

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

«__» __ червня __ 2022р.

«__» __ червня __ 2022р.

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: Культивування *Azospirillum brasilense* для виробництва біопрепарату для підвищення врожайності небобових рослин

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

Кравець Тетяна Сергіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Буценко Людмила Миколаївна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент _____
(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 - 2022р.

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

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Кравець Тетяни Сергіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Azospirillum brasilense* для виробництва
біопрепарату для підвищення врожайності небобових рослин

керівник роботи доцент, доктор біологічних наук, БУЦЕНКО Людмила
Миколаївна

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затвердені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи: продуцент *Azospirillum brasilense* Calf, об'єм
ферментеру - $2,5 \text{ м}^3$, коефіцієнт заповнення – 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Характеристика цільового продукту. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента. Техніко-економічне обґрунтування.
Обґрунтування вибору технологічної схеми. Специфікація обладнання. Опис
технологічної схеми. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема формат А1, технологічна схема формат А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1	04.04.22-09.04.22	Виконано
	Розділ 2	10.04.22-15.04.22	Виконано
	Розділ 3	16.04.22-01.05.22	Виконано
	Розділ 4	02.05.22-07.05.22	Виконано
	Розділ 5	08.05.22-13.05.22	Виконано
	Розділ 6	14.05.22-19.05.22	Виконано
	Розділ 7	20.05.22-25.05.22	Виконано
	Оформлення графічної частини	26.05.22-31.05.22	Виконано
	Виконання графічної частини	01.05.22-01.06.22	Виконано

Здобувач _____
(підпис)

Тетяна КРАВЕЦЬ _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Людмила БУЦЕНКО _____
(ім'я та прізвище)

Зміст

РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	7
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ.....	9
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	9
2.2. Морфолого-культуральні ознаки та фізіолого-біохімічні ознаки	16
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	16
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	17
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	17
3.2. Розрахунок потужності виробництва препарату«VijayaAgro».....	17
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	18
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	18
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	22
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	22
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	22
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	23
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	24
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	26
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	31
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	42
7.1. Мікробіологічний контроль.....	42
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	43
7.2.1. Визначення концентрації біомаси	43
7.2.2. Визначення біомаси.....	43
7.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення	44
ЛІТЕРАТУРА	46

РЕФЕРАТ

Дипломна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схеми біосинтезу бактеріального добрива «VijayaAgro» з використанням штаму бактерій *Azospirillum brasilense* Calf. Технологічний процес біосинтезу включає допоміжні роботи (підготовку стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних агентів для регулювання рН середовища, підготовку та стерилізацію поживних середовищ) та основні роботи (підготовка посівного матеріалу в колбах на качалці, в інокуляторів об'ємом 20 л, 0,25 м³ . та виробничий біосинтез в ферментері об'ємом 2,5 м³).

Дипломний проект складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (17 найменувань), технологічної (формат А2) та апаратурної (формат А1) схем. Загальний обсяг роботи – 47 сторінок, 8 таблиць.

Ключові слова: бактеріальне добриво, *Azospirillum brasilense* Calf, біосинтез.

ВСТУП

Україна є одним з головних постачальників зернових культур на світовий ринок. Цьому сприяють природно-кліматичні умови країни та розвиток сільського господарства. На сьогодні біологічне землеробство є невід'ємною частиною аграрного сектору нашої держави. Застосування препаратів на основі корисних мікроорганізмів покращують живлення рослин, сприяють засвоєнню азоту та фосфору, що впливає на урожайність культур та якість продукції. Азотофіксуючі мікроорганізми як основа біопрепаратів є важливим чинником поліпшення азотного живлення рослин та азотного фону ґрунту в цілому. Діазотрофи можуть замінити частину азоту мінеральних добрив, а отже, ми отримуємо на порядок дешевший і екологічно безпечний біологічний азот. Вивчення впливу азотофіксувальних мікроорганізмів на мікробний ценоз ризосфери інокульованих рослин дозволить більш широко уявляти і розуміти закономірність взаємодії аборигенної мікрофлори з біоагентами мікробних препаратів. Важливим аргументом на користь застосування біопрепаратів є те, що вони екологічно безпечні та мають порівняно низьку вартість, проте їх ефективність значною мірою залежить від культури землеробства[1].

Отже, новизна даної теми дипломної роботи полягає в тому, у пошуку препаратів на основі азотофіксувальних мікроорганізмів і створення нового препарату з монокультурою *Azospirillum brasilense* Calf, який можна було б застосовувати для підвищення врожайності сільськогосподарських культур і водночас запобігати забрудненню навколишнього середовища синтетичними сполуками.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Кравець Т.С.</i>						6	47
<i>Керівник</i>	<i>Биценко ЛМ.</i>							6
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

На сьогоднішній день, альтернативною хімічним засобам захисту рослин можуть стати біопрепарати. Біопрепарати – це біологічні препарати, які використовують для профілактики, лікування і діагностики інфекційних захворювань [2]. Основою біопрепаратів є група бактерій, що називається PGPR (plant growth promoting rhizobacteria – бактерії, що стимулюють ріст рослин). Такі бактерії виконують ряд важливих функцій, завдяки яким позитивно впливають на ріст і розвиток рослин, зокрема:

- підвищення доступності елементів живлення (солубілізація фосфатів та калію);
- синтез фітогормональних сполук (ауксини, цитокініни, гібереліни);
- фіксація азоту;
- продукування сідерофорів для розчинення заліза;
- захист рослин від абіотичних стресів;
- утворення екзополісахаридів та ін. [3-4].

До PGPR відносяться азотфіксувальні бактерії *Azospirillum brasilense*.

Вони є асоціативними азотфіксуючими бактеріями, що колонізують ризосферу та ризоплану рослини. Вони фіксують атмосферний азот в безпосередній близькості до кореня, сприяють його засвоєнню [5].

Біопрепарат на основі *A. brasilense* використовується для підвищення врожайності небобових рослин, таких, як рис, ячмінь, пшениця, гречка тощо. Бактерії характеризуються, перш за все, здатністю до фіксації азоту.

На основі *A. brasilense* розроблено препарати як з монокультурою мікроорганізмів, так і в якості разом з іншими бактеріями:

- Біонорма Азот (BioNorma). Містить вільноживучі азотфіксувальні бактерії: *Azotobacter chroococcum*, *A. vinelandii* та асоціативні

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Кравець Т.С.</i>						7	47
<i>Керівник</i>	<i>Бищенко Л.М.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

азотфіксувальні бактерії *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*. Використовується для покращення азотного живлення широкого кола сільськогосподарських культур, привносить у ґрунт від 30 до 80 кг/га азоту за вегетаційний період [6].

– «VijayaAgro» - містить культуру *A. brasilense*, використовується як інокулянт для зернових та кормових культур.

«VijayaAgro» – біодобриво для внесення азоту, що складається з біомаси *Azospirillum*. Бактерії роду *Azospirillum* є азотфіксаторами, природніми місцями існування яких є земля біля рослинних коренів та сама їх поверхність.

Механізм дії «VijayaAgro» полягає в тому, що внесене добриво асимілює атмосферний азот та фіксує його у ґрунті, де він легко засвоюється рослинами. Крім цього, це добриво сприяє швидкому росту рослин, ранньому куцінню за рахунок виділення рослинних факторів росту; збільшує щільність і розгалуження коренів, що призводить до кращого поглинання мінералів та води.

«VijayaAgro» може фіксувати 20-50 кг азоту на гектар за один урожайний сезон і може залишити значну кількість азоту в ґрунті до наступного врожаю[7].

Отже, цей препарат характеризується поліфункціональною дією, що забезпечує біологічну азотфіксацію, стимуляцію росту. Він є безпечним для людини і не завдає шкоди навколишньому природному середовищу. Його застосування не потребує високих енергетичних та матеріальних витрат.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

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

Серед ризобактерій, що сприяють росту рослин (PGPR), *Azospirillum brasilense* є одним з найбільш часто використовуваних і досліджуваних завдяки своїй здатності підвищувати врожайність сільськогосподарських культур. Вони є асоціативними азотфіксуєчими бактеріями, що колонізують ризосферу та ризоплану рослини. Фіксують атмосферний азот в безпосередній близькості до кореня, сприяють його засвоєнню. Бактерії характеризуються, перш за все, здатністю до фіксації азоту. N є найбільш життєво-важливою поживною речовиною для росту і продуктивності рослин. Хоча в атмосфері міститься майже 78% N₂, він недоступний для рослин. Атмосферний N₂ перетворюється у форми, доступні для рослин, за допомогою процесу біологічної азотфіксації (BNF), за допомогою якого N₂ перетворюється в NH₃ мікроорганізмами, що фіксують N₂. Процес фіксації N₂ каталізується складним ферментом відомий як комплекс нітрогенази, що пояснюється головним чином посиленням[8].

З таблиці 2.2, можна засвідчити, що найбільшу кількість біомаси виділяє саме штам *Azospirillum brasilense* Calf, а головним показником вибору біологічного агента для біодобрива є кількість синтезованої біомаси. Також під час вибору біологічного агента слід звернути увагу на ціну середовища для культивування, яка вказана у таблиці 2.3. Дані таблиці свідчать про те, що середовище для культивування штаму *Azospirillum brasilense* Calf є найдешевшим.

Для остаточного вибору найкращого біологічного агента слід

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>							
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА ТА ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЙОГО КУЛЬТИВУВАННЯ</i>			<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>		
<i>Розробник</i>	<i>Кравець Т.С.</i>									9	47	
<i>Керівник</i>	<i>Бущенко Л.М.</i>							<i>Кафедра БТМ</i> ⁹				
<i>Н. контр</i>												
<i>Консульт</i>												
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>											

розрахувати умовну вартість 1г цільового продукту (таблиця 2.4). Дані, наведені у таблиці 2.4, вказують на те, що найнижча вартість цільового продукту належить саме штаму *Azospirillum brasilense* Calf.

Отже, найкращим біологічним агентом є штам *Azospirillum brasilense* Calf.

Таблиця 2.1

Особливості одержання біомаси *Azospirillum brasilense* на ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація клітин, КУО/мл	Концентрація біомаси, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	Компонент	Концентрація, г/л					
1	2	3	4		5	6	7
<i>A. brasilense</i> <i>Start</i>	Яблучна кислота K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O NaCl CaCl ₂ FeSO ₄ Na ₂ MoO ₄ MnSO ₄ KOH NH ₄ Cl H ₃ BO ₃ Дріжджовий екстракт	5,0 0,5 0,2 0,1 0,02 0,012 0,0015 0,001 4,8 0,3 0,01 0,3	26	2,8*10 ⁸	0,96	Культивування в колбах(500мл) Ерленмейера з 100мл середовища (t°=30 °C, 150 об/хв.)	Trujillo-Roldán, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Gonzalez-Monterrubio, C. F., Acevedo-Sánchez, E. V., Martínez-Salinas, C., García-Cabrera, R. I., ... Blancas-Cabrera, A. (2013). Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium <i>Azospirillum brasilense</i> for preparing a liquid inoculant formulation. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> , 97(22), 9665–9674. doi:10.1007/s00253-013-5199-9
<i>A. brasilense</i> <i>Calf</i>	Яблучна кислота K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ *7H ₂ O NaCl CaCl ₂ FeSO ₄ Na ₂ MoO ₄	5,0 0,5 0,2 0,1 0,02 0,012 0,0025	24	7,80*10 ¹⁰ 7,80*10 ¹³	1,36	Культивування в колбах(500мл) Ерленмейера з 100мл середовища (t°=30 °C, 150 об/хв.)	Carrasco-Espinosa, K., García-Cabrera, R. I., Bedoya-López, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2015). Positive effect of reduced aeration rate on growth and

	MnSO4 KOH NH4Cl H3BO3 Дріжджовий екстракт	0,01 4.8 0,3 0.01 0.3					stereospecificity of dl-malic acid consumption by <i>Azospirillum brasilense</i> : Improving the shelf life of a liquid inoculant formulation. <i>Journal of Biotechnology</i> , 195, 74–81. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.12.020
<i>A. brasilense Cd</i>	DL-малат NaOH MgSO4*7H2O CaCl2 NaCl NH4Cl Дріжджовий екстракт Na2MoO4·2H2O MnSO4 H3BO3 Cu(NO3)2*3H2O ZnSO4**7H2O Дист H2O K2HPO4 KH2PO4 Дист H2O	5 3 0.2 0.02 0,1 1 0.1 0,002 0,0021 0,0028 0.04 0,24 900 мл 6 4 100 мл	24	2,4*10 ⁹	1,17	Культивування в колбах(500мл) Ерленмейера з 120мл середовища (t°=36 °C, 120 об/хв.)	Bashan, Y., Trejo, A., & de-Bashan, L. E. (2011). Development of two culture media for mass cultivation of <i>Azospirillum spp.</i> and for production of inoculants to enhance plant growth. <i>Biology and Fertility of Soils</i> , 47(8), 963–969. doi:10.1007/s00374-011-0555-3

<i>A. brasilense</i> Sp7	Малат	3	48	2.1*10 ⁸	1,06	Культивування в колбах(250мл) з 50мл середовища (t°=32°,120 об/хв)	Mulyukin, A. L., Suzina, N. E., Pogorelova, A. Y., Antonyuk, L. P., Duda, V. I., & El-Registan, G. I. (2009). Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in <i>Azospirillum brasilense</i> . <i>Microbiology</i> , 78(1), 33–41. doi:10.1134/s0026261709010056
	Дріжджовий екстракт	0,1		(перед термообробкою)			
	K ₂ HPO ₄	3,0					
	KH ₂ PO ₄	2,0					
	NH ₄ Cl	1,5					
	MgSO ₄ · 7H ₂ O,	0,2					
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,1		2,0*10 ⁴			
	CaCl ₂	0.02		(після термообробки)			
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.02					
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.002					

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування *Azospirillum brasilense*

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	4	5	6
<i>A. brasilense Start</i>	малат	5,0	68,00	0,34	1
	K ₂ HPO ₄	0,5	117,00	0,0585	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	9,60	0,00192	3
	NaCl	0,1	4,50	0,00045	4
	CaCl ₂	0,02	13,84	0,000277	5
	FeSO ₄	0,012	25,00	0,0003	6
	Na ₂ MoO ₄	0,0015	510,00	0,000765	7
	MnSO ₄	0,001	32,40	0,0000324	8
	KOH	4,8	36,00	0,1728	9
	NH ₄ Cl	0,3	27,00	0,0081	10
	H ₃ BO ₃	0,01	27,00	0,0003	11
	Дріжджовий екстракт	0,03	1 100,00	0,055	12
Вартість 1 л середовища – 0,65 грн					
<i>A. brasilense Calf</i>	малат	5,0	68,00	0,34	1
	K ₂ HPO ₄	0,5	117,00	0,0585	2
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	9,60	0,00192	3
	NaCl	0,1	4,50	0,00045	4
	CaCl ₂	0,02	13,84	0,000277	5
	FeSO ₄	0,012	25,00	0,0003	6
	Na ₂ MoO ₄	0,0025	510,00	0,001275	7
	MnSO ₄	0,01	32,40	0,0000324	8
	KOH	4,8	36,00	0,1728	9
	NH ₄ Cl	0,3	27,00	0,0081	10
	H ₃ BO ₃	0,01	27,00	0,0003	11
	Дріжджовий екстракт	0,03	1 100,00	0,055	12
Вартість 1 л середовища – 0,64 грн					
<i>A. brasilense Sp7</i>	малат	3	68,00	0,204	1
	Дріжджовий екстракт	0,1	1 100,00	0,11	12
	K ₂ HPO ₄	3,0	117,00	0,351	2
	KH ₂ PO ₄	2,0	49,00	0,098	13
	NH ₄ Cl	1,5	27,00	0,0405	10
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	9,60	0,00192	3
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,1	75,00	0,0075	14
	CaCl ₂	0,02	13,84	0,2768	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02	39,00	0,00078	15
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002	870,00	0,00174	16
Вартість 1 л середовища – 1,09 грн					
	малат	5,0	68,00	0,34	1
	NaOH	3	27,60	0,0828	18
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	9,60	0,00192	3

<i>A. brasilense</i> Cd	CaCl ₂	0.02	13,84	0,2768	5
	NaCl	0,1	4,50	0,00045	17
	NH ₄ Cl	1	27,00	0,027	10
	Дріжджовий екстракт	0,1	1 100,00	0,11	12
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002	870,00	0,00174	16
	MnSO ₄	0,0021	32,40	0,00007	8
	H ₃ BO ₃	0,0028	27,00	0,00008	11
	Cu(NO ₃) ₂ *3H ₂ O	0.04	82,20	0,0033	19
	ZnSO ₄ **7H ₂ O	0,24	75,00	0,018	20
	Дист H ₂ O	900 мл			
	K ₂ HPO ₄	6	0,5	0,003	2
	KH ₂ PO ₄	4	49,00	0,196	13
	Дист H ₂ O	100 мл			
Вартість 1 л середовища – 1,04грн					

- 1 – <https://prom.ua/p880263868-yablochnaya-kislota-e296.html?>
- 2 - <https://kiev.prom.ua/p953593209-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
- 3 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>
- 4 - <https://prom.ua/p273983668-natrij-hloristyj.html>
- 5 - <https://prom.ua/p790369665-kaltsij-hlorid-kitaj.html>
- 6 - <https://prom.ua/p1033368518-zheleznyj-kuporos-sulfat.html?>
- 7 - <https://dnepropetrovsk.flagma.ua/uk/natriy-molibdat-natriy-molibdenovokisly-o10137017.html>
- 8 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu>
- 9 - <https://kiev.prom.ua/p188485612-kalij-gidrookis-tehnicheskij.html>
- 10 - <https://kiev.prom.ua/p1153980651-hlorid-ammoniya.html?>
- 11 - <https://prom.ua/p1291301047-bornaya-kislota.html?&primelead=My4zMw>
- 12 - <https://kiev.prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 13- <https://kiev.prom.ua/p1059869951-monofosfat-kaliya.html?>
- 14 - <https://prom.ua/p582705996-marganets-sulfat-monogidrat.html>
- 15 - <https://prom.ua/p906515039-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html?&primelead=MS4wMw>
- 16 - <https://prom.ua/p505512728-natrij-molibdenovokislyj-vodnyj.html?&primelead=My4xMw>
- 17 - <https://kiev.prom.ua/p273983668-natrij-hloristyj.html>
- 18 - <https://prom.ua/p1245372585-soda-kausticheskaya-granulirovannaya.html?&primelead=My4z>
- 19 - https://russian.alibaba.com/product-detail/copper-nitrate-trihydrate-cas-10031-43-3-cu-no3-2-3h2o-60579062199.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.5f4b45c66koVkd
- 20 - <https://prom.ua/p1068745110-tsink-sulfat-sulfat.html?&primelead=MS4wOQ>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г біомаси *Azospirillum brasilense*

Біологічний агент	Концентрація біомаси	Тривалість культивування, год	Кількість цільового продукту, синтезованого за год	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>A. brasilense Start</i>	0.96	26	0,04	0,65	0,678
<i>A. brasilense Calf</i>	1.36	24	0,06	0,64	0,471

<i>A. brasilense</i> Sp7	1,09	48	0,02	1,09	1
<i>A. brasilense</i> Cd	1,17	24	0,05	1,04	0,889

2.2. Морфолого-культуральні ознаки та фізіолого-біохімічні ознаки

Azospirillum brasilense - грамнегативні прямі або злегка зігнуті рухомі палички. Мають розмір 0,9-1,2 мкм. Мають один або кілька джгутиків, розташованих латерально або на кінці. За Грамом фарбуються негативно. Спор не утворюють, капсул не мають. Колонії на діагностичному малатно-сольовому середовищі дрібні (\varnothing 2–3 мм), сухі, білі або злегка розові.



Рис. 2.1. Електронна мікроскопія клітин *Azospirillum brasilense* Є аеробами. Температурний оптимум для їх розвитку та росту варіює від 34 до 37°C. Оптимальний діапазон рН= 5,5 - 8,5 (6,5) [9].

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна (філогенетична) класифікація для *Azospirillum brasilense* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [10].

Домен - *Bacteria*

Відділ - *Proteobacteria*

Клас - *Alphaproteobacteria*

Порядок: *Rhodospirillales*

Родина - *Rhodospirillaceae*

Рід - *Azospirillum*

Вид - *Azospirillum brasilense*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

«VijayaAgro» - біопрепарат на основі азотфіксуючої бактерії *Azospirillum brasilense* Calf. Ці бактерії сприяють підвищенню доступності елементів живлення (солубілізація фосфатів та калію), фіксації азоту; захист рослин від абіотичних стресів.

Чернігівська область вважається рекорсменом з збору урожаю кукурудзи. Станом на грудень 2021 року було зібрано 43 353,7 тис. ц кукурудзи із площі 445,3 тис.га[11].

Для всієї аграрної площі Чернігівської області 92 % припадає на удобрення мінеральними добривами, а на органічні добрива, а саме мул, торф та його субстрати, послід свійської птиці та бактеріальні добрива - 3,3%. Зважаючи на конкуренцію на ринку різних типів добрив, приймаємо за потребу забезпечити 9813 га аграрних площ, що використовуються для засіву кукурудзи Чернігівської області.

Витрати препаратом «VijayaAgro»

0,5 л препарату – 0,2 га

X л – 445,3 тис.га

X= 1 113 250 л препарату

Отже, для обробки 9813 га потрібна така кількість препарату:

1 113 250 л – 445300 га

X л – 9813 га

X= 24 532 л препарату

3.2. Розрахунок потужності виробництва препарату «VijayaAgro»

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виробництві (5%), необхідна кількість культуральної рідини складає:

$$V_{кр} = 24\ 532 / (1 - 0,05) = 25\ 823 \text{ л}$$

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>		<i>Кравець Т.С.</i>			<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>		<i>Біценко Л.М.</i>					17	47
<i>Н. контр</i>								17
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ</i>		

Прийmemo кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 31, тому що даний біопрепарату є сезонним продуктом і немає необхідності випускати його протягом всього календарного рокує. Тоді кількість продукту на добу ($V_{д}$) становитиме:

$$V_{д} = V_{кр}/T_{рд} = 25823/31 = 833 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Кількість цільового продукту за цикл становитиме:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot V_{д} \cdot T_{цф})/24 = (1,1 \cdot 833 \cdot 33)/24 = 1260 \text{ л/цикл}$$

$T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд - 2 год, перевірка на герметичність - 2 год, стерилізація апарату - 2 год, охолодження ферментера – 1 год, завантаження поживного середовища - 1,5 год, засів культурою - 0,5 год та ферментація - 24 год). K_1 – коефіцієнт запасу(1,1)

Наступним етапом розраховуємо геометричний об'єм ферментера:

$$V_{г} = V_{цк} / K_{зап} = 1260/0,6 = 2100 \text{ л (2,1 м}^3\text{)}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення, обравши ферментер об'ємом 2,5 м³

$$K_{зф} = V_{цк}/V_{ф} = 1,26/2,5 = 0,5,$$

що не перевищує заданого значення.

Обираємо ферментер з геометричним об'ємом у 2,5 м³.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують 1,26 м³ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 - 15%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-Eф) = 1,26/(1-0,1) = 1,4 \text{ м}^3,$$

де $Eф$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 1,4 \text{ м}^3$. За коефіцієнтом заповнення, який становить $K_{зап} = 0,5-0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 1,4/0,6 = 2,3 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 2,5 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 1,4/2,5 = 0,56$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\text{ф}}) = 1,4/(1+0,1) = 1,27 \text{ м}^3,$$

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

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1,4 - 1,27 = 0,13 \text{ м}^3, (130 \text{ л})$$

Для одержання $0,13 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}}/(1-E_{\text{па}}) = 0,13/(1-0,1) = 0,14 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже кількість поживного середовища в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}}/(1+X_{\text{па}}) = 0,14/(1+0,1) = 0,13 \text{ м}^3$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 0,14 - 0,13 = 0,01 \text{ м}^3, (10 \text{ л.})$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.2}} = 0,14 \text{ м}^3$ можна отримати під час культивування бактерій у посівному апараті геометричним об'ємом

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}}/K_{\text{зап}} = 0,14/0,6 = 0,23 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 0,25 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{з1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 0,14 / 0,25 = 0,56$$

Для отримання 10 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 10 / (1 - 0,10) = 11,1 \text{ л.}$$

Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде:

$$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 11,1 / (1 + 0,1) = 10,1 \text{ л,}$$

де $X_{ін} = 0,1$ - доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становитиме

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 11,1 - 10,1 = 1 \text{ л.}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора

$$V_{ін} = V_{роб.3} / K_{зап} = 11,1 / 0,6 = 19 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 20$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сф}} = \frac{11,1}{20} = 0,55$$

Для отримання 10,1 посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять 10-15%

Отже кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{ін}) = 10,1 / (1 - 0,10) = 11,2 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу для малого інокулятора становить 10% від об'єму поживного середовища в малому інокуляторі

Отже кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 11,2 / (1 + 0,1) = 10,18 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу становитиме

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 11,2 - 10,18 = 1,04 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб.4}} = 11,2$ л можна отримати під час культивування бактерій в інокуляторі об'ємом

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 11,2 / 0,6 = 19 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер - 20 л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{11,2}{20} = 0,56$$

Для отримання 1,04 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} * K_{\text{зп}}) = 1040 / (750 * 0,2) = 6,93$$

Таким чином, для отримання посівного матеріалу необхідно 7 качалочних колб.

Отже, процес отримання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу препарату «VijayaAgro» у ферментері об'ємом $2,5 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0.6 буде проходити у 3 етапи. Для біосинтезу біодобрива на основі штаму бактерій роду *Azospirillum brasilense* Calf потрібен ферментер, об'ємом $2,5 \text{ м}^3$, інокулятори об'ємом 20 л, $0,25 \text{ м}^3$.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Для культивування аеробних азотфіксуючих бактерій *A. brasilense* Calf оптимальними умовами є: температура 30° С та рН дорівнює 7,5. Також в середовищі для культивування немає джерела азоту, бо *A. brasilense* Calf є азотфіксувальною бактерією, яка фіксує азот з повітря.

Оскільки оптимальне значення рН нейтральне, то можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними і нейтрофільними мікроорганізмами. Це зумовлює необхідність забезпечення асептичних умов під час біосинтезу, чого неможливо досягти при поверхневому (твердо-фазовому) культивуванні. Асептичні умови забезпечуються стерилізацією обладнання і комунікацій, поживного середовища, аераційного повітря, (необхідного для забезпечення росту *A. brasilense* Calf, оскільки біологічний агент є аеробом), піногасників. Для запобігання контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря. У зв'язку з викладеним вище, культивування *A. brasilense* Calf здійснюють глибинним способом.

A. brasilense Calf - це аероб. Для культивування мікрорганізма в аеробних умовах слід використовувати аераційне повітря. Для контролю рівня тиску, який створюється під час подачі аераційного повітря в ферментер потрібно використовувати манометр.

Оскільки в процесі біосинтезу не відбувається утворення міцелію, не накопичуються метаболіти, які підвищують в'язкість середовища, і процес не вимагає дуже інтенсивного масообміну, пропонується використовувати найдешевшу та найпростішу за конструкцією мішалку – лопатеву. Ферментер має бути оснащений паровою сорочкою, мішалками, манометрами, стерилізувальними повітряними фільтрами, відбійниками, що

					НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4.	Літера	Аркцш	Аркцшв
Розробник	Кравець Т.С.						22	4722
Керівник	Бищенко Л.М.							
Н. контр								
Консульт								
Зав. каф.	Стадніков В.П.							
						Кафедра БТМ		

забезпечують необхідний температурний, газовий і гідродинамічний режими в біореакторі (тобто процеси масо- і теплообміну)

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Азотфіксуючі бактерії *A. brasilense* Calf є аеробами, тому необхідною умовою їх розвитку є подача стерильного аераційного повітря у ферментер. Підготовку повітря потрібно здійснювати для очищення його від механічних часток, джерел контамінації.

Забір повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці бодівлі на висоті приблизно 20 м. Із повітрязабірника повітря потрапляє у фільтри попередньої очистки, в яких звільняється від грубого пилу. Потім повітря потрапляє у другу підсистему, де проводиться його стиснення у турбокомпресорі до 0.35-0.5 МПа для випадіння зайвої вологи, адже конденсат може зіпсувати фільтри, які будуть використовуватися на наступних стадіях очистки.

Конденсування повітря проводять так:

При потраплянні повітря до другої підсистеми під дією компресора воно нагрівається до температури 120-150⁰С. Для забезпечення осідання вологи у краплевловлювач повітря переохолоджують до температури 20-40⁰С в теплообмінному апараті. Наступним етапом повітря знову нагрівають до температури 70-90⁰С, адже при таких температурах осідання конденсату неможливе. Третя підсистема складається із двох фільтрів другого(E=95%) та третього(E=99,99%) рівня очищення де відбувається остаточне очищення повітря від забруднення. Фільтри третього рівня встановлюють безпосередньо перед кожним ферментером [12].

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють із посівною культурою та інокулятом повітря стерилізують за допомогою УФ-лампи.

Очищення відпрацьованого повітря. У процесі ферментації утворюється велика кількість відпрацьованого повітря, яке може містити різні органічні сполуки, культуральну рідину у вигляді крапель.

Відпрацьоване повітря через колектор подається на головний фільтр, де воно очищається від всіх залишків процесу.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Обґрунтування вибору мийного засобу для оброблювальних об'єктів

Виробництво біодобрива на основі *Azospirillum brasilense* здійснюється упродовж 45 днів. Відомо, що внутрішній діаметр ферментера, об'ємом 3.2 м³ становить 1.4 м, а інокулятора, об'ємом 0.40 м³ - 0.8 м. Внутрішній діаметр інокулятора об'ємом 40 літрів становить 0.4 м. Поверх ферментера буде знаходитися рубашка для забезпечення теплообміну середовища. Її товщина буде становити 25-50 см. Відстань між ферментом та стінами повинна становити не менше одного метра, а між ферментом та інокулятором- не менше 2 м для забезпечення безпечного та швидкого переміщення персоналу й зручного встановлення комунікацій. Отже площа підлоги з урахуванням усіх вимог буде становити приблизно 58 м² (13.17x4.4 м). Висота стін- 2.5 м, отже загальна їх площа буде становити $((13.7 \times 2.5) + (4.4 \times 2.5)) = 45.25$ м², а площа підлоги- 58 м².

Наступним етапом визначаємо площу поверхонь, які потрібно дезінфікувати та мити. Ферментер, інокулятори, стіни, двері, вікна миють та дезінфікують перед початком виробничого процесу, а підлогу миють перед кожною зміною 1-3 рази на добу.

Dezaldum 20– засіб для дезінфекції та миття поверхонь на об'єктах харчопереробної промисловості та підприємствах агропромислового комплексу, фармацевтичної, хімічної, біотехнологічної промисловості, тощо. Діючі речовини: мас.%, 16,5–19,75 алкілдиметилбензиламоній хлорид; 10,5–11,5 глутаровий альдегід). Норма витрат готового розчину становить 100 мл на 1 кв.м(згідно з методичними рекомендаціями щодо застосування дезінфікуючого засобу з мийним ефектом DEZALDUM 20). Робочий розчин з концентрацією 0.5% на 10 л готують так: у емальовані, склянні або пластмасові ємності додають 50 мл засобу та 9950 мл води кімнатної температури. Час знезараження становить 5 хвилин. Робочий розчин

зберігається протягом 2 тижнів[12].

ДЕЗОлайт – засіб для профілактичної, поточної та заключної дезінфекції з комплексом четвертинних амонійних сполук – 13,0±2% в т.ч. алкілдиметилбензиламоній хлорид – 6,0-7,0%, дидецилдиметиламоній хлорид – 7,0±8%; лютензол (неіонногенна ПАВ) – 3,0±0,5%; функціональні домішки (етилендіамінтетраацетату – 3,0±0,5%; натрій метасилікату 5-водного – 0,3%; запашка - 0,2%), вода – до 100%).%). Норма витрат готового розчину становить 100 мл/м². Робочий розчин з концентрацією 0.5% на 10 л готують так: у промаркований скляний, емальований, пластмасовий посуд додають 50 мл засобу та 9950 мл теплої води. Готовий розчин зберігає свою активність протягом 28 діб[13].

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 5.1

По зи ція	Найменування	К- ть	Технічна характеристика	Джерела
1	2	3	4	5
ПЗ-1	Повітрязабірний пристрій	1	Повітрязабірний пристрій АІИ 020.000-01 Прилад обладнаний металевією сіткою для видалення механічних забруднень. Робочий тиск: до 0,6 МПа (6 кгс/см ²) та до 1,2 МПа (12 кгс/см ²). Фірма: «НПЦ Вектор-Кондвент».	1
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр G3(ФВК-65-600-6-G3/25). Фільтруючий матеріал – синтетичне поліестерове хімволокно. Продуктивність - 2800 м ³ /год. Виробник: Компанія «Luxfilter».	2
К-3	Компресор	1	Компресор Inversys 5 Plus. Продуктивність: 0.91 м ³ /хв. Максимальний робочий тиск 0,75 МПа. Виробник: «Dalgakiran» (Туреччина)	3
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач повітря СWK 250-3-2,5 (Systemair). Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), вихідна температура повітря 17-18 °С. Виробник: «Systemair»	4

НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ

Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник		Кравець Т.С.			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літера	Аркиш	Аркишів
Керівник		Біценко Л.М.					26	47
Н. контр						26		
Консульт						Кафедра БТМ		
Зав. каф.		Стадніков В.П.						

P-5	Ресивер	1	Ресивер серії РВ 230/10 фірми «В-compressor», об'єм 230 л, робочий тиск до 1,6 МПа, продуктивність 1200 л/хв. [5]	5
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітрянагрівач водяний VBC 315-2 (Systemair). Вихідна температура 35-40 ⁰ С. Максимальний робочий тиск 1,6 МПа (16 бар), робоча температура 150 ⁰ С. Виробник: «Systemair» (Швеція)	4
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Панельний осередковий фільтр класу F9. Фільтруючий матеріал мікроскловолокно. Максимальна робоча температура: 80 ⁰ С.Продуктивність: 3400 м ³ /год. Ступінь очищення становить 90- 99 %	6
Ф-11 Ф-15 Ф-20	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтр повітряний <i>Ultradepth II P-SRF</i> . Фільтруючий матеріал - боросилікат, діапазон температур від -20 до 200 ⁰ С, ступінь очищення повітря фільтром становить 99,999 %	7
P-8	Реактор для приготування хлоридної кислоти	1	Реактор-змішувач об'ємом 6 л, оснащений сорочкою нержавіюча сталь AISI 304	8
P-9	Реактор для приготування та стерилізації натрій гідроксиду	1	Реактор-змішувач об'ємом 6 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (до 450 об/хв),нержавіюча сталь AISI 304.	9

P-10	Реактор-змішувач для приготування композиції Б для інокулятора об'ємом 20 л		Реактор-змішувач об'ємом 20 л з мішалкою (24-30 об/хв). Робочий тиск:0,05-0,1 МПа. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 314. Виробник: «Технолог»	10
I-12	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 20 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), матеріал : нержавіюча сталь AISI 304. Габарити(В*Ш*Д),мм:1355*515*515 [10]	11
H-13	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Sprut TTDF 55-71 Продуктивність :917 л/хв , потужність: 11 кВт. Габарити(В*Ш*Д),мм:1370*280 [11]	12
P-14	Реактор-змішувач для приготування композиції Б для інокулятора об'ємом 250 л	1	Реактор-змішувач об'ємом 250 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (до 450 об/хв), робочий тиск :0,05-0.25 МПа нержавіюча сталь AISI 304.	13
I-16	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 20 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), матеріал : нержавіюча сталь	14

			AISI 304.	
H-17	Насос відцентровий		Насос відцентровий Sprut TTDF 55-71 Продуктивність :917 л/хв , потужність: 11 кВт. Габарити(В*Ш*Д),мм:1370*280 [11]	12
P-18	Реактор-змішувач для приготування композиції А для інокулятора об'ємом 250 л	1	Реактор-змішувач об'ємом 250 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (до 450 об/хв), робочий тиск :0,05-0.25 МПа нержавіюча сталь AISI 304. [8]	16
P-19	Реактор-змішувач для приготування композиції Б для інокулятора об'ємом 2,5 м ³	1	Реактор-змішувач об'ємом 250 л, оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (до 450 об/хв), робочий тиск :0,05-0.25 МПа нержавіюча сталь AISI 304. [8]	17
Ф-21	Ферментер	1	Ферментер об'ємом 2,5 м ³ , оснащений сорочкою, барботером, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (1000-2600 об/хв), нержавіюча вуглеводнева сталь AISI 316L. Робочий тиск : 35 МПа. Виробник: Acometi, № 8511.[19].	18
H-22	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий Sprut TTDF 55-71 Продуктивність :917 л/хв , потужність: 11 кВт. Габарити(В*Ш*Д),мм:1370*280 [11]	12

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

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

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою турбокомпресора через забірну шахту, яка розташована на висоті 20 м. Повітрозабірник (ПЗ 1) обладнаний металевою сіткою для зменшення кількості забруднення, яке може попасти у систему повітязабору.

ДР 1.2. Попередня очистка повітря

Повітря із повітрозабірника потрапляє у фільтр грубої очистки (Ф 2) продуктивністю 2800 м³/год.

ДР 1.3. Стиснення повітря

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

ДР 1.4. Охолодження повітря та виділення зайвої вологи

Повітря охолоджують та конденсують за допомогою теплообмінника-охолоджувача (Т 4). Щоб забезпечити випадання вологи повітря переохолоджують до температури 25-45°C та концентрації W= 60-70% за допомогою теплообмінника (Т 4).

ДР 1.5. Нагрівання повітря

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

ДР 1.6 Очистка на головному фільтрі

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

ДР 1.7 Очистка на індивідуальних фільтрах

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Кравець Т.С.</i>					31	47
<i>Керівник</i>		<i>Бущенко Л.М.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>					31	
						<i>Кафедра БТМ</i>		

Із головного фільтра повітря потрапляє на фільтри індивідуальної очистки(Ф 11, Ф 15, Ф 20), які встановлюються перед кожним апаратом.

ДР 2. Приготування та стерилізація допоміжних розчинів

ДР 2.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування запасного концентрованого розчину мікроелементів на технічних терезах зважують 0,3г Na_2MoO_4 , 1,2 MnSO_4 , 1,2 H_3BO_3 , 1,44 г FeSO_4 . Наважку поміщають в колбу об'ємом 2 л, додають 1 л дистильованої води, перемішують та закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$ (40 хв). У середовище вносять вносять піпеткою 12 мл композиції В.

ДР 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних терезах зважують 0,6 KH_2PO_4 . Наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл, додають 291 мл питної води, перемішують та закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$ (40 хв).

ДР 2.1. Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживних середовищ

ДР 2.2.1. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 20 л

Для 10 літрів поживного середовища потрібно приготувати 24 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для його підкислення в посівному апараті об'ємом 20 л.

У колбу на 100 мл наливають 20 мл дистильованої води і за допомогою піпетки додають, при перемішуванні, 4 мл концентрованої 36% хлоридної кислоти.

ДР 2.2.2. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 250 л

Для 120 л поживного середовища потрібно використати 240 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для його підкислення в посівному апараті об'ємом

200 л.

У колбу на 750 мл вносимо 200 мл дистильованої води і додаємо, при перемішуванні, 40 мл концентрованої 36% хлоридної кислоти, яку відміряємо мірним циліндром.

ДР 2.2.3. Приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 2,5 м³

Для 1200 л поживного середовища потрібно використати 2400 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для його підкислення в посівному апараті об'ємом 2000 л.

Для приготування 2400 мл 6% розчину HCl слід використовувати збірник на 3 л.

Через дозатор подаємо, при постійному перемішуванні при W= 1000-150 об/хв, 2 л питної води та 400 мл 36% хлоридної кислоти.

ДР 3.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH

ДР 3.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 20 л

Для 12 літрів поживного середовища потрібно приготувати 24 мл розчину 6% NaOH для його підлучення в посівному апараті об'ємом 20 л.

Для цього на технічних терезах зважують 1,44 г кристалічного NaOH та поміщають наважку у колбу на 50 мл, додають піпеткою 24 мл дистильованої води і ретельно перемішують до повного розчинення кристалів та закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію розчину проводять в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) впродовж 40 хв.

ДР 3.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлучення поживного середовища в посівному апараті об'ємом 250 л

Для 120 літрів поживного середовища потрібно приготувати 240 мл розчину 6% NaOH для його підлучення в посівному апараті об'ємом 200 л.

Для приготування 240 мл розчину 6% NaOH на терезах зважуємо 14,4 г кристалічного натрію. Наважку поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 240 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення та

закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізацію проводять в автоклаві при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3.2.3. Приготування 6% розчину NaOH для підлужнення поживного середовища посівному апараті об'ємом 2,5 м³

Для 1200 літрів поживного середовища потрібно приготувати 2400 мл розчину 6% NaOH для його підлужнення в посівному апараті об'ємом 2000 л.

Для приготування такого об'єму розчину потрібно зважити на терезах 144 г кристалічного натрію. Наважку поміщають у збірник з сорочкою та перемішуючим пристроєм. Об'єм збірника повинен становити 5 л. Після додавання наважки додають 2,4 л питної води та стерилізують при 131°C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Для вирощування інокуляту на колбах необхідно 1,04 л поживного середовища

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

Таблиця 4.1

Компонент поживного середовища	Вміст, в г\л	К-сть для приготування 1,04 л середовища, г	Компози-ції	Об'єм композиції V, мл
Малат	5	6	А	365
Дріжджовий екстракт	0,3	0,36		
Вода		358		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	0,24	Б	432
NaCl	0,1	0,12		

CaCl ₂	0,02	0,024		
KOH	4,8	5,76		
NH ₄ Cl	0,3	0,36		
вода		425		
Na ₂ MoO ₄	0,0025	0,003	В	6
MnSO ₄	0,01	0,012		
H ₃ BO ₃	0,01	0,012		
FeSO ₄	0,012	0,0144		
Вода		6		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,6	Г	291
Вода		291		
Усього				1,04 л

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,36 г дріжджового екстракту та 6 г меляси. Компоненти поміщають в колбу об'ємом 2 л, додають 365мл питної води та перемішують. Потім проводять стерилізацію в автоклаві при $t = 112^{\circ}\text{C}$ (30 хв, 0,05 МПа).

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,24 г MgSO₄*7H₂O, 0,12 г NaCl, 0,024CaCl₂, 5,76 г KOH, 0,36 NH₄Cl. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають 432 мл питної води, перемішують та закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування запасного концентрованого розчину мікроелементів на технічних терезах зважують 0,3г Na₂MoO₄, 1,2 MnSO₄, 1,2 H₃BO₃, 1,44 г FeSO₄. Наважку поміщають в колбу об'ємом 2 л, додають 1 л дистильованої води, перемішують та закривають ватно–марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв). У середовище вносять піпеткою 12 мл композиції В.

ДР 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних терезах зважують 0,6 КН₂РО₄. Наважки поміщають в колбу об'ємом 500 мл, додають 291 мл питної води, перемішують та закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при t = 131 °С (40 хв).

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л

Таблиця 4.2

Компонент поживного середовища	Вміст, в г\л	К-сть для приготування 10 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, мл
малат	5	50	А	4754
Дріжджовий екстракт	0,3	3,6		
Вода		4686		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	24	Б	4750
NaCl	0,1	12		
CaCl ₂	0,02	0,24		
КОН	4,8	57,6		
NH ₄ Cl	0,3	3,6		
КН ₂ РО ₄	0,5	5		
вода		4679		
Na ₂ МоО ₄	0,0025	0,03	В	96
MnSO ₄	0,01	0,12		
H ₃ ВО ₃	0,01	0,12		
FeSO ₄	0,012	0,144		
Вода		96		
Усього				10 л

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 3,6 г дріжджового екстракту та 50 г меляси. Компоненти поміщають в збірник об'ємом 6 л, додають 4686 мл питної води та перемішують. Потім проводять стерилізацію в при $t = 112^{\circ}\text{C}$ (30 хв, 0,05 МПа).

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 2,4 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2 г NaCl , 0,24 CaCl_2 , 57,6 г KOH , 3,6 г NH_4Cl , 6 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у збірник об'ємом 6 л, додають 4679 мл питної води, перемішують та закривають. Для кращого розчинення солей розчин підігрівають до 40°C та перемішують при 50-100 об/хв. Потім розчини переносять у посівний апарат об'ємом 20 л, додають розчин хлоридної кислоти (ДР 1.1.1.) до досягнення рН 5 (рН- метр). Стерилізують при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 2.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

Використовуємо приготовлений композицію В (розчину мікроелементів) від ДР 2.1.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в інокуляторі об'ємом 250 л

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 140 л середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, в г\л	К-сть для приготування 140 л середовища, г	Компози-ції	Об'єм композиції V, мл
малат	5	700	А	75 000
Дріжджовий екстракт	0,3	42		
Вода		69 258		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	87,6	Б	65 000
NaCl	0,1	43,8		

CaCl ₂	0,02	8,76		
KOH	4,8	2 102,4		
NH ₄ Cl	0,3	131,4		
KH ₂ PO ₄	0,5	219		
Na ₂ MoO ₄	0,0025	1,01		
MnSO ₄	0,01	4,38		
H ₃ BO ₃	0,01	4,38		
FeSO ₄	0,012	5,256		
Вода		64 860		
Усього				
				140 л

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 42 г дріжджового екстракту та 700 г меляси. Компоненти поміщають в збірник об'ємом 250 л, додають 69 258мл питної води та перемішують. Потім проводять стерилізацію в при $t = 112^{\circ} \text{C}$ (30 хв, 0,05 МПа).

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно- ваговий дозатор 87,6 г MgSO₄*7H₂O, 43,8 г NaCl, 8,76 CaCl₂, 2 102,4 г KOH, 131,4 г NH₄Cl, 219 г KH₂PO₄, 1,01 г Na₂MoO₄, 4,38 г MnSO₄, 4,38 г H₃BO₃, 5,25 г FeSO₄. Компоненти поміщають у збірник об'ємом 6 л, додають 47860 мл питної води, перемішують та закривають. Для кращого розчинення солей розчин підігріваю до 40 °С та перемішують при 50-100 об/хв. Потім розчини переносять у посівний апарат об'ємом 200 л, додають розчин хлоридної кислоти (ДР 1.1.2.) до досягнення рН 5 (рН- метр). Стерилізують при $t = 131^{\circ} \text{C}$ (40 хв).

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 2500 л

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1700 л середовища

Таблиця 4.4

Компонент поживного середовища	Вміс т, в г\л	К-сть для приготування 1700 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
малат	5	6000	А	480
Дріжджовий екстракт	0,3	360		
Вода		473 640		
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2	240	Б	480
NaCl	0,1	120		
CaCl ₂	0,02	24		
KOH	4,8	5760		
NH ₄ Cl	0,3	360		
KH ₂ PO ₄	0,5	600		
Na ₂ MoO ₄	0,002 5	3		
MnSO ₄	0,01	12		
H ₃ BO ₃	0,01	12		
FeSO ₄	0,012	14,4		
Вода		472 877		
Усього				

ДР 2.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно- ваговий дозатор 360 г дріжджового екстракту та 6000 г меляси. Компоненти поміщають в збірник об'ємом 500 л, додають 473 640 мл питної води та перемішують. Потім проводять стерилізацію в при $t = 112^{\circ} \text{C}$ (30 хв, 0,05 МПа).

ДР 2.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Через об'ємно- ваговий дозатор у 240 г MgSO₄*7H₂O, 120 г NaCl, 24

CaCl₂, 5760 г КОН, 360 г NH₄Cl, 600 г KH₂PO₄, 3 г Na₂MoO₄, 12 г MnSO₄, 12 г H₃BO₃, 14,4 г FeSO₄. Наважки поміщають у збірник об'ємом 500 л, додають 472 877 мл питної води, перемішують та закривають. Для кращого розчинення солей розчин підігріваю до 40 °С та перемішують при 50-100 об/хв. Потім розчини переносять у посівний апарат об'ємом 200 л, додають розчин хлоридної кислоти (ДР 1.1.2.) до досягнення рН 5 (рН- метр). Стерилізують при t = 131 °С (40 хв).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Azospirillum brasilense* Calf зберігають у пробірках зі середовищем складу (г\л): 5,0 яблучна кислота; 0,5 K₂HPO₄, 0,2 MgSO₄*7H₂O, 0,1 NaCl, 0,015 FeCl₃, 0,3 дріжджового екстракту і 16,0 бактеріологічного агару.

ТП 5.2. Отримання робочої культури

Культуру із ТП 3.1 пересівають петлею в чашки Петрі із середовищем складу(г\л):5,0 яблучна кислота; 0, 5 K₂HPO₄, 0,2 MgSO₄*7h₂o, 0,1 NaCl, 0,015 FeCl₃, 0,3 дріжджового екстракту і 16,0 бактеріологічного агару та вирощують протягом 48 годин при температурі 30⁰С.

ТП 5.4. Вирощування в колбах на качалках

У 8 колб об'ємом 750 мл вносять композиції А (ДР 2.1.1), Б (ДР 2.1.2), В (ДР 2.1.3) Г (ДР 2.1.4) та ретельно перемішують. У чашки Петрі з культурою *Azospirillum brasilense* Calf вносять 5 мл фізіологічного розчину та змивають клітини. Потім відбирають піпеткою суспензію клітин та переносять у колби з поживним середовищем і вирощують при t=31 °С протягом 24 годин.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

У інокулятор об'ємом 20 л з композицією А (ДР 2.2.1) через засівну колбу додають композицію Б (ДР 2.2.2), композиції В (ДР 2.2.3). Потім засівною колбою додають 24 мл розчину NaOH (ДР 1.2.1).

Після підлужнення в середовище вносять посівний матеріал (ТП 3.3), включають перемішуючий пристрій (200-250 об/хв), аерацію та подають

глуху пару в сорочку інокулятора. Культивування проводять при 31 °С протягом 24 годин.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 200 л

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

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

ТП 6. Виробничий біосинтез

*ТП 4.1. Промислове культивування *Azospirillum brasilense* Calf в ферментері об'ємом 2000 л*

У ферментер з композицією А переносять 48 л композицію В із реактора та 48 л композиції Б яка також переноситься з реактора. Потім із збіника додають 2400 мл розчину NaOH. Після підлужнення в середовище вносять посівний матеріал, включають перемішуючий пристрій, аерацію та подають глуху пару в сорочку інокулятора для підтримки температури росту культури. Культивування проводять при 31 °С протягом 24 годин, рН тримають в межах 7.5.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

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

7.1. Мікробіологічний контроль

Культивування бактерій *Azospirillum brasilense* Calf проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах, для того щоб впевнитись у відсутності контамінації.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання. Прямий висів здійснюється посівом культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо-картопляним агаром (ГКА) або сусло-агаром (СА) – грибів та дріжджів.

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в умовах асептики, стерильною петлею наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі. Мазок висушують при кімнатній температурі, обов'язково до повної відсутності вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла. Після роботи за допомогою етилового спирту, знімають залишки масла з імерсійного об'єктиву [15].

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Azospirillum brasilense*. Ці бактерії являють собою спіральні або злегка вигнуті паличкоподібні неспорутворюючі клітини. Грамнегативні, клітини дуже рухливі з одним полярним джгутиком і

					НУХТ БТЕК 04.01.12 КР ПЗ			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробник	Кравець Т.С.				РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літера	Аркш	Аркшів
Керівник	Біценко Л.М.						42	47
Н. контр						42		
Консильт						Кафедра БТМ		
Зав. каф.	Стадніков В.П.							

декількома бічними джгутиками, більш короткими по довжині[16].

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Визначення концентрації біомаси

Визначення кількості життєздатних клітин продуцента

КУО / мл визначали шляхом послідовних розведень 1: 10 з NaCl 0,85%, культивували у твердому середовищі NFB з Конго-червоним при 30 ± 2 °C протягом 48 год. Тверде середовище з Конго-червоним містить (г/л): 5,0 яблучна кислота; 0,5 K₂HPO₄, 0,2 MgSO₄*7H₂O, 0,1 NaCl, 0,015 FeCl₃, 0,3 дріжджового екстракту і 16,0 бактеріологічного агару. Кінцеві КУО / мл визначали шляхом множення кількості колоній в чашці Петрі на коефіцієнт розведення[14].

7.2.2.Визначення біомаси

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

У основі методу лежить вимірювання зменшення кількості світла при його проходженні через суспензію клітин. У певних межах воно обумовлене переважно розсіянням світла клітками і пропорційно їх концентрації. Величина цього показника залежить від багатьох чинників (форми і розмірів клітин, оптичних властивостей культурального середовища, довжини хвилі падаючого світла і т. д.). Тому нефелометричний метод придатний лише для тихий мікроорганізмів, зростання яких викликає рівномірне помутніння середовища і не супроводжується помітною зміною форми і розмірів клітин, утворенням міцелію, плівок або інших скупчень. Живильне середовище для культивування мікроорганізмів, в якій передбачається визначати число клітин по світорозсіюванню, повинне бути оптично прозорим. Якщо каламутність середовища пов'язана з випаданням в осад деяких солей, найчастіше фосфатів, то перед вимірюванням світорозсіювання її підкисляють декількома краплями концентрованої соляної кислоти. Зміну

інтенсивності світла при проходженні через суспензію клітин вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК) або спектрофотометра, вибираючи довжину хвилі (звично в інтервалі 540—650 нм), при якій поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. Так, розсіяння світла, що викликається суспензією клітин в м'ясо - пептонному бульйоні або суслі, найбільш зручно вимірювати з червоним фільтром, при якому оптична густина таких середовищ мінімальна. При високих концентраціях клітин в культуральному середовищі відбувається вторинне розсіяння світла, що приводить до отримання занижених результатів. Тому суспензії великої густини перед вимірюванням світорозсіювання слід розводити середовищем або водою. Розбавлення проб однієї і тієї ж культури різними рідинами неприпустимо, оскільки набухання і стиснення клітин впливає на величину світорозсіюванні.

Правила роботи на фотоелектроколориметрі і порядок вимірювання величини світорозсіювання детально висловлені в інструкції, прикладеній до приладу. У деяких випадках густину клітинної суспензії виражають в свідченнях нефелометра. Проте частіше будують калібрувальні криві залежності між величиною світорозсіювання і числом клітин або сухою біомасою в одиниці об'єму. Для побудови калібрувальної кривої поступають таким чином. Вимірюють величину світорозсіювання суспензій з різним змістом клітин і в кожній з їх визначають одним з вживаних методів кількість кліток або біомасу. Одержану залежність виражають графічно, відкладаючи на осі ординат свідчення ФЕК, а на осі абсцис — кількість кліток, що містяться в 1,0 мл суспензії, або біомасу в г/л[17].

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

7.2.3. Визначення концентрації джерела вуглецевого живлення

Споживання джерела вуглецю здійснювали з використанням ферментативного набору для D-малата (Каталог 11215558035, R-Biopharm,

Roche, Darm stadt, Німеччина) і L-малата (Каталог 10139068035, R-Biopharm, Рош, Дармштадт, Німеччина). Таким чином, D-малат окислюється до оксалоацетату нікотинамідаденіндинуклеотидом (NAD) в присутності D-малатдегідрогенази. Оксалоацетат перетворюється тим же ферментом в піруват і CO₂. При цьому кількість утвореного НАДН було стехіометрично дорівнює кількості D-малата. З іншого боку, L-малат окислюється до оксалоацетату шляхом НАД у присутності L-малатдегідрогенази. Щоб видалити весь оксалоацетат, відбувається друга реакція, яка каталізується глутамат-оксалоацетаттрансaminaзою, що перетворює весь оксалоацетат у L-аспартат у присутності L-глутамату. Нарешті, кількість утвореного НАДН було стехіометрично рівне L-малату. В обох випадках НАДН вимірювали при 334, 340 і 365 нм[14].

ЛІТЕРАТУРА

1. Марчук Л.П. Біотехнології у контексті сучасних інноваційних змін. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2013, 2(72): 21-28.
2. Біопрепарати // Електронний ресурс. Джерело доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1928/biopreparati>
3. Danish S., Zafar-ul-Hye, M. Co-application of ACC-deaminase producing PGPR and timber-waste biochar improves pigments formation, growth and yield of wheat under drought stress. *Scientific reports*. 2019, 9(1): 1-13.
4. Khan N., Bano A., Rahman M.A., Guo J., Kang Z., Babar M.A. Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. *Sci. Rep.* 2019, 9(1): 1-19.
5. Chabaniuk Y.V., Brovko I.S., Podhurska I.O., Hrynevuch I.O., Nikiforenko V.M. Вплив біопрепаратів біонорма азот та біонорма фосфор на продуктивність пшениці твердої ярої. *Наукові доповіді НУБіП України*. 2019, 6 (82).
6. Біонорма-азот // Електронний ресурс. Джерело доступу: <https://www.bionorma.com/bionorma/azot-1/>
- 7.
8. Carrasco-Espinosa, K., García-Cabrera, R. I., Bedoya-López, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2015). Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of dl-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: Improving the shelf life of a liquid inoculant formulation. *Journal of Biotechnology*, 195, 74–81. [doi:10.1016/j.jbiotec.2014.12.020](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.020)
9. Mulyukina A. L., Suzinab N. E. , Pogorelova A. Yu., Antonyuk L. P., Dudab V. I., and El-Registana G. I. (2009). Diverse Morphological Types of Dormant Cells and Conditions for Their Formation in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, Vol. 78, No. 1, pp. 33–41

10. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. / Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2010. – 632 с
11. Площі, валові збори та урожайність сільськогосподарських культур за їх видами. [Електронний ресурс]. Доступ: <http://www.ukrstat.gov.ua/>
12. Засіб дезінфікуючий для поверхонь Dezaldum 20. [Електронний ресурс]. Доступ <https://atma.ua/profesijna-himiya/spetsializovani-zasoby/zasib-dezinfikuyuchyj-dlya-poverhon-dezaldum-20-5l-da015000/>
13. Засіб дезінфікуючий Дезолайт [Електронний ресурс]. Доступ <http://antiseptica.com.ua/dezinfekcija/instrumenty/dezolajt.html>
14. Carrasco-Espinosa, K., García-Cabrera, R. I., Bedoya-López, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2015). Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of dl-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: Improving the shelf life of a liquid inoculant formulation. *Journal of Biotechnology*, 195, 74–81. [doi:10.1016/j.jbiotec.2014.12.020](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.020)
15. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. Освіт. Ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
16. Cassán, F. D., Penna, C., Creus, C. M., Radovancich, D., Monteleone, E., de Salamone, I. G., ... Cáceres, E. R. (2015). *Protocol for the Quality Control of Azospirillum spp. Inoculants. Handbook for Azospirillum*, 487–499. [doi:10.1007/978-3-319-06542-7_27](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_27)
17. Carrasco-Espinosa, K., García-Cabrera, R. I., Bedoya-López, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2015). Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of dl-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: Improving the shelf life of a liquid inoculant formulation. *Journal of Biotechnology*, 195, 74–81.