3.3.1 Приготування і стерилізація композиції А для виробничої ферментації

За допомогою вагового дозатора відважують 16,5 кг сухого гороху та 1,65 кг сахарози. В харчоварильний котел «КПЕ-200»(КП-17) об'ємом 200 літрів наливають 169,2 літрів води з виробничого крану з лічильником потоку води, після чого ставлять харчоварильний котел на підігрів вбудованим ТЕНом, та очікують нагрів води до температури $95^{\circ}\text{C}\pm 3$ після чого беруть заздалегідь відважену на технічних вагах (ДЗ-16) наважку сухого гороху вагою 16,5 кг. Сухий горох варять при температурі $95^{\circ}\text{C}\pm 3$ протягом 40 хв, після чого зупиняють нагрів та додають 1,65 кг сахарози, після 5 хв перемішування зупиняють мішалку та очікують 10 хв задля осадження нерозчинних компонентів, далі через патрубок за допомогою відцентрового насоса (Н-19) перекачують композицію А в реактор стерилізатор (Р-20), подаючись в реактор стерилізатор розчин має пройти ситові фільтри з діаметром отворів 0.5 мм, 0.1 мм та рідинний фільтр з діаметром пор 5 мкм (Ф-18), Після повного перекачування композиції А в сорочку апарату середовище нагрівають до 70°C , після чого подають гостру пару в апарат до нагріву до температури 112°C і витримують протягом 30 хв.

ДР 3.3.2 Приготування і стерилізація композиції Б для виробничої ферментації

Наважки по 82,5 г KH_2PO_4 та K_2HPO_4 , 165 г $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ та 33 г $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ зважують на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані та заливають 500 мл води дистильованої очікуючи повного розчинення наважки, після чого розчин зливають у мірний циліндр об'ємом 1000 мл та доводять до об'єму 1000 мл дистильованою водою, після чого доводять рН розчину 6% соляною кислотою (від ДР 2.2) до рН 4, далі розчин зливають у

колбу об'ємом 2000 мл після чого закривають колбу ватно-марлевым короком та ставлять в автоклав за наступних умов стерилізації: 131°C протягом 40 хв

ДР 3.3.3 Приготування і стерилізація композиції В для виробничої ферментації

Наважку 165 г CaCO_3 зважують на лабораторних вагах у відтарованому мірному стакані та заливають 500 мл води дистильованої обертовими рухами досягають рівномірної оптичної щільності розчин, після чого розчин зливають у мірний циліндр об'ємом 1000 мл та доводять до об'єму 1000 мл дистильованою водою, далі розчин зливають у колбу об'ємом 2000 мл після чого закривають колбу ватно-марлевым короком та ставлять в автоклав за наступних умов стерилізації: 131°C протягом 40 хв.

ТП 4. Підготовка посівного матеріалу

ТП. 4.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну виробничу культуру *Mesorhizobium ciceri* ND-64 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі YMA (дріжджово-манітоловий агар), при температурі 2-4°C. Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1 раз місяць. Всі роботи з колекційною культурою мають проводитися в умовах асептики. Під час кожного пересіву проводять мікроскопію для аналізу морфології клітин.

ТП 4.2. Одержання робочої культури для культивування

Mesorhizobium ciceri ND-64 пересівається зі скошеного YMA на чашку Петрі з YMA методом виснажуючого штриха задля виділення окремих колоній, після чого інкубують у термостаті при 28°C протягом 3-х діб.

ТП 4.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Отримані ізолювані колонії з чашки Петрі (від ТП 4.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним YMA (по одній колонії на пробірку). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті при $t = 28^\circ\text{C}$ (48год).

ТП 4.4. Культивування інокуляту в колбах на качалках.

В асептичних умовах у колбу об'ємом 3 л з стерильною композицією А (від ДР 3.1.1) зливають простерилізовані композиції Б, В, Г (від ДР 3.1.2, ДР 3.1.3., ДР 3.1.4), перемішують і розливають по 150 мл у 12 качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *Mesorhizobium ciceri* ND-64 (від ТП 4.3) вносять 5 мл фіз. Розчину та суспендують клітини з агару, піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію 7-10 мл і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують у термостатичному шейкері (220 об/хв) при $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24-36 год). Проби на оптичну щільність (OD), мікробіологічні аналізи, концентрацію вуглецевого та азотного субстратів проводять до та після культивування.

ТП 4.5. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 30 л

В Реакторі-стерилізаторі (Р-13) з Композицією А (від ДР 3.2.1) що знаходиться на рівні кришки інокулятора об'ємом 30 л (ІН-14) відкривають стерильні комунікації та методом самопливу подають Композицію А (від ДР 3.2.1) чекаючи її повного злиття, далі зливають в асептичних умовах в ємність для стерильної передачі об'ємом 0.5 л розчини композицій Б та В (від ДР 3.2.2., ДР 3.2.3) після чого ємність підключають до інокулятора та через коннектор асептичної перекачки та включають мішалку на швидкості 200 об/хв після чого подають злиті композиції, далі стерильний розчин 6% NaOH (від ДР 2.3.1) в полум'ї пальника подають в попередньо простерилізований бачок для титруючих агентів з написом "Alkali" та підключають стерильні комунікації подачі титруючого агенту через перистальтичний насос в інокулятор, встановлюючи автоматичний режим підтримання рН в діапазоні 6.8-7.1, після чого в асептичних умовах 15 качалочних колб знімають та зливають в попередньо простерилізовану ємність для асептичної перекачки об'ємом 3 л, отримуючи 1815 мл інокулята (від ТП 4.4). Перед подачею інокулята по

стерильним комунікаціям, включають барботер та мішалку, встановлюючи режим подачі повітря $40 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ та регулюють мішалку щоб рівень розчиненого кисню (DO) був на рівні 100%, після чого подають інокулят з ємності асептичної перекачки. Культивують до $OD = 0.6$ при $t = 28^\circ\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 200-600 об/хв для підтримування розчиненого кисню на рівні не меншому за 30% і постійною аерацією 40 літрів повітря на 1 літр середовища год^{-1} впродовж 36 год. (середина експоненційної фази росту). Проби на мікробіологічні аналізи, концентрацію джерела карбону та азоту, а також оптичної щільності відбирають кожні 6 год.

ТП 5 Виробничий біосинтез

ТП 5.1 Виробниче культивування *M. cireri* ND-64

З Реактора-стерилізатора (Р-20) з Композицією А (від ДР 3.3.1) композиція перекачується за допомогою перистальтичного насоса в виробничий ферментер (ФР-22), перекачування відбувається при включеній мішалці на рівні 100 об/хв під час перекачування зливають в асептичних умовах в ємність для стерильної передачі об'ємом 3 л розчини композицій Б та В (від ДР 3.3.2., ДР 3.3.3) після чого ємність підключають до ферментера та через коннектор асептичної перекачки та включають мішалку на швидкості 200 об/хв після чого подають злиті композиції, далі стерильний розчин 6% NaOH (від ДР 2.3.1) в полум'ї пальника подають в попередньо простерилізований бачок для титруючих агентів з написом "Alkali" та підключають стерильні комунікації подачі титруючого агенту через перистальтичний насос в інокулятор, встановлюючи автоматичний режим підтримання рН в діапазоні 6.8-7.1, наступним етапом є подача інокулята по стерильним комунікаціям, включають барботер та мішалку, встановлюючи режим подачі повітря $40 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$ та регулюють мішалку щоб рівень розчиненого кисню (DO) був на рівні 100%, після чого подають інокулят подають з інокулятора за допомогою труби перетискування. Культивують до $OD = 2$ при $t = 28^\circ\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 200-600 об/хв для підтримування розчиненого

кисню на рівні не меншому за 30% і постійною аерацією 40 літрів повітря на 1 літр середовища год⁻¹ впродовж 72 год. (середина експоненційної фази росту). Проби на мікробіологічні аналізи, концентрацію джерела карбону та азоту, а також оптичної щільності відбирають кожні 6 год. Після закінчення культивування беруть пробу на визначення життєздатності культури у вигляді КУО/мл.

РОЗДІЛ 8. ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ПРИГОТУВАННЯ ТОВАРНОЇ ФОРМИ ІНОКУЛЯНТУ ПІД НУТ НА ОСНОВІ *M. CICERI* ND-64

Мікробні інокулянти, особливо ті, що містять азотфіксуючі ризобії, є «наріжним каменем» сталого сільського господарства, пропонуючи альтернативу синтетичним хімічним добривам та покращуючи якість ґрунту. Хоча традиційні інокулянти на основі носіїв (з використанням таких матеріалів, як торф або лігніт) використовуються десятиліттями, вони часто мають обмеження, такі як короткий термін зберігання (зазвичай близько шести місяців), зменшення популяції мікробів з часом, чутливість до високих температур та УФ-випромінювання, а також громіздке внесення в польових умовах. Щоб подолати ці проблеми, рідкі препарати біоінокулянтів стали перспективною і часто кращою технологією. Рідкі препарати мають кілька переваг, зокрема потенційно довший термін зберігання, вищу та стабільнішу кількість мікробів (часто починаючи з 10^9 КУО/мл або вище), легше використання та внесення (наприклад, через обприскувачі або фертигацію), а також можливість додавати мікро та макро елементи безпосередньо до мікробної суспензії.

8.1 Характеристика та практика використання консервуючих та протекторних агентів для довготривалого зберігання життєздатної суспензії бактерій

1) Згідно даних наукових джерел, особливо в східних країнах, де сільське господарство та агропромисловість займає велику частину економічної та соціальної стабільності, широко досліджуються можливості продовження терміну зберігання рідких інокулянтів. Автори в дослідженні [83]

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>. № докум</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Висоцький О.І.</i>			РОЗДІЛ 7: ОСНОВНІ ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ ТА ПРИГОТУВАННЯ ТОВАРНОЇ ФОРМИ ІНОКУЛЯНТУ ПІД НУТ НА ОСНОВІ <i>M.</i> <i>CICERI ND-64</i>	<i>Лім.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Красінько В.О.</i>					1	4110
<i>Реценз.</i>						<i>НУХТ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

протестували різні комбінації з наступних протекторних сполук PVP = полівініл піролідон; PEG = поліетиленгліколь; GA = гуміарабік; SA = натрій альгінат; і дійшли висновку, що комбінація з 0.5% гліцеролу та 0.5 полівініл піролідону є найкращою та дозволяє підтримувати концентрацію життєздатних клітин на достатньому рівні ($\geq 1 \cdot 10^9$) протягом 180 днів зберігання при температурі 28°C.

2) Інші автори, які досліджували це питання [84] дійшли висновку, що найкраща комбінація протективних сполук є трегалоза в концентрації 10 мМ на літр та полівінілпіролідон у концентрації 2%. Така комбінація продовжила зберігання клітин на достатньому рівні ($\geq 1 \cdot 10^8$) протягом 11-12 місяців при температурі 28°C.

3) В 2019 році було досліджено вплив різних сполук на зберігання та активність інокулянту на базі *Sinorhizobium melioli*, що представляє особливий інтерес з точки зору даного курсового проєктування оскільки *Mesorhizobium ciceri* та *Sinorhizobium melioli* є бактеріями одного роду і обидві використовуються як інокулянт для бобових. Авторами дослідження було зазначено, що концентрація гліцеролу в кількості 1% дозволила зберегти життєздатність культуральної рідини на рівні $7.81 \cdot 10^8$ КУО/мл, при початковій концентрації $2.56 \cdot 10^9$ КУО/мл після 150 днів зберігання при температурі 22°C [85]

.

4) Дослідження 2023 року дає найбільш розгорнутий протокол для пост-обробки культуральної рідини для довгострокового зберігання рідкої форми інокулянту [85]

. У статті пропонуються різні комбінації протекційних сполук для різних температур зберігання. Загалом було рекомендовано додавати 1% рослинної олії та 2% твин-80 для всіх режимів зберігання. Для 4°C було запропоновано застосовувати диметилсульфоксид у концентрації 1.5% та гліцерол у концентрації 1.5%. Для зберігання при температурі 28°C було запропоновано

використовувати 1.5% полівінілпіролідону та 1.5% гліцеролу, але згідно цієї статті після основного культивування бактерії були центрифуговані та переміщені в окреме середовище для зберігання з додавання вище згаданих компонентів, але після 8 місяців зберігання життєздатність всіх досліджуваних культур впала нижче $1 \cdot 10^8$ КУО/мл, що є вже недопустимо низькою концентрацією для комерційного препарату.

Узагальнену інформацію стосовно дослідження ефективності використання різних протекторних сполук для зберігання життєздатності мікробних біопрепаратів на основі біомаси наведено у табл. 8.1.

Таблиця 8.1

**Характеристика протекційних речовин для зберігання
життєздатності культуральної рідини впродовж тривалого часу**

№	Назва протектора [джерело інформації]	Концентрація	Коротка характеристика	Застереження	Джерело
1	2	3	4	5	6
1	Гліцерин	1,5–3%	Кріопротектор, зволоження, стабілізація білків і мембран Зберігання при 4°C, >12 місяців	Несумісний з високою концентрацією солей (CaCl ₂ , FeCl ₃)	[84]
2	Полівінілпіролідон (PVP)	0,5–2%	Зв'язує токсини, запобігає злипанню, адгезив для дражування Поєднання з гліцерином (синергія)	Не змішувати з альгінатом натрію (проблеми з в'язкістю)	[83,84,85]

Закінчення таблиці 8.1

3	Трегалоза	10 мМ	Осмопротектор, стабілізація білків при дегідратації Зберігання при кімнатній температурі (6–12 міс.)	Уникати культуральних рідин з високим вмістом цукру	[84]
4	Гуміарабік	0,3–0,5%	Згущувач, адгезив, захист від висихання Польове застосування (дражування насіння)	Надмірна концентрація зменшує дифузію кисню	[84]
5	Альгінат натрію	0,1–0,5%	Гелеутворення, захист від коливань рН, тривале виживання Формули з повільним вивільненням	Не змішувати з PVP (проблеми з в'язкістю)	[83]
6	Поліетиленгліколь (ПЕГ)	0,5–1%	Уповільнення висихання, покращення прилипання Короткочасне зберігання (3–6 місяців)	Несумісний з ДМСО	[83]
7	Диметилсульфоксид (ДМСО)	1,50%	Кріопротектор, захист від кристалів льоду Зберігання при -20°C або 4°C, >1 року	Токсичний при високих температурах (використовувати тільки при охолодженні)	[85]

Узагальнюючи отримані дані можна прийти висновку, що комбінація з гліцеролу концентрацією 1.5%, який буде виступати кріопротектором при

тривалому зберіганні за низьких температур, 0.5% полівініл піролідону, який зв'язує вільні білки та метаболіти, що поступово будуть з'являтися в бульйоні протягом автолізу клітини під час зберігання та 10 мМ трегалози, яка виступатиме осмопротектором та буде запобігати різким перепадам осмотичного тиску під час створення робочого розчину препарату, що може призвести до загибелі багатьох клітин. Ця комбінація може мати найкращий зберігаючий ефект при зберіганні за температури 4°C, та дозволить виробляти інокулянт, який за правильних умов зберігання може мати заявлену ефективність протягом щонайменше 6-8 місяців. Варто зазначити, що використовувати нативне культуральне середовище може бути недоцільним, оскільки він має велику кількість метаболітів, вплив яких є непередбачуваним на довготривале зберігання готового інокулянту, тож згідно статті [86] пропонується створювати окреме поживне середовище ідентичного складу, але з концентрацією компонентів 75% від концентрації компонентів, що були використані для культивування, але бактерії були попередньо відсепаровані з нативної культуральної рідини. Це більш дорога технологія, але вона дозволяє бути впевненим у стандартних умовах для зберігання партії інокулянтів та дозволяє дозувати біомасу клітин з чіткою концентрацією КУО/мл для кожної партії. Пакування буде відбуватися у 5 л пластикові ПЕТ тари для продажів великим господарствам та у 1 л ПЕТ тари для роздрібного продажу, що будуть попередньо продезінфіковані розчином Бактіфому, та вимиті дистильованою водою.



Рис 8.1 Приклад тари об'ємом 5 літрів для продажу інокулянту оптом



Рис 8.2 Приклад тари об'ємом 1 літр для продажу інокулянту в роздріб

РОЗДІЛ 9: КОНТРОЛЬ ДОПОМІЖНИХ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ТА ВИРОБНИЧОГО КУЛЬТИВУВАННЯ *M.CICERI*

9.1 Визначення концентрації цільового продукту (Біодобрива на основі *Mesorhizobium ciceri*) За допомогою спектрофотометрії. (Експрес метод)

Принцип методу: Полягає у вимірюванні оптичної густини на довжині хвилі світлового потоку у 600 нм, для відстеження розвитку бактеріальної культури у поживному середовищі. Зміна оптичної щільності середовища показує зміну концентрації біомаси, які роблять суспензію оптично більш щільною, і за допомогою побудови калібрувальної кривої, можна відстежити зміну концентрації клітин протягом всього періоду культивування, що дає змогу зрозуміти динаміку росту та розвитку бактеріальної культури та вчасно зупинити культивування. Аналіз бажано робити кожні декілька годин, але не рідше 1 разу на 12 годин. Головним недоліком методу є те, що ним неможливо визначити КУО, а перевага заключається в швидкості та дешевизні аналізу.

Згідно останніх наукових джерел *M. ciceri* на середовищі Луї Бертані при довжині хвилі 600 нм та поглинанні OD = 1 життєздатність орієнтовно дорівнювала $1 \cdot 10^9$ КУО/мл [87]

Перелік необхідних матеріалів:

- Культуральна рідина певної години культивування
- Чисте, незасіяне, поживне середовище
- 2 Кювети 1 см шириною з пластику або скла
- Спектрофотометр здатний працювати в на довжині хвилі 600 нм
- Дистильована вода для очистки кювет

					НУХТ БТЕК 04.02.29 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум	Підпис	Дата				
Розроб.		Висоцький О.І.			РОЗДІЛ 9: КОНТРОЛЬ ДОПОМІЖНИХ ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ТА ВИРОБНИЧОГО КУЛЬТИВУВАННЯ <i>M.CICERI</i>	Літ.	Лист	Листів
Перевір.		Красінько В.О.						1916
Реценз.						НУХТ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Умови проведення дослідження:

1

Побудова калібрувальної кривої концентрації біомаси

2.1 Підготуйте серію культур *M. ciceri* у фазі експоненційного росту ($OD_{600} \approx 0,2-1,2$).

2.2 Для кожної проби виміряйте OD ($\lambda = 600$ нм). Бланк – неінокульоване стерильне середовище.

2.3 Одразу відфільтруйте 20 мл тієї ж самої проби крізь попередньо висушений і зважений фільтр 0,45 μm .

2.4 Промийте фільтр 10 мл 0,85 % NaCl, висушіть при 105 °C до сталої маси (≈ 18 год) і повторно зважте.

Побудуйте графік «суха маса, г/л (ось Y) — OD (ось X)»;

Проведення аналізу

Відберіть 3 мл культуральної рідини з поживного середовища де культивується *M. ciceri* та 3 мл чистого поживного середовища, яке назначалося для культивування *M. ciceri*. Налаштуйте спектрофотометр на 600 нм. Заповніть одну кювету культуральною рідиною, а іншу поживним середовищем. Спочатку встановіть кювету з поживним середовищем у прилад та обнулiть значення щільності на приладі. А потім не змінюючи жодних налаштувань замініть кювету на кювету з культуральною рідиною та запишіть показник. За результатами декількох вимірювань на різних етапах культивування зробіть калібрувальний графік. [89]

*Якщо культуральне середовище є оптично дуже щільним рекомендується розвести його до рівня оптимальних показників приладу (0.05 ОД для чистого поживного середовища).

Обладнання для проведення робіт:

Спектрофотометр видимієї області Thermo Scientific GENESYS 140 являє собою базовий спектрофотометр, який є водночас економічно вигідним та надійним пристроєм, який може бути використаний для вимірювання оптичної густини культуральної рідини на 600 нм, завдяки своїй здатності інтеграції з ПК, результати можуть автоматично записуватись у базу даних виробництва. Пристрій має зручний інтерфейс та деякі функції здатен виконати автоматично. [88]

Характеристики:



Рис. 9.1 Спектрофотометр видимієї області Thermo Scientific GENESYS 140[88]

9.2 Контроль азотного живлення:

Оскільки поживне середовище для культивування *Mesorhizobium ciceri* представляє собою в основному гороховий бульйон з розчиненому в

ньому солями та сахарозою, то для точного аналізу всіх нітрогеновмісних компонентів поживного середовища, а саме: білків (амінного/органічного

Оптична схема	2-лучева
Оптичний діапазон	325... 1100 нм
Одиниця поділу шкали довжини хвилі:	0,2; 0,5; 1; 2 або 5 нм
Відтворюваність довжини хвилі:	$\pm 0,2$ нм
Точність встановлення довжини хвилі:	$\pm 0,5$ нм
Фотометричний діапазон:	-3A...+3,5A
Фотометрична точність:	$\pm 0.002A$ при 0.5A; $\pm 0.004A$ при 1.0A; $\pm 0.008A$ при 2.0A
Рівномірність базової лінії:	$<0.005A$
Дрейф значення оптичної щільності:	$<0.005A/\text{год}$ при 500 нм після 1 години роботи
Розсіяне світло:	$< 1.0\%T$ 198 нм (KCl), $<0.05\%T$ при 220 нм (NaI), $<0.03\%T$ при 340 нм (NaNO ₂)
Детектор	подвійний кремнієвий фотодіод

азоту) та амоній сульфату, нам необхідно використовувати аналіз, який би був придатний для багатокомпонентних сумішей з невизначеним складом органічних сполук.

Виходячі з того, що амоній сульфат та сульфат іони найчастіше легше метаболізуються культурою мікроорганізмів, то виходячі з цього варто застосувати 2 різні методики визначення азотного джерела живлення, перша це методика з реактивом Несслера для визначення амонійного азоту, яка буде застосована для аналізу перших 10 годин культивування до вичерпання джерела амонійного живлення. Після вичерпання джерела амонійного живлення необхідно визначати концентрацію легкодоступних амінновмісних сполук, таких як низькомолекулярні пептиди та вільні амінокислоти.

9.2.1 Визначення концентрації амонійного азоту методом Несслера

Загальна характеристика методу [90]

У лужно-лужному середовищі іодртутькалій ($K_2[HgI_4]$) взаємодіє з NH_4^+ , утворюючи інтенсивно жовто-бурий амідомеркурійодид; його поглинання вимірюють зазвичай при 420–425 нм. Метод дає межу виявлення 0,02–0,05 мг $N \cdot л^{-1}$ і лінійність до ≈ 2 мг $N \cdot л^{-1}$ у кюветі 1 см; придатний для питної води, стічних та ферментаційних рідин після центрифугування.

Підготовка реагентів

1. **Реактив Несслера** (K_2HgI_4 в концентрованому КОН, готовий лабораторний).
2. **Фотометричний стандарт NH_4-N** : 0-1,0 мг $N \cdot л^{-1}$ (амоній сульфат, $(NH_4)_2SO_4$), розведений у 0,01 М HCl.

Хід аналізу

1. Центрифугувати 10 мл культуральної рідини ($8000 \times g$, 5 х хв).

2. У 50-мл мірну колбу внести 1 мл зразка + 2 мл реактиву Несслера; довести водою до мітки.
3. Через 10 х хв при 20-25 °С виміряти оптичну густина на 425 нм (референт — дистилат + реактив).
4. Підставити у калібрувальну пряму; обчислити мг $\text{NH}_4\text{-N}$ л⁻¹.

9.2.3 Визначення концентрації амінного азоту за допомогою нінгідринового реактиву

Загальна характеристика методу[91]

Метод ґрунтується на реакції нінгідрину з α -аміногрупами амінокислот, коротких пептидів і амонію з утворенням пурпурового комплексу (Ruhemann's purple), чю оптичну густина вимірюють при 570 нм. Лінійна область — приблизно 0,5-4 мг N · л⁻¹, межа виявлення близько 0,2 мг N · л⁻¹ при кюветі 1 см

Підготовка реагентів

1. **Реактив нінгідрину:** 3 г нінгідрину розчинити у 60 мл 2-метоксіетанолу, довести об'єм до 100 мл 0,2 М ацетатним буфером, рН = 5,5.
2. **Буферний розчин:** 50 мл етанолу : 50 мл дистилату води.
3. **Стандарти** концентрацією амінного азоту: 0-200 мг N л⁻¹, використовуючи L-лейцин (74 мг лейцину $\approx$ 10 мг азоту).

Хід аналізу

1. Відібрати 10 мл культуральної рідини M. ciceri, 5 х хв при 8000 ×g, відібрати надосад.
2. Розбавити надосад так, щоб у реакційній пробірці було 1–3 мг N л⁻¹ (типово 1 : 50).

3. У три чисті кювети внести по 2 мл розведеного зразка (або стандарту) + 1 мл реактиву нінгідрину.
4. Герметично закрити, кип'ятити 15 хв у киплячій водяній бані; швидко охолодити до кімнатної.
5. Додати 5 мл розведувального розчину, перемішати, відстояти 10 хв.
6. Виміряти **оптичну щільність на довжині хвилі 475 нм**
7. Побудувати калібровку; результати виразити у мг N л^{-1} (або $\text{мг амінного азоту 100 мл}^{-1}$)

9.3 Методика визначення концентрації вуглецевого субстрату методом Лейна-Ейнона

Загальний принцип [92]

Метод базується на здатності редукуючих цукрів відновлювати іони міді (Cu^{2+}) у лужному середовищі до оксиду міді (Cu_2O), що утворюється в ході реакції. Цей оксид міді далі взаємодіє з кольоровим реагентом, таким як миш'якомолібденова кислота, формуючи синьо-зелений комплекс, інтенсивність кольору якого пропорційна кількості редукуючих цукрів.

Для визначення загального вмісту редукуючих (глюкоза, фруктоза) та нередукуючих цукрів (сахароза, крохмаль) у культуральній рідині за методом Лейна-Ейнона спочатку проводять інверсію сахарози та гідроліз крохмалю, що перетворює нередукуючі цукри в редукуючі форми для подальшого визначення.

Необхідні матеріали та реактиви:

- Розчин Лейна-Ейнона:
 - Розчин А: Сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 10,6 г/л.
 - Розчин В: Калій-натрієва тартратна сіль, 100 г/л; гідроксид натрію (NaOH), 50 г/л.

- Розчин С: Молібдатно-миш'яковокислий реагент для утворення кольорового комплексу, що містить молібденову та миш'якову кислоти.
- Кислотний гідролізатор для інверсії сахарози та гідролізу крохмалю (наприклад, 1 N HCl або H₂SO₄).
- Фотоколориметр або спектрофотометр для вимірювання інтенсивності кольору.
- Стандартний розчин глюкози для побудови калібрувальної кривої.

Порядок виконання аналізу:

1. **Підготовка зразка для визначення редукуючих цукрів:** Відібрати зразок культуральної рідини, центрифугувати (13000 об/хв, 5 хв, 4°C), після чого визначити вміст редукуючих цукрів у супернатанті без гідролізу (глюкоза і фруктоза).
2. **Гідроліз крохмалю та інверсія сахарози:** Додати кислотний розчин (0,1–0,5 N HCl), нагріти суміш до 95°C на 30 хвилин, охолодити та нейтралізувати за потреби. Отриманий розчин міститиме всі редукуючі цукри.
3. **Аналіз за методом Лейна-Ейнона:** Змішати 10 мл розчину Лейна-Ейнона (розчини А і В у рівних пропорціях) із 2 мл супернатанту, нагріти до кипіння на водяній бані 10 хвилин, у результаті чого утвориться червоний осад Cu₂O.
4. **Додавання молібденового реагенту:** Охолодити суміш і додати молібденовий реагент (розчин С), який реагує з оксидом міді, утворюючи синьо-зелений комплекс.
5. **Вимірювання інтенсивності кольору:** За допомогою фотоколориметра або спектрофотометра при довжині хвилі 620 нм виміряти інтенсивність кольору, яка пропорційна концентрації редукуючих цукрів.

6. **Побудова калібрувальної кривої:** Приготувати стандартні розчини глюкози різної концентрації (0,1; 0,2; 0,3 мг/мл) і провести процедуру для кожної концентрації для побудови калібрувальної кривої.
7. **Розрахунок концентрації цукрів у зразку:** За калібрувальною кривою визначити концентрацію редукуючих цукрів у зразку з урахуванням гідролізу крохмалю та інверсії сахарози.

9.4 Методика мікробіологічного контролю стерильності поживного середовища

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища є ключовою частиною передферментаційних процесів, бо у разі допущення сторонніх мікроорганізмів у процесі культивування *Mesorhizobium ciceri* чисельність КУО та рівень біомаси може знизитися в рази, що призведе до погіршення якості продукції, або навіть повного її псування.

Тому варто передбачити надійну методику, що б підтверджувала стерильність поживного середовища перед основним ферментаційним процесом.

Проаналізувавши літературні джерела та валідовані практики представлені в ДФУ та ДСТУ ISO, можна дійти висновку, що ці методики є досить точними, але вони не мають достатньої швидкості, оскільки згідно зазначених у нормативних документах методах поживне середовище можна вважати стерильним, тільки після 14 дня інкубування в термостаті, що є досить великим проміжком часу.

Тому мною була запропонована інструментальна система визначення присутності або відсутності контамінації в зразку BacT/Alert® 3D ефективність якої була підтверджена відповідними дослідженнями[93] та схвалена FDA до використання. Загалом у разі контамінації система BacT/Alert® 3D здатна автоматично визначити її за 18-30 годин. Визначення проводиться

шляхом визначення зміни концентрації CO₂ у зразку методом колориметрії, а саме зміні забарвлення індикатора що реагує CO₂. [94]

Послідовна інструкція з роботи за VacT/Alert® 3D

- 1) Стерильно відібрати пробу простерилізованого поживного середовища 30-40 мл.
- 2) В стерильних умовах використовуючи шприц об'ємом 20-30 мл відібрати пробу об'ємом 10 мл та спочатку вштрихнувши стерильну голку для шприца в фірмову ємність VacT/Alert® з поживним середовищем, а потім з'єднавши шприц та голку інокулювати поживне середовище 10 мл зразка. Загалом для аналізу необхідно додати 10 мл зразку у три ємності з поживними середовищами VacT/Alert® SA: Використовується для виявлення аеробних мікроорганізмів, VacT/Alert® SN: Призначене для виявлення анаеробних мікроорганізмів, стерильне повітря замінене атмосферою азоту. Та VacT/Alert® iAST для виявлення дріжджів та грибів.
- 3) Після чого за допомогою програмного забезпечення, що вбудоване в сам апарат задати шифр зразка та роздрукувати штрих-код, наклеївши його на спеціально відведеному на фірмовій ємності місці.
- 4) Відсканувати код кожного зразка та позначити їх місце в інкубаторі на сенсорній панелі.
- 5) Вставити зразки у відповідні ячейки інкубатора дном від себе та закрити апарат.
- 6) Через 15-20 годин перевірити сенсорну аналітичну панель на повідомлення щодо виявлення або не виявлення контамінації.
- 7) В разі будь яких сумнівів щодо результату тестування, зразок можна стерильно відібрати шприцем та висіяти на чашку Петрі з



Рис. 9.2. Зображення апарату VacT/Alert® iAST

поживним середовищем, інкубувати протягом 24 годин і перевірити результат.[94]

Методику мікробіологічного контролю чистоти виробничої культури

Методика чистоти виробничої культури визначається за допомогою фенотипового аналізу виробничої культури, шляхом висіву на поживне середовище задля візуального аналізу колоній та мікроскопіюванню задля аналізу морфології клітин.

Висів робиться на 3 типи поживного середовища, МПА, Сусло-агар та YMA агар. Як відомо літературних джерел МПА є селективним до бактерій, але згідно даних наведених у патенті ріст *Mesorhizobium ciceri* на цьому середовищі не спостерігається, Сусло-агар є селективним середовищем для грибів та дріжджів, а YMA використовується як селективне середовище для бактерій роду *Rhizobium*. [95],[96]

Тож задля аналізу необхідно посіяти 0,1 мл зразка на зазначені поживні середовища, та культивувати протягом 72-144 годин, або до появи виражених колоній *Mesorhizobium ciceri*, ріст має бути виражений лише на середовищі YMA, на середовищах МПА та Сусло-агар ріст має бути або відсутній або мінімальний. [98],[99]

Колонії на середовищі YMA представляють собою: випуклі, глянцеві, діаметром 2-4 мм, мають білий колір, що по краях колоній переходить в мутно-прозорий. [99]

Мікроскопіювання проводять за допомогою світлового мікроскопа, вживаючи всіх необхідних заходів для мікроскопіювання при збільшенні в 90 або більше разів.

При мікроскопіюванні *Mesorhizobium ciceri* представляють собою: грамнегативні, паличкоподібні клітини 1 мкм в довжину та 0,5 мкм в ширину,

спор не утворюють, рухливі, часто збиваються в конгломерати по 3-6 клітин.
[99]

Загалом можна сказати, що відсутність або дуже слабкий ріст на середовища МПА та Сусло-агар, наявність тільки білих колоній на середовищі УМА, та наявність тільки малих грамнегативних паличкоподібних клітин під час мікроскопіювання підтверджують чистоту виробничої культури.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gebremariam, M., & Tesfay, T. (2021). Effect of P application rate and rhizobium inoculation on nodulation, growth, and yield performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Agronomy*, 2021, 1-14. Бактерії роду *Rhizobium*
2. Hill Y, Colombi E, Bonello E, Haskett T, Ramsay J, O'Hara G, Terpolilli J. Evolution of diverse effective N₂-fixing microsymbionts of *Cicer arietinum* following horizontal transfer of the *Mesorhizobium ciceri* CC1192 symbiosis integrative and conjugative element. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Mar 1;87(5):e02558-20. doi: 10.1128/AEM.02558-20. Epub 2020 Dec 18. PMID: 33355157; PMCID: PMC8090884.
3. Chibeba, A. M., Kyei-Boahen, S., de Fátima Guimarães, M., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2017). Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 246, 291-305
4. Lohosha, O. V., Vorobei, Y. O., & Leonova, N. O. (2023). Symbiotic efficiency and cytokinin activity of new *Mesorhizobium ciceri* strains. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 85(1), 3-11.
5. Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics*, 45(1), 119-144.
6. Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P., & Fernandez, M. P. (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 640-648.
7. Fühner, C., & Runge, M. (2009). Are Fe and P availabilities involved in determining the occurrence and distribution of *Calluna vulgaris* (L.) Hull in semi-arid grasslands on calcareous soils?. *Plant and soil*, 316, 161-176.

8. Arrese-Igor, C., González, E. M., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E., & Gil-Quintana, E. (2011). Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant stress*, 5(1), 24-31.
9. Гамаюнова, В. В., & Базалій, С. Ю. (2018). Вплив застосування сучасних біопрепаратів на врожайність нуту в умовах південного Степу України.
10. «BioNitro Нут®» інтернет-портал ENZIM [Електронний ресурс] : Режим доступу: <https://market.enzim.biz/agro/inokulyanti/binitro-nut>
11. Kebede, E. (2021). Contribution, utilization, and improvement of legumes-driven biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 767998
12. Zhang, J., Wang, N., Li, S., Wang, J., Feng, Y., Wang, E., ... & Chen, W. (2023). The effect of different rhizobial symbionts on the composition and diversity of rhizosphere microorganisms of chickpea in different soils. *Plants*, 12(19), 3421.
13. Pandey, R. P., Srivastava, A. K., Gupta, V. K., O'Donovan, A., & Ramteke, P. W. (2018). Enhanced yield of diverse varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by different isolates of *Mesorhizobium ciceri*. *Environmental Sustainability*, 1(4), 425-435
14. Ogola, J. B. O., Macil, P. J., & Odhiambo, J. J. O. (2021). Biochar application and Rhizobium inoculation increased intercepted radiation and yield of chickpea in contrasting soil types. *International Journal of Plant Production*, 15(2), 219-229.
15. Imran A, Mirza MS, Shah TM, Malik KA and Hafeez FY (2015) Differential response of kabuli and desi chickpea genotypes toward inoculation with PGPR in different soils. *Front. Microbiol.* 6:859. doi: 10.3389/fmicb.2015.00859

16. Wanjofu EI, Venter SN, Beukes CW, Steenkamp ET, Gwata ET, Muema EK. Nodulation and Growth Promotion of Chickpea by Mesorhizobium Isolates from Diverse Sources. *Microorganisms*. 2022; 10(12):2467.
17. Zaw, M., Rathjen, J. R., Zhou, Y., Ryder, M. H., & Denton, M. D. (2022). Rhizobial diversity is associated with inoculation history at a two-continent scale. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(5), fiac044
18. Myint Zaw, Judith R Rathjen, Yi Zhou, Maarten H Ryder, Matthew D Denton, Rhizobial diversity is associated with inoculation history at a two-continent scale, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 98, Issue 5, May 2022, fiac044, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac044>
19. Oparah, I. A., Deaker, R., Hartley, J. C., Sohail, M., Gemell, L. G., Hartely, E., & Kaiser, B. N. (2022). Symbiotic efficiency, rhizosphere competence and nodule occupancy of chickpea root-nodule bacteria from Australian soils
20. Логоша, О. В., Воробей, Ю. О., Волкова, І. В., & Усманова, Т. О. (2021). ШТАМ MESORHIZOBIUM CICERI ND-64 — ЕФЕКТИВНИЙ МІКРОСИМБІОНТ НУТУ СУЧАСНИХ СОРТІВ. *Сільськогосподарська мікробіологія*, 32, 3-17. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.32.3-17>
21. «Вплив мінеральних добрив на властивості ґрунту та ГВК» інтернет-портал Superagronom.ua [Електронний ресурс] : Режим доступу: <https://superagronom.com/blog/894-vpliv-mineralnih-dobriv-na-vlastivosti-gruntu-ta-gvk>
22. Логоша, О. В., Воробей, Ю. О., Усманова, Т. О., & Стрекалов, В. М. (2019). ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛАСТИВОСТЕЙ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ НУТУ, ПОШИРЕНИХ В АГРОЦЕНОЗАХ ЛІСОСТЕПОВОЇ ТА СТЕПОВОЇ ЗОН УКРАЇНИ. *Сільськогосподарська мікробіологія*, 29, 21-28. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.29.21-28>
23. Логоша, О. В., Воробей, Ю. О., Усманова, Т. О., & Бушулян, О. В. (2021). Screening of modern chickpea varieties by response to bacterization. *Сільськогосподарська мікробіологія*, 33, 44-54.

24. Штам бульбочкових бактерій *mesorhizobium ciceri* h-12, активний симбіотичний азотфіксатор, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує врожайність нуту : пат. 17664 Україна : С12Р 1/04, С12N 1/00. № 17664 ; опубл. 16.10.2006. 8 с.
25. Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia (p. 173). Canberra: Australian centre for international agricultural research.
26. Mendoza-Suárez, M., Andersen, S. U., Poole, P. S., & Sánchez-Cañizares, C. (2021). Competition, nodule occupancy, and persistence of inoculant strains: key factors in the rhizobium-legume symbioses. *Frontiers in plant science*, 12, 690567
27. Braham, J. E., & Bressani, R. (1985). Effect of bean broth on the nutritive value and digestibility of beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(10), 1028-1034
28. Опис до патенту на винахід UA 1372985364. 2025. URL: <https://ipro-pua.com/inv/pdf/5wibngfd-description.pdf#page=2>
29. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.bacterio.net> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.
30. Басок, Б. І., & Базєєв, Є. Т. (2020). Глобальне потепління: проблеми, дискусії та прогнози. *Світогляд*, 6(86), 12-23
31. Наслідки руйнування Каховської ГЕС для агросеткору та Півдня України. Агрополіт - гаряча агрополітика. URL: <https://agropolit.com/cards/11-kahovska-ges-naslidki-dlya-agrosetkoru-ta-udar-po-ekologiyi-ukrayini> (дата звернення: 05.10.2024).
32. Mirzoiev, T. (2024). СУЧАСНИЙ СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ ВИРОБНИЦТВА НІШЕВИХ ТЕХНІЧНИХ КУЛЬТУР. *Aktual'ni Problemy Ekonomiky= Actual Problems in Economics*, (271), 6-14.

33. Скільки в Україні вегетаріанців та веганів – дослідження. Mind.ua. URL: <https://mind.ua/news/20222628-skilki-v-ukrayini-vegetarianciv-ta-veganiv-doslidzhennya> (дата звернення: 05.10.2024).
34. Рослинне м'ясо: що таке рослинні замітники м'яса? Користь і шкода, ринок альтернативного м'яса. NEWFOOD. URL: <https://newfood.ua/2022/02/06/potentsial-rynku-alternatyvnoho-m-iasa-chomu-taki-produkty-ne-tilky-dlia-vehaniv/> (дата звернення: 06.10.2024).
35. Державна служба статистики України. Економічна статистика / Економічна діяльність / Сільське, лісове та рибне господарство Сільське господарство. URL: <https://www.ukrstat.gov.ua/> (дата звернення: 05.10.2024).
36. Головний сайт для агрономів. Технологія вирощування нуту. Головні правила. Superagronom.com. URL: <https://superagronom.com/articles/357-tehnologiya-viroschuvannya-nutu> (дата звернення: 05.10.2024).
37. Каменєва, І. О. (2009). Вплив вермикуліту на ріст і зберігання *Mesorhizobium ciceri* H-12 у гетерофазному препараті. Сільськогосподарська мікробіологія
38. Rouissi, T., John, R. P., Brar, S. K., Tyagi, R. D., & Prevost, D. (2010). Centrifugal recovery of rhizobial cells from fermented starch industry wastewater & development of stable formulation. *Industrial Biotechnology*, 6(1), 41-49.
39. FoodData Central. FoodData Central. URL: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2644284/nutrients> (date of access: 20.05.2024).
40. KEGG PATHWAY: Starch and sucrose metabolism - *Mesorhizobium ciceri* CC1192. GenomeNet. URL: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mcic00500 (date of access: 23.05.2024)
41. glucoamylase family protein [*Mesorhizobium ciceri*] - Protein - NCBI. National Center for Biotechnology Information. URL:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_082827276.1 (date of access: 23.05.2024).

42. Choma, A. (2002). Lipopolysaccharides from *Mesorhizobium huakuii* and *Mesorhizobium ciceri*: chemical and immunological comparative data. *Acta Biochimica Polonica*, 49(4), 1043-1052.

43. Choma, A., & Komaniecka, I. (2003). The polar lipid composition of *Mesorhizobium ciceri*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1631(2), 188-196.

44. Das, K., Rajawat, M. V. S., Saxena, A. K., & Prasanna, R. (2017). Development of *Mesorhizobium ciceri*-Based Biofilms and Analyses of Their Antifungal and Plant Growth Promoting Activity in Chickpea Challenged by *Fusarium Wilt*. *Indian journal of microbiology*, 57(1), 48–59.

<https://doi.org/10.1007/s12088-016-0610-8>

45. 張俊杰, 王楠, 郭晨, 王京琪, & 馮煜鋒. (2023). 鷹嘴豆慢生根瘤菌 USDA 3378 發酵條件優化. *China Brewing*, 42(4).

46. Rotary Screw Compressor vs. Reciprocating Compressor [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ecoaircompressors.com/archives/656.html> (дата звернення: 01.06.2025).

47. Begom, M. F., Ahmed, M. G. U., Sultana, R., & Akter, F. (2021). Culture optimization for mass production of *Rhizobium* using bioreactor made of readily available materials and agitated by air flow

48. Силіконовий піногасник для бродильних розчинів SILFOAM® SE 4260 URL: <https://siloxane.com.ua/ua/p181321744-silfoam-4260.html> (дата звернення: 11.04.2024).

49. Techfors Pilot Bioreactors – INFORS HT [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://infors-ht.com/en/products/bioreactors/pilot-bioreactors/techfors> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

50. Lessons in Bioreactor Scale-Up: Part 5 – Theoretical and Empirical Correlations for Predicting the Mass-Transfer Coefficient in Stirred-Tank

Bioreactors [Електронний ресурс]. – Режим доступу:
<https://www.bioprocessintl.com/bioreactors/lessons-in-bioreactor-scale-up-part-5-theoretical-and-empirical-correlations-for-predicting-the-mass-transfer-coefficient-in-stirred-tank-bioreactors> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

51. Manzano-Gómez, L. A., Rincón-Rosales, R., Flores-Felix, J. D., Gen-Jimenez, A., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Ventura-Canseco, L. M. C., ... & Rincón-Molina, C. I. (2023). Cost-effective cultivation of native PGPB *Sinorhizobium* strains in a homemade bioreactor for enhanced plant growth. *Bioengineering*, 10(8), 960.

52. Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1994). Clean-in-place systems for industrial bioreactors: Design, validation and operation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 201-207.

53. ТОВ «ПРАЙМДЕЗ». Інструкція щодо застосування засобу БАКТИФОМ (БАСТИФОАМ) з метою дезінфекції. Київ, 2021. 11 с. URL: <https://hlorka.ua/upload/iblock/65f/4hbanb2lwdfwb7z05r3kpyu9g6d977ii.pdf>

54. ТОВ «Хорека Сервіс». Інструкція із застосування засобу «Бланідас марка А». Київ, 2020. 7 с. URL: <https://horeca-service.net/wp-content/uploads/2019/07/Instruktsiya-Blanidas-marka-A-19.08.20.pdf> – Дата звернення: 26.03.2025.

55. Prima Supra BP, безпінний лужний миючий засіб, 12 кг [Електронний ресурс] // Albatros Market. – Режим доступу: <https://albatrosmarket.com.ua/product/prima-supra-bp-bezpinniyluzhniy-miyuchiy-zasib-12-kg>, вільний. – Дата звернення: 26.03.2025.

56. Акваклін СіП кислотний миючий засіб [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://biovet.ua/ua/zasib-myinyi-nepinnyi-akvaklin-sip/4907/>, вільний. – (Дата звернення: 03.04.2025).

57. ТОВ «АТМА». Засіб дезінфікуючий для шкіри рук «Dezoquatum 10», 1 л. Київ, 2025. URL: <https://atma.ua/profesijna-himiya/zasoby-osobystoyigigiyeny/zasib-dezinfikuyuchyjdlya-shkiry-ruk-dezoquatum-10-1l-dq011000d/>

58. Кислотний засіб для чищення [Електронний ресурс] // Primaterra. – Режим доступу: <https://primaterra.ua/ua/p222475659-kislotnoe-sredstvo-dlya.html>, вільний. – Дата звернення: 26.03.2025.
59. PROFI 236 – лужний пінний концентрат на основі гіпохлориту натрію [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://shop.mebliranok.com.ua/product/profi-236-schelochnoj-pennyj-koncentrat-na-osnove-gipohlorita-natrija/>, вільний. – (Дата звернення: 03.04.2025).
60. Дезінфікуючий засіб з миючим ефектом [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p2495178410-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-moyuschim.html>, вільний. – (Дата звернення: 03.04.2025).
61. Deshpande, S. S., & Cheryan, M. (1986). Water uptake during cooking of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 36, 157-165
62. Replacement Strainer - 500 Micron Filter - Straight [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://tcfittings.com/collections/wort-hop-strainer/products/replacement-strainer-500-micron-filter-straight> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.
63. 100 Micron Mesh | Twilled Dutch Weave - Gerard Daniel Worldwide [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.gerarddaniel.com/product/micronic-mesh/twilled-dutch-weave-6/100-micron-mesh-twilled-dutch-weave/?utm> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.
64. ACCUGAF Filter Bags | Commercial Filtration Supply [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.commercialfiltrationsupply.com/filter-bags/accugaf.html> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.
65. Повітрозабірник стіновий NAVYFLEX VLB100. Доступно: <https://aes.in.ua/uk/povitrozabirnik-stinovij-navyflex-vlb100/> (дата звернення: 08.11.2024).
66. Amair 300 GT [Електронний ресурс] // AAFA Asia. – Режим доступу до ресурсу: <https://aafasia.com/product/amair-300-gt/> – Дата звернення: 18.11.2024.

67. Atlas Copco. LZ Premium – Oil-free air compressors. Доступно: <https://www.atlascopco.com/en-ua/compressors/products/air-compressor/oil-free-air-compressors/lz-premium> (дата звернення: 08.11.2024).

68. Фреоновий охолоджувач для повітря ZB15KQE. Доступно: <https://vikeng.com.ua/ua/p1205862533-freonovyj-ohladitel-dlya.html> (дата звернення: 08.11.2024).

69. Ресивер 500 л, 10 бар. Доступно: <https://compressors.in.ua/ua/p85319536-resiver-500-bar.html> (дата звернення: 08.11.2024).

70. Теплообмінник Roen Est. Доступно: <https://xn--b1a4ac.xn--j1amh.ua/p865376767-teploobmennik-roen-est.html> (дата звернення: 08.11.2024).

71. Фільтри вентиляції класу F7-F9. AlterAir. Доступно: <https://shop.alterair.ua/ventiljacija/komplektujushhie-ventiljicii/filtry/f7-f9-filter/> (дата звернення: 08.11.2024).

72. AHF 600600120 H11 HEPA фільтр. Доступно: <https://www.aff.com.ua/en/ahf-600600120-h11-filtr-hepa> (дата звернення: 08.11.2024).

73. Ваги технічні CAS SW [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://postorg.com.ua/product/vesy-tehnicheskie-cas-sw/?sku=7873> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

74. Котел пищеварочный КПЭ-30 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1402708025-kotel-pischevarochnyj-kpe.html> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

75. OEM Mini DC Brushless Water Pump 4502 – Aurora ProSci [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.auroraprosci.com/OEM-Mini-DC-Brushless-Water-Pump-4502> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

76. Product Data Sheet Techfors-S [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://infors-ht.com/getmedia/a5eae247-ed48-4982-ae53->

fbab4cc830e0/Product-Data-Sheet-Techfors-S-3-en-GB-1 (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

77. Sartofluor | Sartorius Shop [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://shop.sartorius.com/ww/p/sartofluor/M_Sartofluor (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

78. Ваги технічні CAS SW [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://postorg.com.ua/product/vesy-tehnicheskie-cas-sw/?sku=7874> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

79. Котел харчовий електричний KE-200 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://techsnab.com.ua/ua/kotel-harchovyj-elektrychnyj-ke-200> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

80. Pico 600 – Hydor [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://hydor.com/products/pico-600> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

81. 700 Series Cased Pump – Watson-Marlow [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.wmfts.com/en-us/watson-marlow-pumps/cased-pumps/700-series-cased-pump> (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

82. Aervent Hydrophobic Cartridge and Disposable Capsule Filters – Merck Millipore [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Aervent-Hydrophobic-Cartridge-and-Disposable-Capsule-Filters,MM_NF-C6011 (дата звернення: 01.06.2025). – Назва з екрана.

83. Santhosh, G. P. (2015). Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. *Int J Res Biosci Agric Technol*, 7(2), 243-247.

84. Sivakumar, G. K. K. (2019). Enhancing the shelf life of *Azotobacter* and *Azospirillum* bioinoculants by development of liquid formulations. *Int. Arch. Appl. Sci. Technol*, 10, 132-136

85. Buntić, A. V., Stajković-Srbinović, O. S., Knežević, M. M., Kuzmanović, Đ. Ž., Rasulić, N. V., & Delić, D. I. (2019). Development of liquid

rhizobial inoculants and pre-inoculation of alfalfa seeds. Archives of Biological Sciences, 71(2), 379-387.

86. Jaiswal, A., Kumari, G., Upadhyay, V. K., Pradhan, J., & Pramanik, H. S. K. (2023). A methodology to develop liquid formulation of biofertilizer technology. The Pharma Innovation Journal, 12, 875-881

87. Hill, Y. J., Kohlmeier, M. G., Agha Amiri, A., O'Hara, G. W., & Terpolilli, J. J. (2024). Evolution of novel Mesorhizobium genospecies that competitively and effectively nodulate Cicer arietinum following inoculation with the Australian commercial inoculant strain M. ciceri CC1192. *Plant and Soil*, 1-19.

88. Спектрофотометр видимой области Thermo Scientific™ GENESYS™ 140. ITR GROUP.
URL: <https://itrgroup.com.ua/spektrofotometri/spektrofotometr-scientific-genesys-140> (дата звернення: 08.03.2024).

89. Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia (p. 119). Canberra: Australian centre for international agricultural research.

90. Zhang, R., Luo, L., Wang, S., Guo, K., Xu, W., & Zhao, Z. (2022). Screening and characteristics of ammonia nitrogen removal bacteria under alkaline environments. *Frontiers in Microbiology*, 13, 969722.

91. Sharma, I., Pranaw, K., Soni, H., Rawat, H. K., & Kango, N. (2022). Parametrically optimized feather degradation by *Bacillus velezensis* NCIM 5802 and delineation of keratin hydrolysis by multi-scale analysis for poultry waste management. *Scientific Reports*, 12(1), 17118.

92. Volodko, O. I., Ivanova, T. S., Kulichkova, G. I., Lukashevych, K. M., Blume, Y. B., & Tsygankov, S. P. (2020). Fermentation of sweet sorghum syrup under reduced pressure for bioethanol production. *The Open Agriculture Journal*, 14(1).

93. Bugno A, Saes DPS, Almodovar AAB, Dua K, Awasthi R, Ghisleni DDM, Hirota MT, de Oliveira WA, de Jesus Andreoli Pinto T. Performance Survey and Comparison Between Rapid Sterility Testing Method and

Pharmacopoeia Sterility Test. J Pharm Innov. 2018;13(1):27-35. doi: 10.1007/s12247-017-9303-z. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29497461; PMCID: PMC5816116

94. “BioMérieux. (2004). Bact-Alert 3D User Manual. Retrieved from http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/automated_analyzer/user_manuals/Biomerieux%20Bact-Alert%203D%20-%20User%20Manual.pdf”

95. “Oxoid. (2015). Product Details. Retrieved from http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0247&org=149&c=UK&lang=EN”

96. Soussi, M., Santamaria, M., Ocana, A., & Lluch, C. (2001). Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in a salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. Journal of Applied Microbiology, 90(3), 476–481. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01269.x

97. Логоша, О. В., Воробей, Ю. О., Усманова, Т. О., & Стрекалов, В. М. (2019). ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛАСТИВОСТЕЙ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ НУТУ, ПОШИРЕНИХ В АГРОЦЕНОЗАХ ЛІСОСТЕПОВОЇ ТА СТЕПОВОЇ ЗОН УКРАЇНИ. Сільськогосподарська мікробіологія, 29, 21-28. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.29.21-28>

98. Штам бульбочкових бактерій *Mesorhizobium ciceri*ND-64 (IMB-7835) для одержання бактеріального препарату під нут: пат. 141783 Україна. МПК С12N 1/02, С05F 11/08, О. В. Логоша, Ю. О. Воробей, Т. О. Усманова; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України; заявл. 21.10.2019; опубл. 27.04.2020, Бюл. № 8

Додатки

Додаток 1 Патент на корисну модель № 141783 (*M. ciceri* ND-64)

Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології, а саме до мікробних засобів підвищення врожайності бобових культур, і являє собою новий штам *Mesorhizobium ciceri* ND-64, призначений для виробництва бактеріальних добрив під нут.

Нут є бобовою культурою з цінними біологічними та господарськими ознаками та важливим джерелом продовольчого і кормового рослинного білка [1]. В останні кілька років посіви цієї культури в Україні суттєво зросли, що пояснюється високою цінністю зерна, холодо- та посухостійкістю рослин [2].

Застосування високоефективних бульбочкових бактерій нуту у технологіях вирощування даної культури сприятиме реалізації симбіотичного потенціалу рослин, підвищенню стійкості до несприятливих ґрунтово-кліматичних умов та зростанню урожайності [3].

Відоме використання симбіотичних азотфіксаторів для виробництва бактеріальних добрив, які підвищували урожай нуту [Авторское свид. СРСР, № 1128545, 1985, С05F 11/08; Держпатент України № 17664, 2006, С12N 1/00, С12P 1/04]. Ефективність цих штамів перевірялася в зоні Степу України.

Найбільш близьким до запропонованої корисної моделі є штам - найближчий аналог *Mesorhizobium ciceri* Н-12. Цей активний штам в залежності від ґрунтових і кліматичних умов іноді формує симбіоз низької ефективності.

В основу корисної моделі поставлена задача отримання нового високоефективного штамму бульбочкових бактерій нуту, який характеризувався б комплексом господарсько-цінних ознак і як біоагент бактеріальних препаратів забезпечував стабільно високий врожай насіння нуту.

Поставлена задача вирішується завдяки застосуванню запропонованого штамму *Mesorhizobium ciceri* ND-64.

Новий штам вступає в активний симбіоз з рослинами нуту, посилює фіксацію молекулярного азоту повітря та суттєво підвищує продуктивність цієї культури.

Штам *Mesorhizobium ciceri* ND-64 виділений з численної популяції ризобій нуту, пристосований до ґрунтово-кліматичних умов України та спроможний витримувати конкуренцію з представниками місцевих популяцій *Mesorhizobium ciceri*.

Штам *Mesorhizobium ciceri* ND-64 виділений з бульбочок нуту сорту "Пам'ять", який вирощували на чорноземі південному в зоні Степу України (Одеська обл.). рН водню ґрунту - 6,0-7,2; вміст гумусу 3,5-4,5 %; вміст доступних форм елементів живлення (в мг. екв. на 100 г ґрунту): 3-4 азоту, 10-15 P_2O_5 та 20-30 K_2O .

Пропонований штам, ідентифікований за визначником Берджі [4], зберігається в колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України і депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НААН України (вул. Академіка Заболотного 154, м. Київ) 17 липня 2019 року за реєстраційним номером *Mesorhizobium ciceri* IMB B-7835.

Морфолого-культуральні властивості штамму.

Штам *Mesorhizobium ciceri* ND-64 добре росте на твердому поживному середовищі (гороховий агар) такого складу, г/л: $(NH_4)_2SO_4$ -1,0; K_2HPO_4 -0,5; KH_2PO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,2; $CaCO_3$ -1,0; сахароза (цукор) - 10,0; відвар гороху - 1 л (100 г гороху на 1 л води, прокип'ятити 40 хв., профільтрувати), агар-агар - 10,0 г, рН = 6,8-7,0. Стерилізація середовища 1,0 атм 30 хв.

Культура бактерій неспороносна, аеробна, грамнегативна. Клітини рухомі, мають форму злегка зігнутих паличок. Колонії на бобовому агаризованому середовищі досягають на 4-5 добв 1-2 мм в

Додаток 2 Ефективність штаму *M. ciceri* ND-64 у порівнянні з іншими українськими штамми

Сорти	Варіанти дослідів	Урожайність, т/га	Приріст (до контролю)	
			т/га	%
Скарб	Контроль (без інокуляції)	1,44 ± 0,11	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,69 ± 0,07	0,25	17,4
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-101	1,82 ± 0,04	0,38	26,4
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,00 ± 0,09	0,56	38,9
Адмірал	Контроль (без інокуляції)	1,56 ± 0,03	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,71 ± 0,05	0,15	9,6
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-25	1,77 ± 0,08	0,21	13,5
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	1,92 ± 0,04	0,36	23,1
Одисей	Контроль (без інокуляції)	1,65 ± 0,03	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,86 ± 0,06	0,21	12,7
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-3	1,94 ± 0,05	0,29	17,6
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,06 ± 0,05	0,41	24,9
Буджак	Контроль (без інокуляції)	1,68 ± 0,03	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,89 ± 0,04	0,21	12,5
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-46	1,92 ± 0,01	0,24	14,3
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,04 ± 0,07	0,36	21,4
Тріумф	Контроль (без інокуляції)	1,66 ± 0,04	—	—
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> H-12	1,85 ± 0,05	0,19	11,4
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-50	1,77 ± 0,03	0,11	6,6
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,15 ± 0,04	0,49	29,5

Додаток 3 Посівні площі нуту за 2024 рік згідно держстату

з них													усього
квасоля	0280	51,2	51,2	795,9	15,6	17,3	17,3	266,8	15,6	33,9	33,9	529,1	15,7
боби кінські	0290	1,2	1,2	22,3	18,6	1,2	1,2	21,4	18,6	0,0	0,0	0,9	19,4
нут	0300	8,9	8,9	155,6	17,5	8,7	8,7	153,3	17,6	0,2	0,2	2,3	12,8
сочевиця	0310	18,0	17,7	266,6	15,0	18,0	17,7	266,6	15,0	—	—	—	—
горох	0320	211,1	210,4	4629,1	22,0	198,6	198,0	4405,4	22,2	12,5	12,4	223,7	18,1
вика	0330	3,1	2,9	43,9	14,4	2,9	2,7	39,4	14,0	0,2	0,2	4,5	20,1
вика озима	0340	0,5	0,5	5,5	9,3	0,5	0,5	5,5	9,3	—	—	—	—
вика яра	0350	2,6	2,4	38,4	15,7	2,4	2,2	33,9	15,3	0,2	0,2	4,5	20,1
люпин солодкий	0360	3,6	3,5	58,0	16,4	3,5	3,4	55,6	16,2	0,1	0,1	2,4	20,8
люпин гіркий	0370	0,2	0,2	3,3	14,0	0,2	0,2	3,3	14,0	—	—	—	—

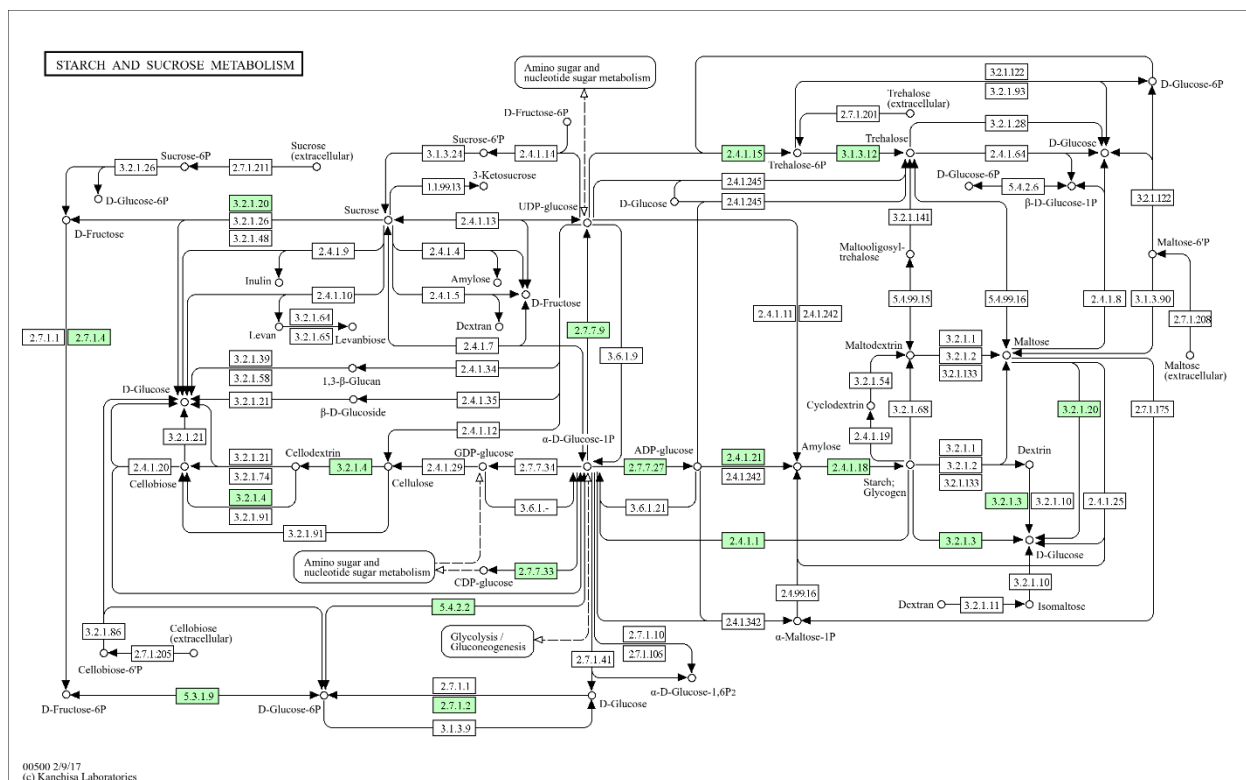
Дані наведено без урахування тимчасово окупованих російською федерацією територій та частини територій, на яких ведуться (велися) бойові дії / Data exclude the territories which are temporarily occupied by the Russian Federation and part of territories where the military actions are/were conducted

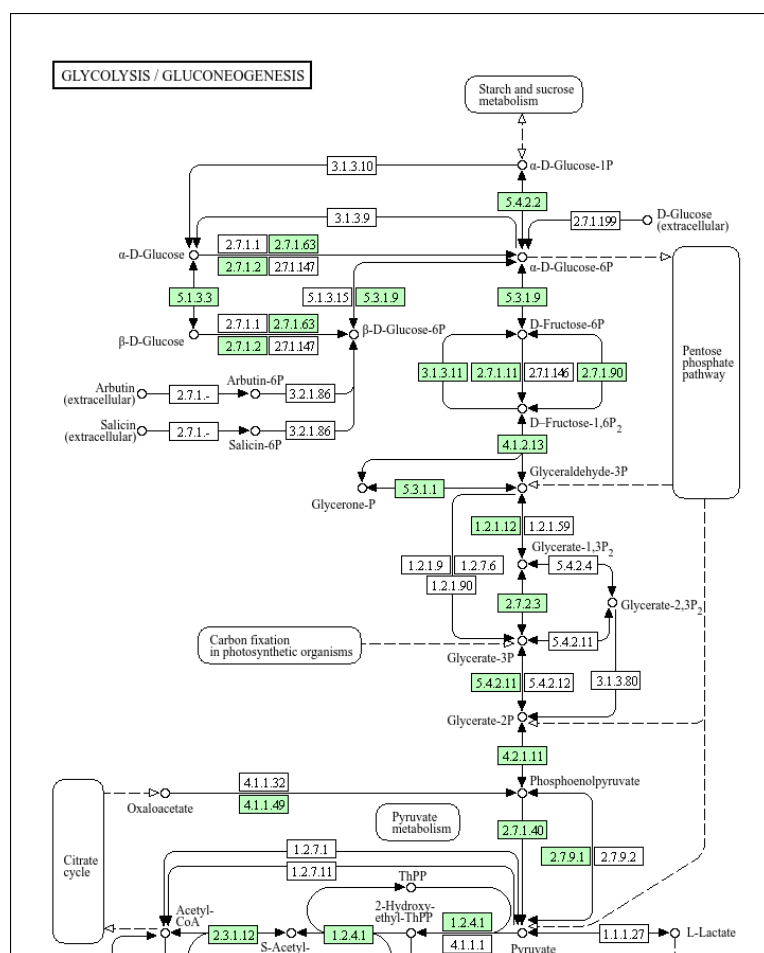
Додаток 4: Схеми метаболічних шляхів синтезу біомаси *M. ciceri* згідно наукової бази даних “KEGG”

Схема.1 розкладання ростового субстрату: сахарози та глюкози

<https://www.genome.jp/pathway/mcic00500>

<https://www.genome.jp/pathway/mcic00010>





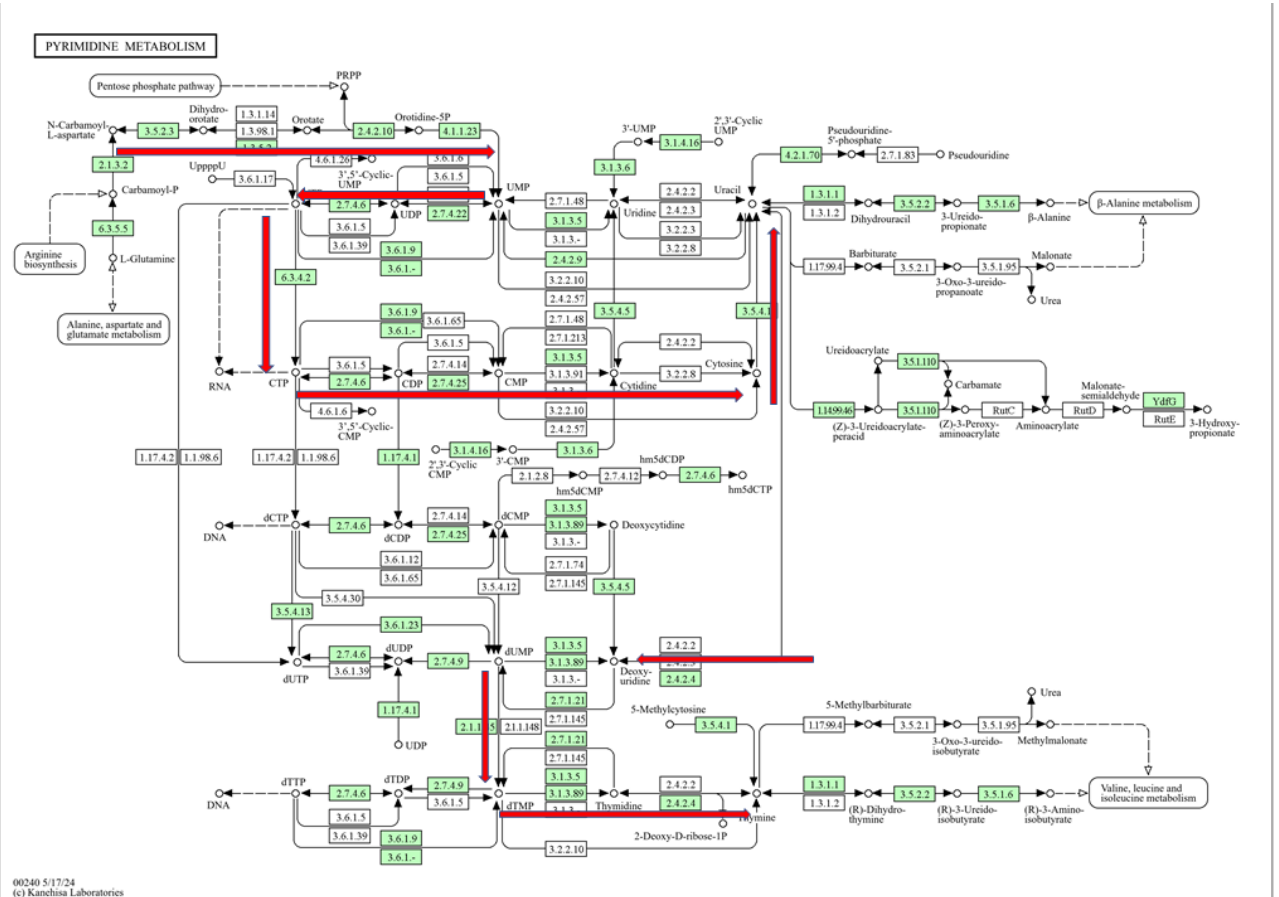
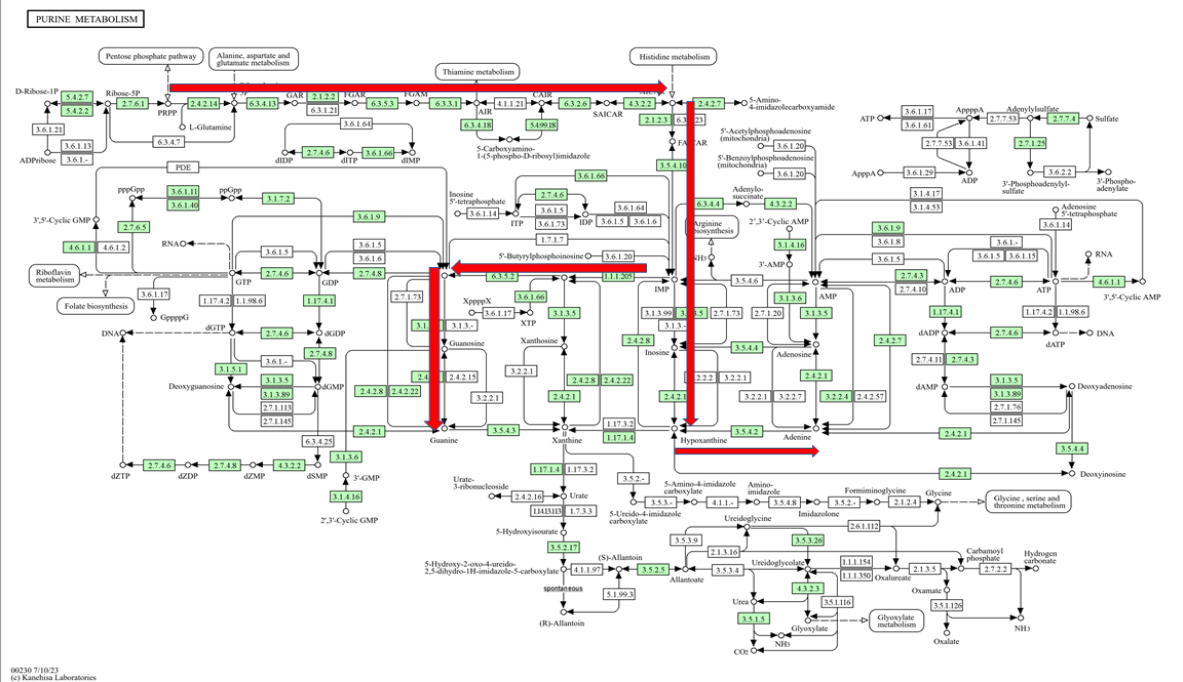
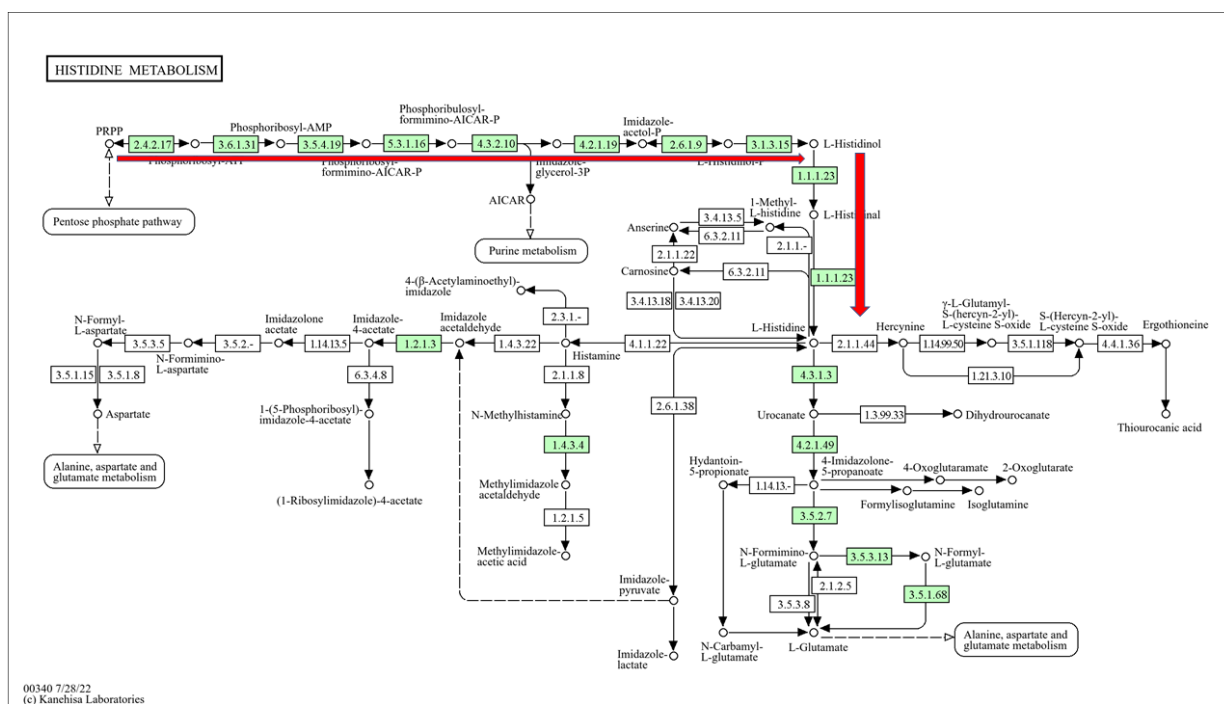
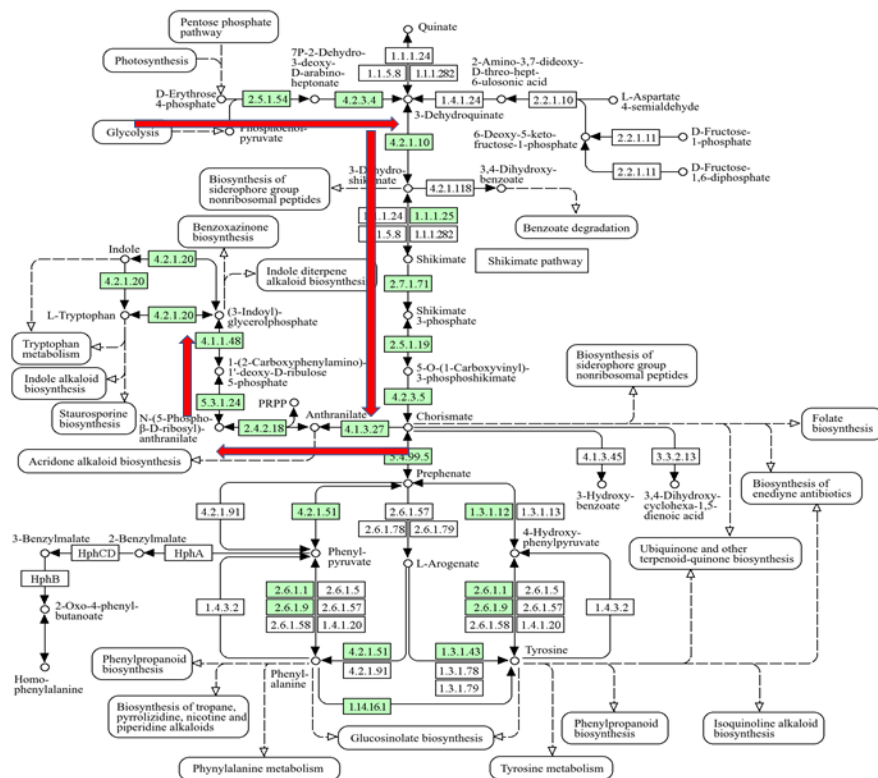


Схема 4. Біосинтез амінокислот



<https://www.genome.jp/pathway/mcic00340>

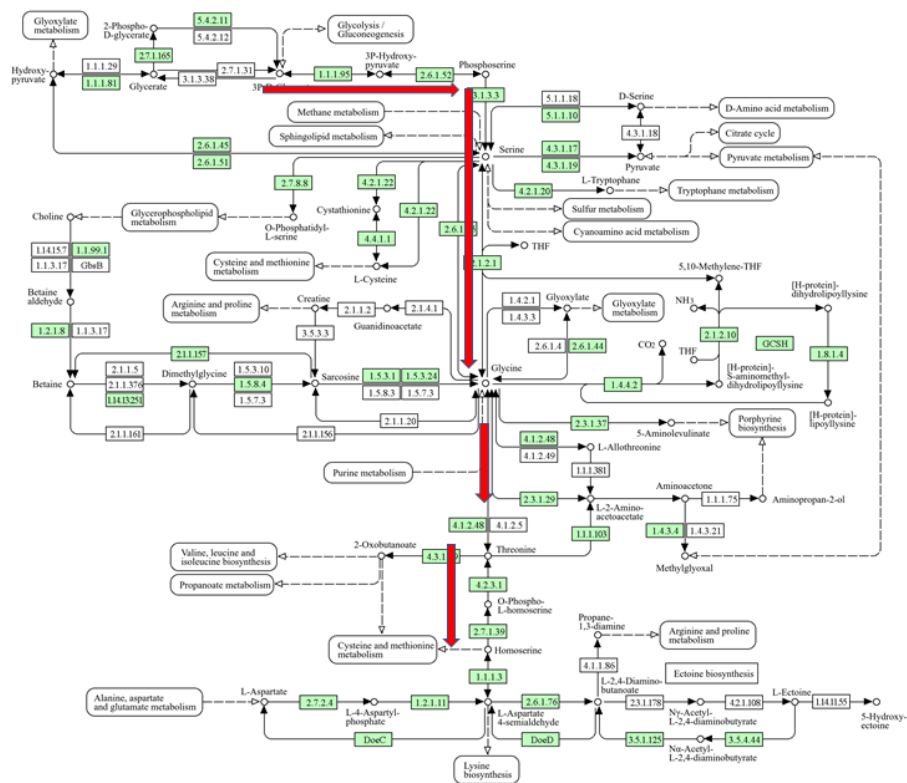
PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS



00400 3/8/23
(c) Kanehisa Laboratories

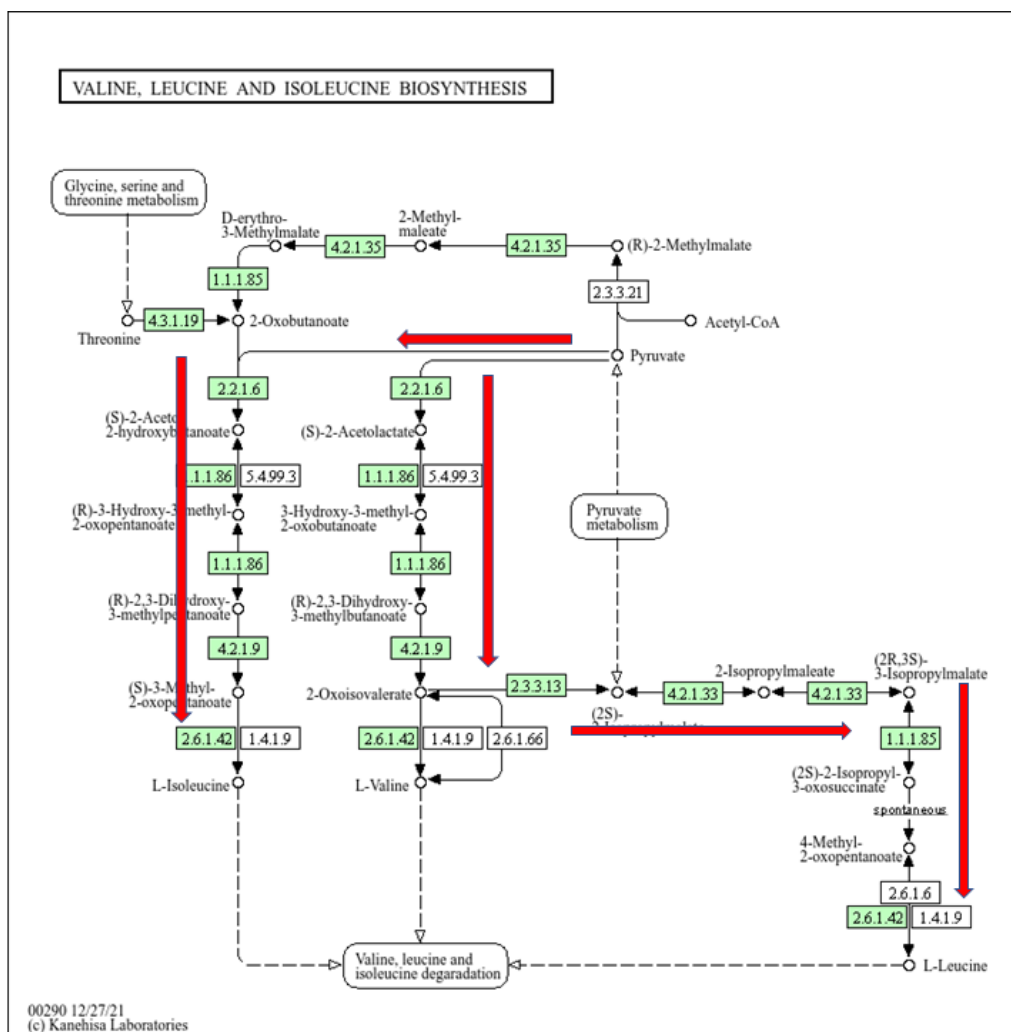
<https://www.genome.jp/pathway/mcic00400>

GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM

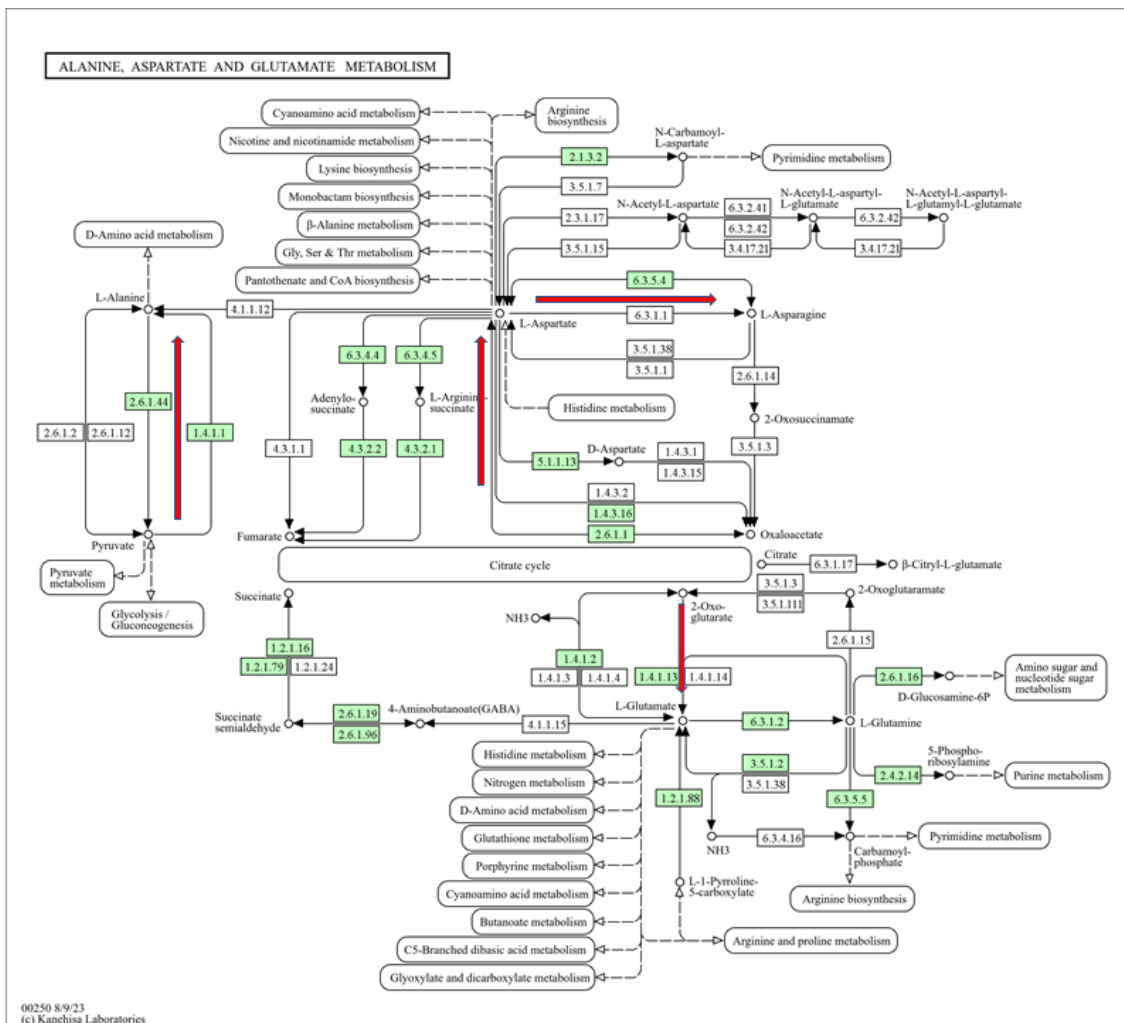


00260 11/27/23
(c) Kanehisa Laboratories

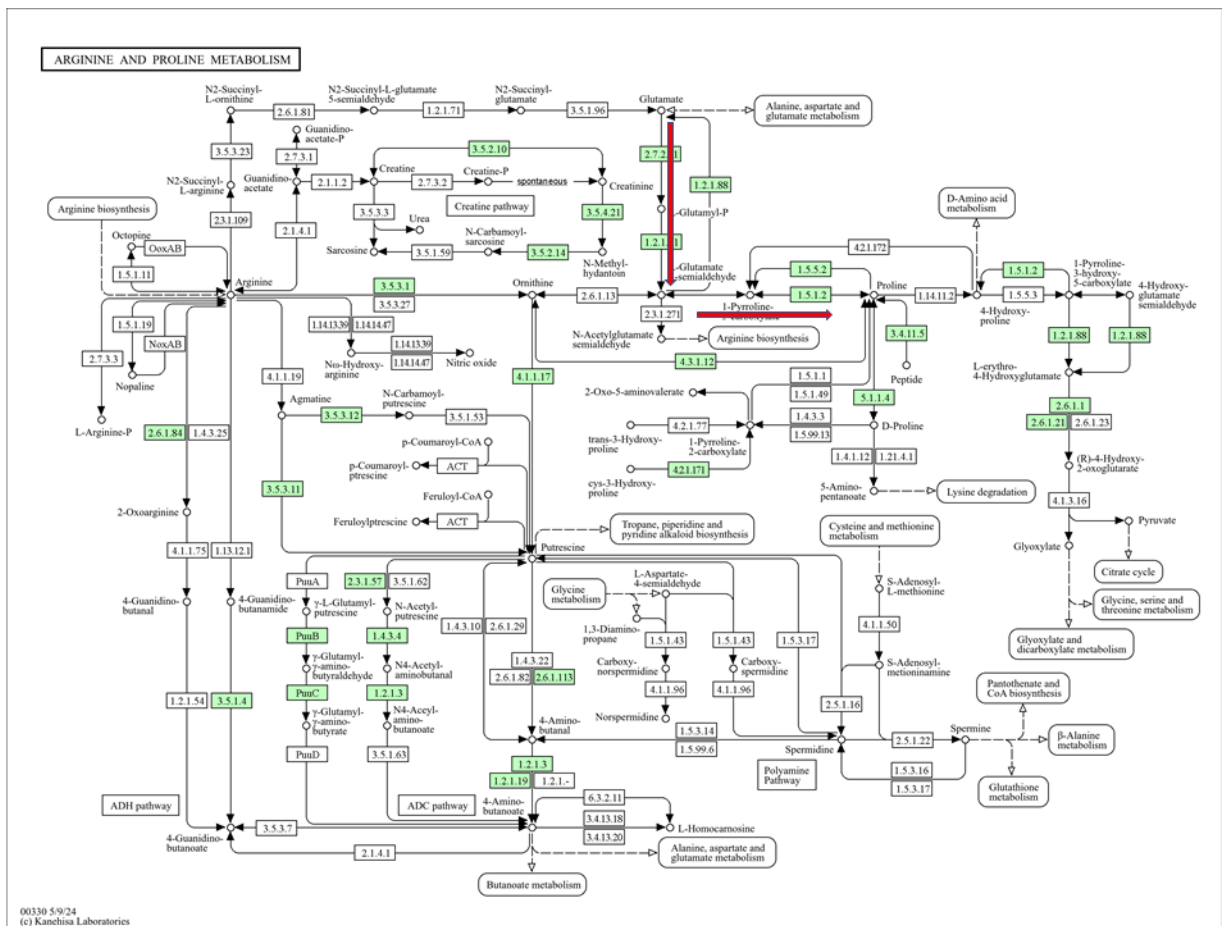
https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mcic00260



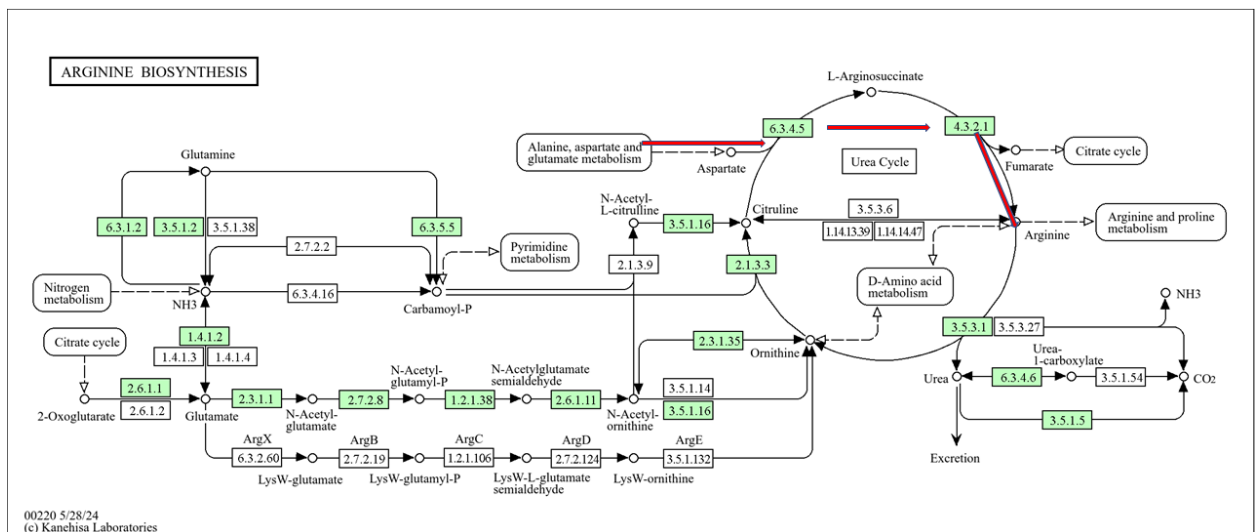
https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mcic00290



https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mcic00250

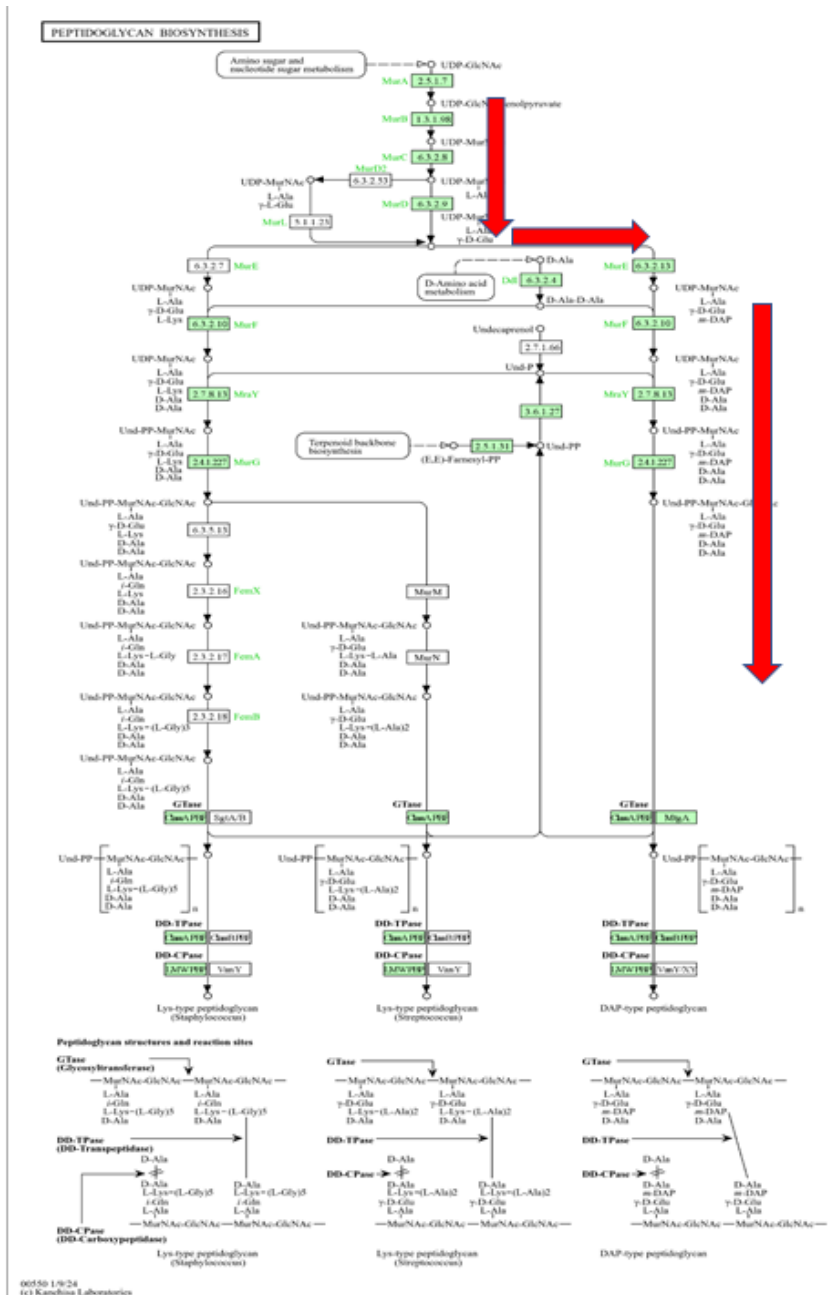


<https://www.genome.jp/pathway/mcic00330>



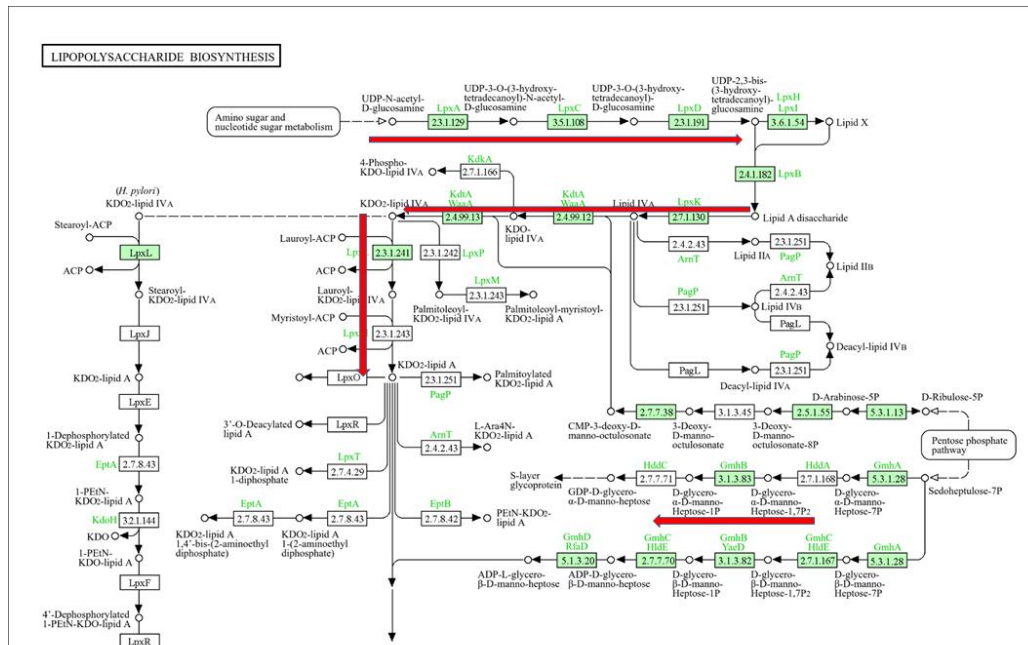
<https://www.genome.jp/pathway/mcic00220>

Біосинтез пептидоглікану



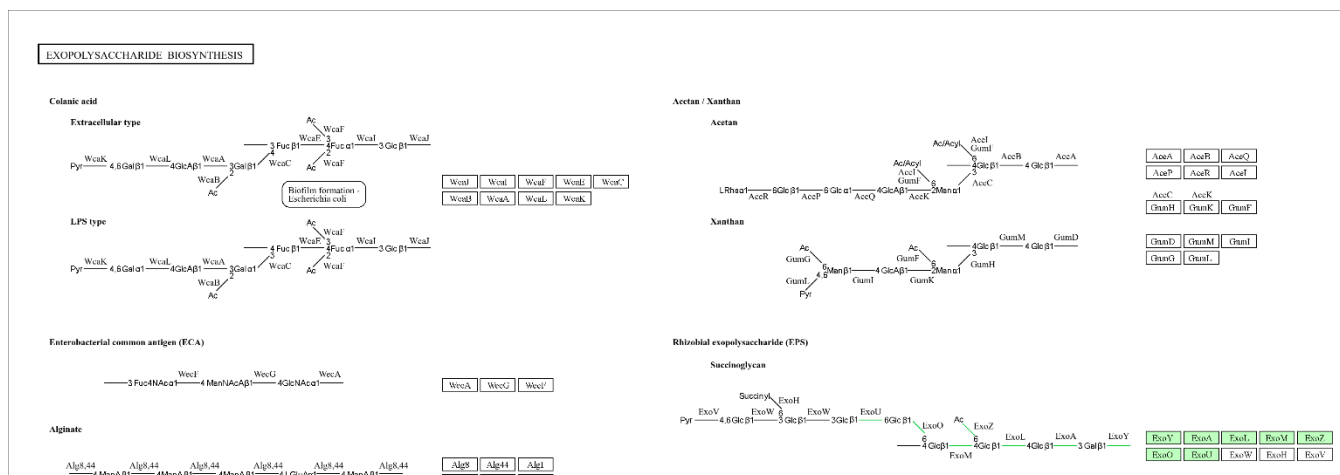
https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mcic00550

Схема біосинтезу ліпополісахаридів



https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mcic00540

Синтез екзополісахаридів:



https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mcic00543

Додаток 5. Аналіз концентрації азотного джерела живлення

Нінгідриновий метод

with bovine serum albumin (BSA) as standard ³⁰.

Amino acid content. Total amino acid content present in the feather hydrolysate was estimated using the ninhydrin method. In a nutshell, 30 μ L of the hydrolysate and 150 μ L of phosphate citrate buffer (pH 5.0) were

2022) 12:17118 |

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-21351-9>

nature portfolio

3

/scientificreports/

mixed thoroughly, to which 3% ninhydrin solution was added (1:1) and the mixture was vortexed for 1 min and subjected to boiling for 15 min. Upon the development of color, the reaction was stopped by cooling the tubes on ice. Following this, solution of isopropanol and water (7:3) was added to the mixture and after vortexing the absorbance was measured at 570 nm with serine as standard³¹.

Soluble oligopeptides in the hydrolysate. To study the soluble oligopeptide content in the aliquots, the samples were centrifuged at 5000g for 10 min and the hydrolysates were passed through 10 kDa cut-off Amicon Ultra membrane (Merck Millipore, India). Later, the absorbance of the filtrate was measured at 230 nm²⁹.

Метод неслера

Determination of ammonia nitrogen concentration, growth curve, and pH curve

The cultures incubated in different media were centrifuged at 12,000 rpm and 4°C for 10 min. The AN concentrations of the supernatants were determined using Nessler reagent colorimetry according to the description by APHA (1992). During the cultivation process, the pH and OD_{600nm} values of cultures were directly measured at 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, and 96 h by pH meter (Shanghai Apera Instrument Co., Ltd., PH400) and spectrophotometer from Shanghai Yoke Instrument Co., Ltd. (752N), respectively. The experiment included three replicates.

Додаток 6

Аналіз джерела вуглецевого живлення

Метод: Лейна-Ейннона

To scale up the process, a 5 L fermenter was used, (Fig. 3). The inoculum preparation for fermentation in the bioreactor was the same as for reduced pressure experiment in flasks. The adaptation of inoculum was performed in the fermenter for 2 h at 30 ± 1 °C. Yeast seeds (20 g/L) were placed into a 2 L displacement filled with 140 g/kg TS sorghum syrup supplemented with 0.33 g/kg urea and 0.09 g/kg of 70% orthophosphoric acid. Yeast adaptation and growth took place in aerobic conditions by bubbling filtered air through at 3 L/L, with a compressor. For yeast growth at atmospheric conditions, a hydraulic seal was used.

Bioethanol production was performed in a 5 L fermenter with 250 g/kg TS sorghum syrup, pH 4.7 was adjusted with 1 N sulfuric acid, in anaerobic conditions at 30 ± 1 °C. The vacuum extraction was conducted at 20 ± 5 mmHg for the separate 1.25 L fractions of the medium in 2 L Erlenmeyer flasks for 8 min. Following the extraction, the content of the flask was returned to the bioreactor for further fermentation.

2.3. Establishment of Sweet Sorghum Syrup and Fermentation Parameters

The parameters of sweet sorghum syrup, including moisture (water and TS content), ash, pH, titratable acidity were determined according to the AOAC methods [41]. To analyze the water content, the samples were dried at 105 °C until constant weight [42]. The ash content was established by incineration at 600 °C until constant weight [42]. The pH value was checked with pH meter millivoltmeter pH-150-M model (Gomel Plant of Measuring Devices, the Republic of Belarus) standardized against standard buffer solutions.

The content of reducing sugars was analyzed by Lane and Eynon method (ISO 5377:1981) by titration the sample to a

Fehling's solution with methylene blue as an internal indicator. The total sugars (reducing sugars + sucrose) content was analyzed by Lane and Eynon method after the inversion of sucrose with hydrochloric acid at 69 ± 1 °C. Alternatively, digestible carbohydrate content was tested by the biological fermentation method (GOST 31683-2012).

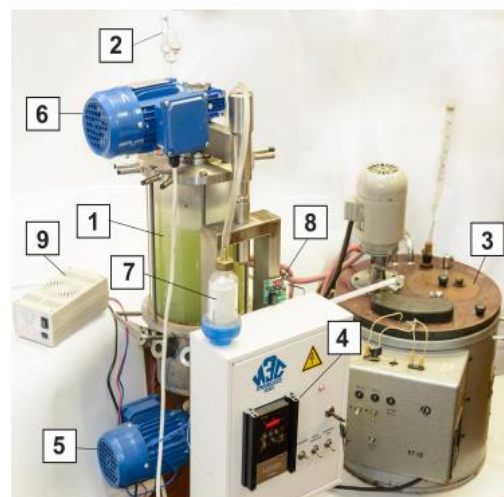


Fig. (3). General view of the fermentation reactor for bioethanol production: 1 – the working chamber of the bioreactor; 2 – hydraulic seal; 3 – thermostatic bath with circuit system; 4 – fermenter control unit with an air compressor; 5 – electric drive of the mixer; 6 – electric drive of mechanical defoamer; 7 – air filter; 8 – thermoregulatory unit; 9 – power supply of the thermoregulatory unit.