

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)

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

« » червня 2024 р.

« » червня 2024 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: «Культивування *Verticillium lecanii* для одержання Вертициліну»

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 3

РИБНІКОВА Ольга Віталіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

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

(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Людмила РЕШЕТНЯК
(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 – 2024 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 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

РИБНИКОВОЇ Ольги Віталіївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Verticillium lecanii* для одержання Вертициліну
керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, д.т.н., доц
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 29 березня 2024 року № 238-к
2. Строк подання здобувачем роботи 28 травня 2024 р.
3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 5м³, коефіцієнт заповнення становить 0,6, цільовий продукт у вигляді біоінсектицидного препарату на основі культуральної рідини що містить спори, міцелій та інсектицидні метаболіти ентомопатогенного гриба *Lecanicillium (Verticillium) lecanii*.
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) характеристика цільового продукту, характеристика біологічного агента, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування вибору технологічної схеми, специфікація обладнання, опис технологічної схеми, контроль виробництва.
5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема біосинтезу *Verticillium lecanii* формату А1 – аркушів 1
Апаратурна схема біосинтезу *Verticillium lecanii* формату А1 – аркушів 1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Розділ 1. Характеристика цільового продукту	01.03.24 - 03.03.24	Виконано
	Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	03.03.24-06.03.24	Виконано
	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування.	06.03.24.-09.03.24	Виконано
	Розділ 4. Біосинтез цільового продукту	09.03.24.-11.03.24	Виконано
	Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	11.03.24.-15.03.24	Виконано
	Розділ 6. Специфікація обладнання	15.03.24-18.03.24	Виконано
	Розділ 7. Опис технологічної схеми	18.03.24.-21.03.24	Виконано
	Розділ 8. Контроль виробництва	21.03.24.-25.03.24	Виконано
	Розділ 9. Охорона довкілля	25.03.24 - 28.05.24	Виконано

Здобувач

_____ (підпис)

Ольга РИБНІКОВА

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технічної та апаратурної схеми біосинтезу дріжджів *Verticillium lecanii*. *Verticillium lecanii* є самостійним агентом у боротьбі з комахами (особливо попелицею та білокрилкою). Вертицилін – найрозповсюдженіший біоінсектицид в склад якого входить *V. lecanii*.

При виборі біологічного агента було порівняно важливі чинники, які будуть впливати на економічну доцільність використання обраного штаму, а саме концентрація біомаси, умовна вартість за 1 г продукту, а також швидкість утворення цільового продукту. Спираючись на ці важливі фактори, як основний біологічний агент пропонується використати *V. lecanii* ІМІ 332287, який за 7 днів синтезує $18,88 \pm 0,86$ г/л біомаси, а умовна вартість за 1 г становить 0,14 грн.

Технологічна схема біосинтезу *Verticillium lecanii* включає в себе допоміжні роботи (підготовка персоналу, аераційного повітря, титрувальних розчинів, стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу, застосування колб на 750 мл, та інокуляторів на 5, 50, 500 л, а також біосинтез у ферментері об'ємом 5 м^3 , з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури, технологічної схеми (формат А1, 1 аркуш) та апаратурної схеми (формат А1, 1 аркуш). Загальний обсяг роботи – 100 сторінок, 13 таблицок, 9 рисунків та 98 літературних найменувань.

Ключові слова: *Verticillium lecanii*, вертицилін, біосинтез, біоінсектициди, боротьба з комахами.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of a technical and hardware scheme for the biosynthesis of the yeast *Verticillium lecanii*. *Verticillium lecanii* is an independent agent in the fight against insects (especially aphids and whiteflies). Verticillin is the most widespread bioinsecticide containing *V. lecanii*.

When choosing a biological agent, we compared important factors that will affect the economic feasibility of using the selected strain, namely biomass concentration, the notional cost per 1 g of product, and the rate of formation of the target product. Based on these important factors, it is proposed to use *V. lecanii* IMI 332287 as the main biological agent, which synthesizes 18.88 ± 0.86 g/l of biomass in 7 days, and the notional cost per 1 g is 0.14 UAH.

The technological scheme of biosynthesis of *Verticillium lecanii* includes auxiliary works (preparation of personnel, aeration air, titration solutions, sterilization of culture media) and technological process (four stages of growing seed, use of 750 ml flasks and inoculators for 5, 50, 500 liters, as well as biosynthesis in a 5 m³ fermenter with a filling factor of 0.6).

The qualification work consists of an introduction, nine chapters, a list of references, a flow chart (A1 format, 1 sheet) and a hardware diagram (A1 format, 1 sheet). The total volume of the work is 99 pages, 13 tables, 9 figures and 100 references.

Key words: *Verticillium lecanii*, verticillin, biosynthesis, bioinsecticides, insect control.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	10
1.1 Характеристика біоінсектициду Вертициліну	10
1.2. Сфери практичного застосування	12
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА...	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища	21
2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	22
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	25
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	26
3.1 Потреба в цільовому продукті	26
3.2. Розрахунок потужності виробництва	28
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	30
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	31
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	35
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	35
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ .	37
5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.	37
5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	40
5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	42
5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	45
5.5. Обґрунтування вибору розчинів для корекції рН в процесі культивування.	51
5.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	52
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	55
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	60
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	70

Розділ 8. Контроль виробництва.....	70
8.1 Карта постадійного контролю.....	70
8.2. Мікробіологічний контроль.....	76
8.3 Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю.....	79
8.3.1. Визначення концентрації джерела вуглецю.....	79
8.3.2. Визначення концентрації джерела азоту.....	80
8.4 Визначення показників біосинтезу.....	81
8.4.1. Визначення концентрації біомаси.....	81
8.4.2 Визначення концентрації умовних одиниць.....	81
8.5. Оцінка біологічної дії.....	82
РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	84
9.1 Аналіз технологічної схеми проєктованого біотехнологічного виробництва.....	84
9.2 Способи знезараження води.....	84
9.3. Способи знезараження повітря.....	84
9.4.Способи знезараження твердих відходів.....	85
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:.....	86

ВСТУП

Інсектициди - хімічні речовини для боротьби з шкідливими комахами, які знищуються при безпосередньому контакті з препаратом, з обробленою поверхнею рослини при проковтуванні препарату під час живлення шкідника.

Інсектициди застосовують різними способами залежно від обставин, це може бути обприскування, обпилювання, фумігації, протравлення тощо. Існують і різні форми препаратів - дуети, емульсії або суспензії, змочувані порошки та інше. Оскільки шкідники сільськогосподарських культур здатні істотно негативно впливати на якість і кількість врожаю, в сучасному світі існує тенденція на використання і потреба в появі нових, більш ефективних препаратів[1].

На теперішньому етапі інтенсивного розвитку сільського господарства велике розповсюдження в світі набувають розробки біологічних методів захисту рослин від хвороб та шкідників, підвищення родючості ґрунтів шляхом застосування високоактивних мікробних препаратів. Використання екологічно безпечних методів захисту рослин є одним з основних елементів сучасної технології для фітосанітарної оптимізації екосистем, які дозволяють цілеспрямовано регулювати шкочинні об'єкти, зберігаючи динамічну природну рівновагу [2].

Розробка і застосування препаратів на основі агрономічно цінних мікроорганізмів, які без порушення механізмів біоценотичної регуляції і екологічної стабільності контролюють чисельність шкочинних об'єктів в агроценозах, сприяють одержанню екологічно безпечної рослинницької продукції та зниженню рівня забруднення агроценозів пестицидами, відновлюють природну рівновагу екосистем [2].

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Рибнікова О.В				Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.						8	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Актуальність роботи полягає у вирішенні проблем псування рослинної продукції шкідниками шляхом виробництва інсектицидного препарату біотехнологічним шляхом, який не матиме негативних побічних ефектів, які мають його синтетичні аналоги.

Спираючись на актуальність роботи, метою даної роботи є розглянути альтернативні препарати хімічним інсектицидам (до яких відноситься Вертицилін) як їх більш екологічного аналогу задля забезпечення вітчизняного ринку безпечним препаратом, який не буде забруднювати навколишнє середовище та не буде загрожувати здоров'ю людей, а також буде покращувати вихід та якість рослинної сировини.

Новизною даної роботи є використання штаму *V. lecanii* ІМІ 332287, як основи препарату Вертициліну, який культивується глибинним методом, при цьому за 7 діб синтезує $18,88 \pm 0,86$ г/л біомаси [3].

РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1 Характеристика біоінсектициду Вертициліну

Verticillium lecanii є самостійним агентом у боротьбі з комахами (особливо попелицею та білокрилкою). Мікроорганізм містить ендотоксин бассіанолід [4], саме який і специфічно зв'язується з комахою, загалом, смерть комах проходить через саме проростання гіфів та виділення бассіаноліду, але дослідження та інформації про нього замало, тому потрібно розглянути саме *V. lecanii*, як самостійний агент [5].

Сучасна назва *V. lecanii* - *Lecanicillium lecanii*. В основному препарат на основі цього агента продається для боротьби з тепличною попелицею, білокрилками та трипсами, проте також доступні препарати в Колумбії та Перу для боротьби з лускокрилими, рівнокрилими та двокрилими шкідниками квітів, овочів та інших культур [4,6]. Бластоспори, отримані під час заглибленої ферментації, або конідії, отримані під час твердофазної ферментації, використовуються в різних продуктах. Раніше вимога до дуже високої вологості була серйозною шкодою для використання цього гриба в теплицях, де висока вологість також сприяє розвитку хвороб рослин. Однак розробка вдосконаленої формули, яка зменшує вимоги грибка до вологості, значно полегшила цю проблему [4].

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Рибнікова О.В			Розділ 1.Характеристика цільового продукту	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					10	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

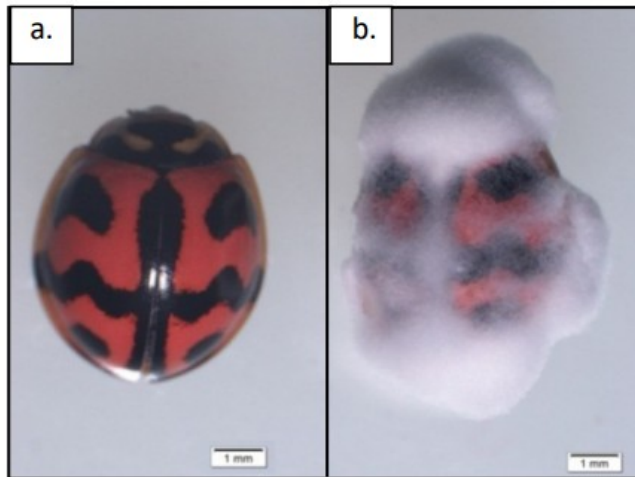


Рис.1.1. Приклад ураження сонечка грибом *V. lecanii*: а – здорова комаха, б – уражена грибом [7]

Завдяки його міцелію, мікроорганізм здатен впливати на комах (проростаючи всередині, тим самим вбиваючи їх). Гриб здатен паразитувати на прямокрилих, кліщах та інших комах, саме тому його роль у сільському господарстві є дуже важливою [8].



Рис.1.2. Попелиця, яка була знешкоджена *V. lecanii* [9].

V. lecanii є ширококорозповсюдженим біоінсектицидом, що впливає на комах. Загалом, мікроорганізм використовують для захисту огірків та інших овочів при вирощуванні (сюди відносяться також і банан, виноград, цибуля та ін.). Плюсами при використанні мікроорганізма є те, що він не накопичується у рослинах та є абсолютно не шкідливим для людей [8].

1.2. Сфери практичного застосування

Verticillium lecanii входить до складу таких біоінсектицидів:

Вертицилін – найрозповсюдженіший біоінсектицид в склад якого входить *V. lecanii*. Призначений проти попелиці та білокрилки. Важливо застосовувати його на овочеві культури у закритому ґрунті. Використовується розпиленням. Виробляється компанією Біо Центр [10]. Окрім цього підприємства, в Україні Вертицилін виробляє ТОВ Науково Виробничий Центр «Черкасибіозахист», ТОВ «Центр Біотехніка» [11,12].

Verticillium lecanii Biopesticide – біоінсектицид, мікроорганізм продають у великих пакетах (на 1 і більше кг). Його використовують розприскуванням листви. Виробляється компанією VazodoGoGreen [13].

Verticoz – P – біоінсектицид, ефективно бореться з борошністими черевцями на цитрусових. Застосовується розприскуванням. Виробляється компанією Utkarsh [14].

Active IPM *Verticillium lecanii* – пестицид біологічного походження, який знищує більшість економічно шкідливих шкідників, таких як борошністий клоп, попелиця, трипс, жасид, біла мушка та кліщ. Даний препарат виробляється індійською компанією Harmony Ecotech Pvt Ltd [15].



Рис.1.3. Біоінсектицид Вертицилін [10].

Закордонні аналоги Вертициліну в загальному виготовляються в сухому вигляді. Можна припустити, що це робиться з метою більш ретельного

транспортування не лише по країні, а й закордон. Варто зауважити, що закордонні препарати є дорожчими, і це без врахування доставки. Ціна може бути обумовлена як раз таки станом продукту, оскільки для одержання сухої форми потрібно додатково застосовувати етап сушіння.

1.3. Захворювання, як викликають гриби *Verticillium*

Вертицильоз (вертицильозне в'янення, вілт) є однією із найстрашніших хвороб культурних рослин. Він вражає не тільки соняшник, а понад 350 видів культурних рослин та бур'янів. Збудник цієї хвороби, гриби *Verticillium*, дуже добре розвивається у теплих умовах при наявності достатньої кількості вологи. Мікросклероці цього гриба здатні тривалий час (до 10 років) зберігатися у ґрунті, насінні та рослинних рештках. Оптимальна температура для розвитку гриба на соняшнику складає +20°C, а при похолоданні до +15°C гриб втрачає активність та симптоми хвороби тимчасово зникають [16].

Найбільшою проблемою даної хвороби є її невиліковність, яка призводить до знищення посіву та, через тривалий час збереження збудника в ґрунті, до неможливості висіву цієї ж культури на полі протягом 10 років [16].

Хвороба потрапляє через корені та розповсюджується судинною системою по всій рослині. Перші видимі прояви хвороби з'являються під час бутонізації, а найбільше помітні у фазі цвітіння рослин. В цей час окремі листки втрачають тургор між жилками, що призводить до некрозу тканин. Уражене листя в'яне та сохне, проте тримається на рослині тривалий проміжок часу і опадає в період дозрівання насіння. Гриб блокує рух поживних елементів в судинній системі стебла, що призводить до зменшення генеративних органів рослини. Зріз привідних пучків черешків листя та судин стебла змінює колір на бурий. Хворі рослини мають нерозвинений кошик та невиповнене насіння. Листя поступово засихає, при чому спочатку сохнуть листки на нижній частині рослини. Характерною

ознакою саме вертицильозного в'янення є засихання лише однієї половини листка, в той час як інша залишається цілковито нормальною [16].

Також може уражуватись лише половина стебла рослини. Вертицильозні плями на хворих рослинах соняшника неправильної форми та завжди мають чітко помітні жовті краї. Жоден сучасний сорт і гібрид рослин не має резистентності до вертицильозу. Проте хвороба не має широкого розповсюдження завдяки тому, що під час селекції використовується насіння виключно від незаражених рослин. Боротися з вертицильозом наразі можна лише дотриманням сівозміни, сівбою високоякісного насіння та дотриманням агротехнічних вимог вирощування рослин [16].

Через це, потрібно бути дуже обережним при використанні Вертициліну, оскільки збільшені концентрації теоретично можуть спровокувати дане захворювання.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Як було зазначено раніше, синонімом *V. lecanii* є *L. lecanii*. Потрібно зауважити, що Вертицилін отримав свою назву від назви роду *Verticillium*. Для цих грибів притаманні декілька видів, які мають інсектицидну дію, тому пропонується попутно розглядати й інших представників, які мають активну протидію шкідникам [17].

L. uredinophilum QHЛА має широкий спектр інсектицидної дії. До списку комах, які ці гриби можуть уразити, входять: *Henosepilachna vigintioctopunctata* (картоляна корівка), *Spodoptera exigua* (карадрина), *Plutella xylostella* (капустяна міль), *Spodoptera frugiperda* (кукурудзяна листова совка), *Sitobion avenae* (велика злакова попелиця), *Hyalopterus perikonus* (попелиця зелена), *Aphis citricola* (зелена цитрусова попелиця). Рівень інсектицидної дії для кожної комахи досягає 95%. Такий показник, робить дуже перспективним зазначений штам [18]. *L. lecanii* NIPHM можуть пригнічувати *Lipaphis erysimi* (гірчична та ріпакова попелиця) до $73,16 \pm 2,0\%$. Такого результату вдається досягти використовуючи ад'юванти у вигляді розчину 8-% гліцерину та 0,5-% твін-80. Без застосування цього розчину інсектицидна дія все одно висока та становить $66,63 \pm 9,1\%$ [19].

L. lecanii (штам не вказано) пригнічують *A. craccivora* (виноградна попелиця) на 93,33%. При цьому, як основний субстрат використовується порошок яблучних вичавок, що доволі здешевлює середовище [20]. *L. lecanii* JMC-01 можуть пригнічувати *Bemisia tabaci* (табачна білокрилка) на 75,55% [21].

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Рибнікова О.В			Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					15	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Verticillium sp. 3692 також мають протиінсектицидні властивості. В роботі визначали ці властивості проти різних типів комарів *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, та *Anopheles stephensi*. Перші два штами пригнічуються приблизно на 95%, а останній повністю гине при обробці *Verticillium* sp. 3692. Вважаючи таку високу пестицидну дію, можна припустити про можливу антагоністичну дію проти шкідників рослинних культур [22].

Порівняння різних біологічних агентів, які мають інсектицидну дію

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси г/л	Умови культивування	Література
<i>V. lecanii</i> IMI 332287	Глюкоза – 20, Пептон – 5, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, K ₂ HPO ₄ – 5	18,88±0,86	7 днів, 24 °C, pH 7,0	Hanlon G. W., Kooloobandi A., Hutt A. J. Microbial metabolism of 2- arylpropionic acids: effect of environment on the metabolism of ibuprofen by <i>Verticillium lecanii</i> . <i>Journal of applied bacteriology</i> . 1994, 76(5): 442-447. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01100.x
<i>L. lecanii</i> L3909	Глюкоза – 25,68, K ₂ HPO ₄ – 2,80, MgSO ₄ ×7H ₂ O - 1,38, CaCl ₂ – 0,48, FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,22, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 7,50, (NH ₄)Cl – 4,10, NaH ₂ PO ₄ ×7H ₂ O – 1,67	1,78 ± 0,04	30 днів, 25 °C, pH 6,0	Rocha-Pino Z., Marín-Cervantes M. D. C., Martínez-Archundia M., Soriano-Blancas E., Revah S., Shirai K. Morphological changes, chitinolytic enzymes and hydrophobin-like proteins as responses of <i>Lecanicillium lecanii</i> during growth with hydrocarbon. <i>Bioprocess and biosystems engineering</i> . 2013, 36: 531-539. https://doi.org/10.1007/s00449-012-0808-z
<i>L. lecanii</i> JAB 02	Рисова вода замість звичайної (100 г рису на 1 л) Глюкоза - 5	3,2	15 днів, 25 °C, pH 6,5	Machado A. C. R., Monteiro A. C., Mochi D. A., Yoshida L. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para produção do fungo entomopatogênico <i>Lecanicillium lecanii</i> . <i>Bragantia</i> . 2009, 68: 703-714.

З таблиці 2.1. видно переваги штаму *V. lecanii* IMI 332287, який синтезує майже 19 г/л біомаси за 7 діб. Найгіршим штамом за цим показником можна вважати *L. lecanii* L3909, який за 30 діб синтезує всього 1,78 г/л біомаси, що може казати про неправильно підібране поживне середовище. Порівняти штами досить важко, оскільки середовища для їх культивування дуже сильно відрізняються. Тому, потрібно зробити відповідні розрахунки стосовно вартості 1 л поживного середовищ для кожного грибу (див.табл.2.2.)

Таблиця 2.2.

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>V. lecanii</i> IMI 332287	Глюкоза – 20	30	0,6	1
	Пептон – 5	184,58	0,92	2
	Дріжджовий екстракт – 5	92,29	0,46	3
	NaCl – 5	9,2	0,05	4
	K ₂ HPO ₄ – 5	120	0,6	5
	Вартість 1 л поживного бульйону – 2,63 грн			
<i>L. lecanii</i> L3909	Глюкоза – 25,68	30	0,77	1
	K ₂ HPO ₄ – 2,80	120	0,34	5
	MgSO ₄ ×7H ₂ O - 1,38	23,1	0,03	6
	CaCl ₂ – 0,48	38,4	0,02	7
	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,22	28,8	0,01	8
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 7,50	68	0,51	9
	(NH ₄)Cl – 4,10	34,8	0,14	10
	NaH ₂ PO ₄ ×7H ₂ O – 1,67	450	0,75	11
Вартість 1 л поживного бульйону – 2,57 грн				
<i>L. lecanii</i> JAB 02	Рис - 100	37,5	3,75	12
	Глюкоза - 5	30	0,15	1
	Вартість 1 л поживного бульйону – 3,9 грн			

Визначення вартості поживних середовищ для одержання Вертициліну

Примітка* (ціни вказано станом на квітень 2023 року): 1 - <https://prom.ua/p144210781-glyukoza-pishevayamagnij-okismetionin.html>, 2 - https://www.alibaba.com/product-detail/High-quality-raw-material-Peptide-CAS_1600736629802.html, 3 - <https://russian.alibaba.com/p-detail/Yeast-62258786446.html?spm=a2700.8699010.29.16.2338a9abkLZQ0z>, 4 - <https://prom.ua/ua/p1637267411-sol-pishevaya-pomol.html?&primelead=MC40MjU>, 5 - <https://flagma.ua/kaliy-fosfornokisly-2-zameshchenny-ch-o2563762.html>, 6 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-magnij-sirchanokyslyj-7-vodnyj-sulfat-magniyu>, 7 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kaltsij-hlorystyj-hloryd-kaltsiyu>, 8 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>, 9 -

<https://snabhim.com.ua/uk-ua/sulfat-ammoniya-ammonij-ternokislyj-germaniya>, 10 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-amonij-hlorystyj-hloryd-amoniyu>, 11 -
<https://prom.ua/p1726621994-natrij-fosfornokislyj-zam.html?&primelead=MS4y>, 12 - <https://flagma.ua/ris-dlinny-proparenyy-o3720275.html>

За таблицею 2.2. найнижчу вартість середовища має *L. lecanii* L3909– продуцент, що має найнижчі показники синтезу біомаси. Найдорожче - *V. lecanii* IMI 332287, проте даний продуцент синтезує найбільшу кількість біомаси. Середнє за рівнем середовище притаманне *L. lecanii* L3909, проте за ціною воно дуже наближене до *V. lecanii* IMI 332287, а от концентрація біомаси та тривалість культивування – далеко від зазначеного продуцента.

Додатково пропонується визначити умовну вартість, а також можна визначити швидкість утворення біомаси. Проте, враховуючи важливість параметру ступеня летальності, маємо його врахувати при кінцевому порівнянні.

Таблиця 2.3.

Визначення умовної вартості та швидкості утворення продуцентів Вертициліну

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси, г/л	Умовна вартість 1 г біомаси, грн/г	Тривалість культивування, днів	Кількість утвореної біомаси за годину, г/день
<u><i>V. lecanii</i> IMI 332287</u>	<u>2,63</u>	<u>18,88±0,86</u>	<u>0,14</u>	<u>7</u>	<u>2,697</u>
<i>L. lecanii</i> L3909	2,57	1,78 ± 0,04	1,44	30	0,059
<i>L. lecanii</i> JAB 02	3,9	3,2	1,22	15	0,213

Найкращі показники показує *V. lecanii* IMI 332287, він найшвидше культивує біомасу, а також має найдешевшу вартість за 1 г біомаси, всього 14 копійок. Друге місце розділяють штами *L. lecanii* L3909 та *L. lecanii* JAB 02 які мають посередні показники і не є вигідними. Тому, через низку зазначених факторів, пропонується обрати *V. lecanii* IMI 332287, як найкращий варіант між усіма грибами.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Як основний біологічний агент обрано *V. lecanii* ІМІ 332287, джерелом вуглецю є глюкоза, дріжджовий екстракт та пептон, а джерелом азоту – пептон та дріжджовий екстракт. Кількість вуглецю в грибній клітині становить близько 40%.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 40 % Карбону, отже вміст Карбону у 18,88 г біомаси становить $18,88 \times 0,4 = 7,552$ г. Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 7,552 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(7,552 \times 0,4) + 7,552 = 10,57$ г вуглецю.

Кількість вуглецю в глюкозі становить 72 г на 180 г глюкози (перераховано через молярну масу). Отже, кількість вуглецю з середовища з глюкози становить $20 \times 72 / 180 = 8$ г вуглецю. Кількість вуглеводів в дріжджовому екстракті становить близько 40% [22], тоді, кількість вуглеводів з цього компоненту складає: $5 \times 0,4 = 2$ г. Кількість карбону в пептоні в середньому складає 41,87% [23], отже, кількість вуглецю з пептону становить $5 \times 0,4187 \approx 2,1$ г. Отже, загальна кількість карбону в середовищі становить: $8 + 2 + 2,1 = 12,1$, що повністю забезпечує потреби у вуглецевому живленні нашого продуцента, а тому кількість компонентів наразі не змінюємо.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

У біомасі міститься 10 % Нітрогену, отже вміст Нітрогену у 18,88 г біомаси становить $18,88 \times 0,1 = 1,888$ г.

Кількість азоту в дріжджовому екстракті становить близько 10% з яких 4% припадає на амінний [24]. Оскільки для синтезу біомаси використовується як амінний так і нітратний азот, враховуємо приблизно 10% від дріжджового екстракту, що становитиме $5 \times 0,1 = 0,5$ г. Кількість азоту в пептоні в середньому складає 14,5% [25], отже, кількість азоту з

пептону становить $5 \times 0,145 \approx 0,725$ г. Отже, загальна кількість азоту в середовищі становить: $0,5 + 0,725 = 1,225$. Даної кількості азоту не є достатньо для синтезу 18,88 г біомаси, тому пропонується збільшити кількість дріжджового екстракту, в якому міститься менша кількість азоту.

Кількість азоту, якої не вистачає для синтезу біомаси становить $1,888 - 1,225 = 0,663$ г. Якщо в 5 г дріжджового екстракту знаходиться близько 0,5 г азоту, то 0,663 г азоту еквівалентно $(0,663 \times 5) / 0,5 = 6,63$ г. Отже, загальна кількість дріжджового екстракту, яка має бути в поживному середовищі становить $5 + 6,63 = 11,63$ г.

В табл.2.4. узагальнено інформацію щодо перерахованих компонентів поживного середовища та концентрації біомаси.

Таблиця 2.4.

Узагальнені дані після перерахунку поживного середовища

Показник	Концентрація, г/л	
	До перерахунку	Після перерахунку
Глюкоза	20	20
Пептон	5	5
Дріжджовий екстракт	5	11,63
Біомаса	18,88	18,88

2.3 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Морфолого-культуральні ознаки: *Verticillium lecanii* (який також відомий як *Lecanicillium lecanii* [26] та *Akanthomyces lecanii* [27]) – це ентомопатогенний гриб [13], який широко використовується як біопестицид [28] (в основному проти ряду прямокрилих комах, а також сарани) [29].

За морфологічною характеристикою *Verticillium lecanii* має колонії жовтувато-білого кольору, 15-25 мм в діаметрі конідії мають відносно невеликий розмір, від 11 до 20 мкм, шириною 1,4-1,8 мкм. Мають загостренні кінчики та звужену форму. Кондіеносці доволі короткі. Хламідоспори відсутні [30].



Рис.2.1. – Мікроскопічне зображення конідій *Verticillium lecanii* [31]

Так як у *Verticillium lecanii* наявні конідії це дає нам змогу зрозуміти, що він здатен до нестатевого розмноження або спороутворення. Мікроорганізм є дейтеромицетом і не здатен до статевого розмноження [32].

Штами з більш великими спорами більш вірулентні до попелиці, штами з меншими спорами до білокрилки (як бачимо, гриб впливає не тільки на прямокрилих комах, але і на рівнокрилих і інших) [33].



Рис.2.2. – Мікроскопічне зображення колонії *Verticillium lecanii* на агаризованому середовищі [34].

Фізіолого-біохімічні ознаки: *Verticillium lecanii* – аеробний мікроорганізм (потребує для розмноження кисень) [35]. Оптимальною температурою для росту гриба є 24–26°C (за цієї температури спостерігається найкращий ріст конідій). Ростуть при температурі 10 – 30 °C, з чого можна зробити висновок, що він є мезофілом.

Оптимальний рН від 5,5 до 7,0. При підвищенні рН також погіршується ріст конідій, з чого можна зробити висновок, що мікроорганізм нейтрофіл [13].

Як і всі еукаріоти, *Verticillium lecanii* є хемоорганогетеротрофом (як джерело енергії, донор електронів та джерело вуглецю використовує органічні речовини). Загалом, для культивування мікроорганізму використовують середовища, які містять агар [36] (найрозповсюдженішим є середовище Сабуро в складі якого є глюкоза, пептон та агар-агар) [37].

Нестатеве розмноження у *Verticillium lecanii* пов'язане з спороутворенням.

Життєвий цикл починається коли спори прикріплюються до зовнішньої оболонки комах, після цього вони починають там проростати та згодом здатні проникати у твердий шар оболонки комах (легкість проникнення забезпечують ферменти, які підвищують лізис зовнішньої оболонки, тобто починають її розчиняти). Завдяки цьому, *Verticillium lecanii* може проникнути всередину комахи та почати проростати вже там. До ферментів, які полегшують проникнення мікроорганізму у середину комахи належать: протеази, естерази, хітинази.

Всередині комахи починають проростати гіфи, вони розмножуються та заповнюють нутрощі. Колір комахи при проростанні в ній може змінюватись з жовтого на червоний. Смерть комахи настає через надмірний ріст гіфів та виділення ферментів [29], а також втрати води та поживних речовин. Смерть настає через 48-72 год [38].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Сучасна класифікація *Verticillium lecanii* наведена згідно Online бази даних MocoBank [39].

Царство – *Fungi*

Підцарство – *Dikarya*

Відділ – *Ascomycota*

Підвідділ – *Pezizomycotina*

Клас – *Sordariomycetes*

Підклас – *Hypocreomycetidae*

Порядок – *Glomerellales*

Родина – *Plectosphaerellaceae*

Рід – *Verticillium*

Вид - *lecanii*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба в цільовому продукті

У даному розділі наведено інформацію щодо актуальності застосування біоінсектицидів та описано технологічні етапи виробництва біомаси *Verticillium lecanii* IMI 332287 з використанням ферментера 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 для обробки площ цукрового буряка в Україні.

З давніх часів і до наших днів використання інсектицидів стало важливим і суворо необхідним компонентом сільського господарства для забезпечення врожайності та мінімізації втрат після збору врожаю. З постійно зростаючим населенням, на додаток до погіршення умов навколишнього середовища (на основі незаперечних і зростаючих доказів зміни клімату в поєднанні зі збільшенням рівня забруднення), завдання досягнення довгострокового розвитку без нанесення шкоди навколишньому середовищу ніколи не було більш важким. У світі, де виробництво харчових продуктів має зрости на 70-100% до 2050 року для задоволення попиту на продовольчі товари населення понад 9 мільярдів людей, сільське господарство приймає один із головних викликів [40].

Оскільки сільське господарство є основною причиною знищення лісів, оскільки вже займає 70% світових пасовищ, 50% саван і 45% лісів помірного поясу, зростає потреба обмеження використання сільськогосподарських культур, одночасно збільшуючи їх врожайність для підтримки забезпечення населення. Крім того, зміна харчових звичок людей викликала потребу в продуктах вищої якості внаслідок боротьби з різними комахами-шкідниками [40].

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Рибнікова О.В			Розділ 3. Техніко- економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					25	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Вибираючи хімічні засоби захисту рослин необхідно користуватися діючим «Переліком пестицидів і агрохімікатів дозволених до використання в Україні» та доповнення до нього. Перевагу слід надавати препаратам з високою біологічною ефективністю, низькими нормами витрати, тривалою захисною дією та невисоким ризиком прояву фітотоксичності, не спричиняють появи резистентності у шкідливих організмів, є найбільш безпечними для людини, теплокровних тварин, корисних комах та інших живих організмів, мають безпечну та зручну для використання препаративну форму, зберігаються у об'єктах навколишнього середовища не довше одного вегетаційного періоду [41].

При обґрунтуванні вибору інсектицидів зважають на такі особливості шкідників: вид, стадія розвитку, особливості ротового апарату імаго або личинки, чутливі фази (особливо – коли особини мешкають усередині рослин), зимуюча стадія і місце зимівлі, тривалість виходу з місць зимівлі, тривалість льоту, відкладання яєць, розвитку і кількість генерацій.

До сучасного асортименту входять інсектициди з різною реакцією на температуру середовища, що необхідно враховувати при плануванні захисних заходів. Наприклад синтетичні піретроїди ефективні коли температура повітря не перевищує 25°C, тому їх краще використовувати влітку у ранкові та вечірні години, а також за оптимальних температур навесні та влітку [41].

Після більш ніж 70 років використання хімічних пестицидів сучасне сільське господарство все частіше використовує біологічні засоби боротьби. З кожним роком резистентність до звичайних хімічних інсектицидів збільшується, що зумовлює пошуки та використання альтернативних ефективних препаратів [42].

Використання біоінсектицидів – новий екологічно безпечний спосіб захисту зелених насаджень. Біоінсектициди є препаратами біологічного походження, використання яких безпечно для людини та довкілля [43].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

У 2021 році посівна площа становила близько 29 млн га [44].

Загальна посівна площа під овочами у 2021 р. була 3320,1 тис. га, з них: 1283,1 тис. га відведено під картоплю, 452,8 тис. га було зайнято під овочами відкритого ґрунту (помідори, капуста, огірки, цибуля та ін.), 46,2 тис. га — під баштанними культурами та 1538 тис. га під кормовими овочами.

У розрізі регіонів найбільші посівні площі під овочами в сезоні були в областях поліської та лісостепової зон: Житомирській, Вінницькій, Львівській, Чернігівській, Київській, Полтавській, Рівненській, Хмельницькій, Харківській та Волинській областях, де площі сягнули за 150 тис. га. Зокрема в Житомирській, Вінницькій та Львівській областях — 286,3 тис. га, 240 тис. га та 204,9 тис. га відповідно[45].

За даними Державної служби статистики України посівна площа під огірки Львівського регіону станом на 2021 рік становила 6300 га [46]. Свій подальший розрахунок зосередимо на площах засіву огірком Львівського регіону, та потребу у препараті будемо вираховувати з 6300 га їх засіву.

В Україні Вертицилін виробляють такі компанії як Біо Центр [10], ТОВ Науково Виробничий Центр «Черкасибіозахист», ТОВ «Центр Біотехніка» [11, 12].

Verticillium lecanii Biopesticide – біоінсектицид, мікроорганізм продають у великих пакетах (на 1 і більше кг). Його використовують розприскуванням листви. Виробляється компанією VazodoGoGreen [13].

Verticoz – P – біоінсектицид, ефективно бореться з борошністими черевцями на цитрусових. Застосовується розприскуванням. Виробляється компанією Utkarsh [14].

Active IPM *Verticillium lecanii* – пестицид біологічного походження, який знищує більшість економічно шкідливих шкідників, таких як борошністий клоп, попелиця, трипс, жасид, біла мушка та кліщ. Даний препарат виробляється індійською компанією Harmony Ecotech Pvt Ltd [15].

Таблиця 3.1.

Порівняння різних препаратів на основі *V. lecanii*

Назва	Країна виробник	Вартість	Стан препарату	Робочий розчин	Джерело
Вертицилін	Україна	114 грн /л	Рідкий	50 мл на 1 л препарату	[47]
Вертицилін БТ		84 грн/л		10 мл препарату на 1 л води	[48]
Вертицилін М		78 грн/л		10-50 мл препарату на 1 л води	[10]
OrganicDews <i>Verticillium lecanii</i>	Індія	146,47 грн/кг*	Сухий	10 г порошку на 1 л	[49]
Utkarsh VERTICOZ-P		181,38 грн/кг*		7-9 г порошку на 1 л	[14]

Примітка*: ціни наведено з перерахунку курсу рупій станом на 18.03.23

З таблиці 3.1. видно, що закордонні аналоги Вертициліну в загальному виготовляються в сухому вигляді.

Виходячи з того, що на даний час на ринку присутні альтернативні препарати, припускаємо, що будемо обробляти частку 2% насаджень огірків:

$$\frac{6300 \times 2}{100} = 126 \text{ га.}$$

Згідно інформації для використання Вертициліну [11], у період вегетації на 1 гектар використовується не менше 300 літрів робочого розчину. Повторні обробки здійснюються через 7-10 днів.

Тоді для обробки 126 га загальна кількість робочого розчину складає:

$$126 \times 300 = 37\,800 \text{ л} \approx 38\,000 \text{ л}$$

Огірок, в середньому має вегетаційний період в рамках – 40 - 70 днів [50].

Приймаємо для розрахунку, що вегетаційний період становить 70 днів. Якщо обробку здійснювати через 10 днів, то протягом зазначеного періоду вегетації кількість обробок становитиме:

$$70/10 = 7$$

Тоді сумарний обсяг робочого розчину для 7 обробок огірків:

$$38\,000 \times 7 = 266\,000 \text{ л}$$

Згідно рекомендацій до застосування референтного препарату Utkarsh VERTICOZ-P (Індія), на 1 л робочого розчину необхідно 7-9 г порошку [14]. Для зручності розрахунків обираємо дозу 7 г порошку препарату на 1 л.

Розрахуємо кількість порошку препарату, що міститься у 266 000 л робочого розчину:

$$1 \text{ л} - 7 \text{ г}$$

$$266\,000 \text{ л} - X \text{ г}$$

$$X = 266\,000 \times 7 \text{ г} = 1\,862\,000 \text{ г} = 1\,862 \text{ кг}$$

Підсумовуючи наведені розрахунки, для забезпечення річної потреби в біоінсектицидному препараті Вертицилін для обробки 126 га огірків у Львівській області в Україні у вегетаційний період слід отримати 1 862 кг біомаси *V. lecanii* IMI 332287.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Штам *V. lecanii* IMI 332287, як основа препарату Вертициліну, культивується глибинним методом та при цьому за 7 діб синтезує $18,88 \pm 0,86$ г/л біомаси [3].

Розрахуємо скільки культуральної рідини необхідно мати для забезпечення отримання 1 862 кг біомаси *V. lecanii* IMI 332287:

$$\frac{1\,862\,000}{18,88} \approx 98623 \text{ л}$$

Прийmemo, що у ході виробництва частка загальних втрат складе 10%, то культуральної рідини необхідно:

$$V_{кр} = 98623 \text{ л} / (1-0,1) \approx 109\,581 \text{ л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 294. Тоді значення кількості продукту на добу ($V_{д}$):

$$V_{д} = V_{кр} / T_{рд} = 109\,581 / 294 \approx 373 \text{ л}$$

Далі визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф}) / 24) = 109581 / ((373 \times 174) / 24) = 42 \text{ цикли,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та виробничий біосинтез – (168 год).

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

$$V_{крц} = K1 \times V_{д} \times T_{цф} / 24 = 1,1 \times 373 \times 174 / 24 \approx 3000 \text{ л,}$$

де $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій.

Розраховуємо об'єм ферментера для отримання 3000 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6:

$$V_{г} = V_{крц} / K_{зап} = 3000 / 0,6 = 5 \text{ м}^3,$$

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

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 3 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

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

$$V_{роб.1} = \frac{V_{кр}}{1-E_{ф}} = \frac{3}{1-0,1} \approx 3,3 \text{ м}^3$$

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

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом

$$V_{роб.1} = 3,3 \text{ м}^3.$$

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{ф.1} = 3,3/0,6 = 5,5 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 5 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = \frac{V_{роб.1}}{V_{сф}} = \frac{3,3}{5} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

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

$$V_{пс1} = \frac{V_{роб.1}}{1 + X_{ф}} = \frac{3,3}{1 + 0,1} = 3 \text{ м}^3$$

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

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 3,3 - 3 = 0,3 \text{ м}^3 = 300 \text{ л}$$

Для одержання 300 л культуральної рідини кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.2} = \frac{V_{пм1}}{1 - E_{ін}} = \frac{300}{1 - 0,1} = 333 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{ін.} = 333,3/0,6 = 555 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{сін} = 500 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = \frac{V_{роб.2}}{V_{сін}} = \frac{333,3}{500} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{333,3}{1+0,1} = 303 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 333,3 - 303 = 30,3 \text{ л}$$

Для одержання 30,3 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{30,3}{1-0,1} = 33,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 33,6/0,6 = 56 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 50 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{33,6}{50} = 0,67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = \frac{V_{\text{роб.3}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{33,6}{1+0,1} = 30,6 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 33,6 - 30,6 = 3 \text{ л}$$

Для одержання 3 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.4}} = \frac{V_{\text{пм3}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{3}{1-0,1} = 3,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора $V_{\text{ін.}} = 3,3 / 0,6 = 5,5 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 5 \text{ л}$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{3,3}{5} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс4}} = \frac{V_{\text{роб.4}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{3,3}{1+0,1} = 3 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 3,3 - 3 = 0,3 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу, що готується в колбах на качалці $V_{\text{пм4}} = 0,3$ л. Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням *V. lecanii* ІМІ 332287 у колбах на качалці об'ємом в 750 мл та коефіцієнтом заповнення 0,2.

Кількість колб при цьому становитиме:

$$n_{\text{колб}} = 300 / (750 \times 0,2) = 2 \text{ колби}$$

Таким чином, напрацювання інокуляту для виробничого отримання препарату Вертициліну у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 здійснюється у чотири стадії.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Verticillium lecanii є хемоорганогетеротрофом і використовує як джерело вуглецю глюкозу. За онлайн бази KEGG катаболізм глюкози був наведений шляхом Ембдена-Мейергофа [39].

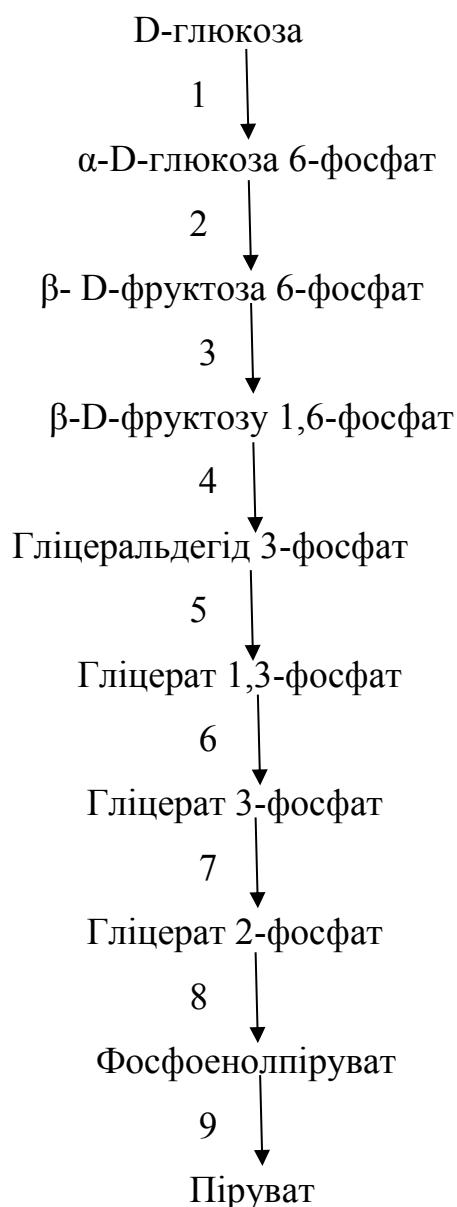
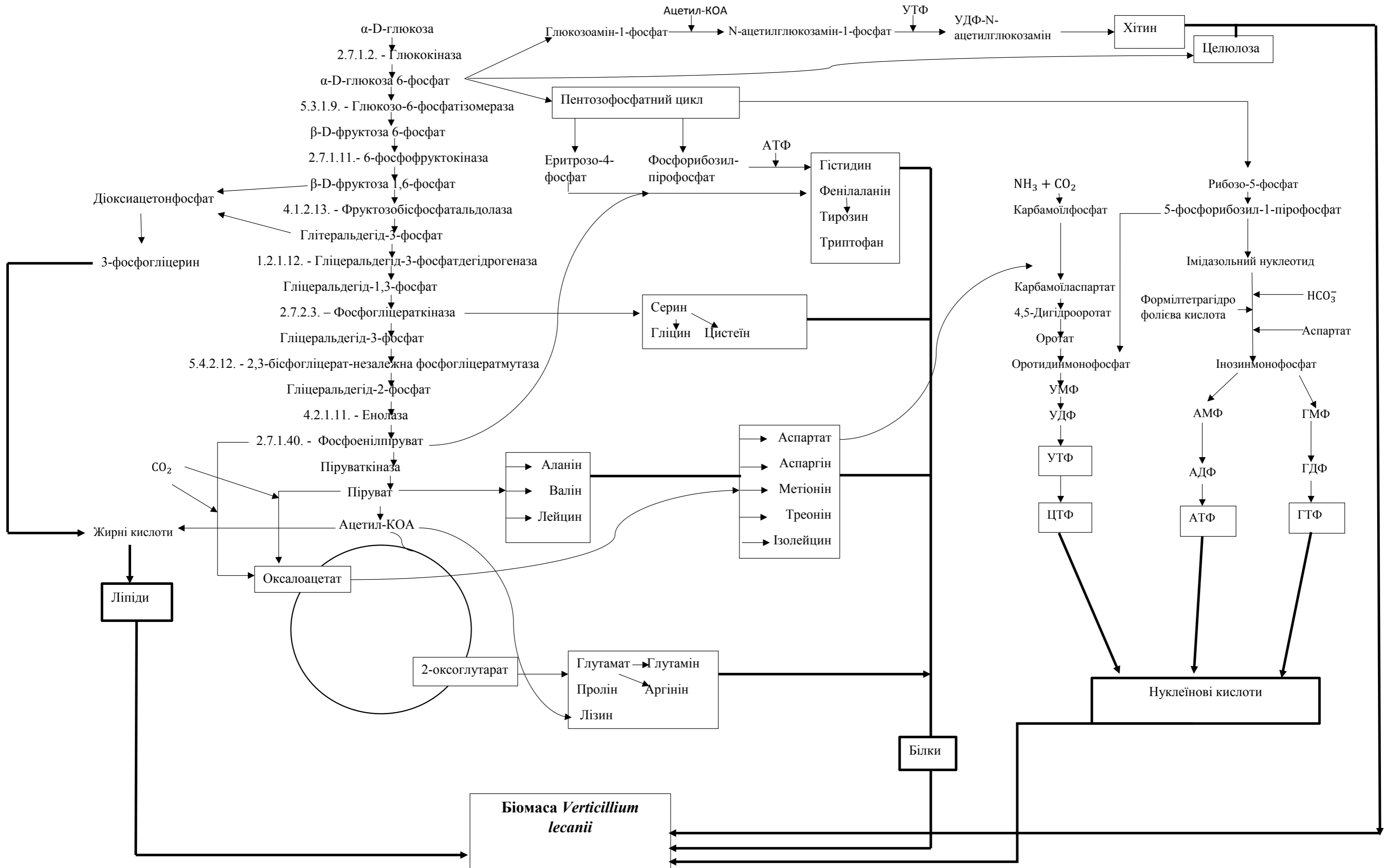


Рис. 4.1 Схема катаболізму глюкози *Verticillium lecanii*.

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Рибнікова О.В				Розділ 4. Біосинтез цільового продукту.	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.						34	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

4.2 Схема біотрансформації ростового субстрату у цільовий продукт.



РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.

Фізіолого-біохімічні ознаки: штами *V. lecanii* ростуть при температурі 10 – 30 °С, рН середовища 5 – 7,2. Оптимальними значеннями цих параметрів є 24 – 26 °С та рН 6 – 6,5 [51].

Обраний штам *V. lecanii* ІМІ 332287 культивується при 24 °С та рН=7. Температура відповідає рамкам оптимуму, а рН – просто рамкам можливих значень цього показника для росту. В статті вказувалось, що продуцент на рН 6 показує нижчі показники росту біомаси, ніж на рН 7. Але не було визначено значення рН=6,5. Тому, пропонується змінити це значення на рН=6,5, оскільки за загальною інформацією воно є більш підходящим [3,51].

Під час росту рН культури рідко залишається постійним через деградацію білків з утворенням лужних продуктів і ферментацію вуглеводів з утворенням органічних кислот. Зміни рН культури, що відбулися під час росту *V. lecanii* в декстрозо-пептонному середовищі, продемонстрували поступове зниження рН протягом інкубаційного періоду. Тому, варто передбачити титрувальні агенти для забезпечення нормальних умов культивування [3].

Температура та рН підходять для більшості мезофільних мікроорганізмів, які знаходять в навколишньому середовищі. Цей факт зумовлює обов'язкову асептичність процесу для належного процесу біосинтезу. Також, варто зазначити, що *V. lecanii* – це аеробні гриби, тому необхідно передбачити підготовку стерильного аераційного повітря.

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Рибнікова О.В			Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми.	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					36	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.						7		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Значення швидкості обертання в статі зазначено як 120 об/хв. За наявною інформацією, для грибів *V. lecanii* застосовуються низькі обертові режими, починаючи з 20 об/хв, закінчуючи 150 об/хв [3,52-54]. Оскільки культура є аеробною, значення швидкості перемішування є дуже важливим показником для покращення аерації товщі поживного середовища. Значення перемішування для обраного гриба знаходиться у межах оптимуму, а тому його пропонується не змінювати.

Перемішування передбачає глибинне культивування. *V. lecanii* це аскоміцетні гриби, а ці біологічні агенти можуть культивувати як глибинно так і поверхнево. Глибинний спосіб ґрунтується на вирощуванні мікроорганізмів у товщі середовища за рахунок розчиненого у рідині кисню. Переваги глибинного культивування: відсутність потреби у великих площах та громіздкому обладнанні; простота обслуговування; можливість автоматизації; зручність виділення продуктів метаболізму. Поверхневий метод передбачає займання великої кількості площ, а також, за часту, для нього використовують напівщільні та щільні середовища, що не відповідає стосовно культивування *V. lecanii* ІМІ 332287. Отже, залишаємо глибинний метод культивування [55].

Глибинне культивування можна здійснювати періодичним і безперервним способами. При періодичному способі у ферментер завантажують відразу весь обсяг живильного середовища і вносять посівний матеріал. Вирощування мікроорганізмів проводять в оптимальних умовах протягом певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментера і виділяють цільовий продукт [56].

Широко застосовують періодичне культивування з підживленням. Його сутність полягає в додаванні через певні проміжки часу порцій свіжого живильного середовища, що дозволяє підвищити продуктивність культури, в порівнянні зі звичайною періодичною ферментацією. Недоліки: відсутність відбору культуральної рідини з біореактора, що не дає можливості запобігти ефекта інгібування клітин біооб'єкта продуктами метаболізму [56].

Існує також об'ємно-доливне культивування, коли частина вмісту з біореактора час від часу вилучається при додаванні еквівалентного об'єму середовища (напівбезперервне культивування) [56].

При безперервному способі живильне середовище безперервно подається в ферментатор, в якому створюють оптимальні умови для росту мікроорганізмів, а з ферментатора також безперервно відтікає культуральна рідина разом з мікроорганізмами. У безперервних процесах біооб'єкт підтримується в експоненційній фазі росту. При цьому існує рівновага між приростом біомаси за рахунок поділу клітин і її зменшенням у результаті розрідження свіжим середовищем [56]. Нажаль, чіткої інформації щодо безперервного культивування грибів *V. Lecanii* немає, а дослідження спрямовані на періодичне культивування. Тому, пропонується обрати періодичний метод культивування.

Маємо справу з грибом, і не просто грибом, а його біомасою. Це означає, що звичайний ферментер з лопатевою мішалкою не підходить для забезпечення нормальних умов культивування. Лопаті будуть розрізати міцелій гриба, який представляє більшу частину біомасу. Для уникнення такої небажаної реакції в промисловості використовують еірліфтні ферментери. Для нашого виробництва передбачено апарат, об'ємом 5 м³, з цього маємо почати пошук відповідного біореактору.

Компанія Shanghai bailun biological technology co., LTD спеціалізується на виробництві різного ферментаційного обладнання, у тому числі й еірліфтних ферментерів. Дана фірма може виконати апарат на замовлення, тому пропонується викласти параметри необхідного ферментеру які забезпечить наші потреби [57].



Рис.5.1. Приклад виконання роботи Shanghai bailun biological technology co., LTD [57].

Дана компанія виготовляє ферментери згідно принципів GMP та стандартів ISO 9001. Окрім того, що ферментер має бути єрліфтного типу, має бути забезпечена низка інших параметрів. Сам апарат має бути виготовлено з нержавіючої сталі типу 316L. Ферментер має бути оснащений датчиками контролю рН, температури, тиску, розчиненого кисню, піноутворення та подачі повітря. Також, важливо, щоб даний апарат міг підключатися до СІР мики, а автоматична стерилізація також буде в нагоді на біотехнологічному заводі. Швидкість перемішування має становити від 50 об/хв і вище. Ферментер має бути оснащений подвійною сорочкою та витримувати тиск в 0,3 МПа. Всі ці вимоги зазначена компанія може виконати на замовлення [57].

5.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Варто зазначити, що *Verticillium lecanii* – це аеробні гриби, тому необхідно передбачити підготовку стерильного аераційного повітря [3].

Особливо високі вимоги до стерильності пред'являються при підготовці повітря для аерації глибинної культури [58].

Існує кілька способів очищення й стерилізації повітря, заснованих на двох принципах: умертвіння мікроорганізмів і їхнє механічне відділення. Перший принцип лежить в основі методів впливу високих температур, ультрафіолетового або іонізуючого випромінювання, фенол- і ртутьвмісних агентів, пропущення повітря через 10%-ний розчин лугу або 15-20%-ний розчин кислоти в спеціальних вежах.

Використання хімічних агентів, що стерилізують, неприпустимо, тому що сліди їх в апаратах і середовищах можуть впливати негативно на розвиток мікроорганізмів-продуцентів. Використання методу впливу сухого тепла для стерилізації повітря при температурі до 300°C ефективно вбиває мікрофлору, але економічно не виправдано.

Найбільше поширення у мікробіологічній промисловості одержала стерилізація повітря методом фільтрування через волокнисті або зернисті фільтруючі матеріали. На ефект стерилізації повітря методом фільтрування впливає ступінь засміченості повітря, оскільки самі мікроорганізми мають розміри від 0,01 до 25 мкм, але вони осідають на частки пилу, і ступінь уловлювання залежить від розмірів цих часток. Вміст бактеріальних забруднень у повітрі в середньому становить 1000- 1500 клітин в 1 м³, але воно може підніматися до 10⁴. Крім мікроорганізмів у повітрі є пил органічної й неорганічної природи, пари води, і загальна кількість сторонніх часток може досягти 10⁹ в 1 м³.

Кількість мікроорганізмів в атмосферному повітрі убуває зі збільшенням висоти над рівнем землі; мікробна засміченість повітря у вологих районах або районах із сильними вітрами й ґрунтами, що порошать, значно вище. Кількість мікроорганізмів у повітрі міняється залежно від пори року; найменша кількість мікроорганізмів у повітрі спостерігається в зимовий час.

У приміщення й апарати повітря подається потужними компресорами; проходячи через них, повітря засмічується механічними включеннями від тертьових деталей і крапельками мастил при використанні поршневих компресорів. При фільтрації повітря відбувається також його очищення від цих механічних домішок. Потужність компресора підбирають із таким розрахунком, щоб забезпечити подачу повітря через всю систему очищення у ферментери щоб у процесі культивування підтримувався надлишковий тиск 0,01-0,03 МПа.

Стиснення повітря супроводжується його сильним нагріванням, тому після компресорів повітря надходить у холодильник. Щоб видалити з повітря зайву вологу, його необхідно прохолоджувати до температури нижче точки роси.

Далі повітря прямує на очищення спочатку в головний, а потім в індивідуальні фільтри.

Відповідно до технологічної схеми одержання стерильного стисненого повітря всі фільтруючі матеріали можна розділити на три групи: матеріали для попереднього очищення повітря, матеріали для стадії грубого очищення (головні фільтри) і матеріали для стерилізації повітря (індивідуальні фільтри). Для нормальної роботи фільтруючих матеріалів необхідно підтримувати в системі підготовки повітря оптимальний термодинамічний режим. Конденсація вологи з повітря і її можливе нагромадження в трубопроводах можуть привести до розвитку в них мікроорганізмів і контамінації процесу.

Так, для заключного тонкого очищення повітря використовуються індивідуальні фільтри, які встановлюються перед кожним ферментатором і повинні забезпечувати очищення повітря від часток діаметром 0,3 мкм на 99,999 %. Фільтруючі матеріали, використовувані на стадії тонкого очищення, поділяються на кілька груп: тонковолокнисті матеріали у вигляді матів, картону й паперу, зернисті тверді фільтруючі перегородки (керамічні, металокерамічні, з полімерних матеріалів) і мембранні фільтри. Високоєфективними фільтруючими матеріалами є азбестовоцелюлозні папери й картони. На підприємствах біотехнологічної промисловості в якості індивідуальних фільтрів до ферментерів використовують фільтри тонкого очищення типу ФТО, усередині яких укладається елемент із гофрованої тканини Петрянова [58].

5.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Мийні та дезінфікуючі засоби використовуються для очищення поверхонь, рук персоналу та при проведенні різних видів прибирання - від щоденного до загального. Рекомендується регулярно змінювати ці засоби кожні 1-3 місяці. Можна обрати або скласти комплексний план з мийними та дезінфікуючими засобами, що найкраще відповідає потребам виробництва. Також важливо врахувати інструкції виробника та стандарти безпеки на робочому місці.

На ринку України представлені наступні мийчі та дезінфікуючі засоби.

PROFI CHLOR. Засіб дезінфікуючий за ТУ У 20.2-38885305-004:2018.

Фірма виробник – ТОВ «ВЛАДАСЕПТ».

Склад засобу : основною діючою речовиною є натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти з масовою часткою активного хлору 54,0-58,0 % . Допоміжні речовини: адипінова кислота, бікарбонат натрію, карбонат натрію, сульфат натрію.

Використовується для поточної, заключної та профілактичної дезінфекції поверхонь приміщень, приладів, устаткування, санітарно-технічного обладнання підприємства фармацевтичної, мікробіологічної промисловості.

Дезінфекційний засіб «PROFI CHLOR» ефективно знищує грамнегативні і грампозитивні бактерії, включаючи збудників туберкульозу, кишкової палички (включаючи ентерогеморагічну), стафілококів (включаючи MRSA), ентерококів, сальмонел, легіонел, лістерій, туляремії, бруцельозу, холери та інших особливо небезпечних інфекцій, зокрема зоонозних, дифтерії, скарлатини, кашлюку, менінгіту, дизентерії, черевного тифу і паратифів. Він також діє проти збудників внутрішньолікарняних інфекцій, таких як MRSA і синьогнійна паличка, та особливо небезпечних інфекцій, як чума, холера, туляремія і сибірська виразка.

Засіб має віруліцидні властивості, ефективно знищуючи збудників ГРВІ, грипу (включаючи пташиний грип H5N1 і свинячий грип H1N1), парагрипу, аденовірусів, атипової пневмонії (SARS), герпесу, гепатитів А, В і С, ВІЛ, філовірусів (включаючи Ebola), ротавірусів та ентеровірусів, таких як поліовіруси, ЕСНО і Коксакі. Крім того, він має фунгіцидну активність проти кандидозів, грибів роду *Candida*, патогенних дерматофітів, пліснявих грибів та спор, а також запобігає появі плісняви[59-60].

Делаксон. Засіб дезінфікуючий за ТУ У 20.2-22920528-016:2013.

Виробник: ТОВ «Делана» (Україна).

Основними діючими речовинами є пероцтова кислота у межах 5,0-25,0% та пероксид водню у межах 9,0-22,0%.

Використовується для поточної, заключної та профілактичної дезінфекції поверхонь приміщень, приладів, устаткування, санітарно-технічного обладнання підприємства фармацевтичної, мікробіологічної промисловості.

«Делаксон» володіє бактерицидними, фунгіцидними, віруліцидними, туберкулоцидними і спороцидними властивостями[61].

Гембар. Засіб дезінфікуючий за ТУ У 24.2-21643506.002-01.

Виробник: НВП «Біоцид».

Діюча речовина – полігексаметиленгуанідін гідрохлорид - 25,0%.

Належить до дезінфікуючих засобів тривалої дії. Випускається у вигляді рідкого концентрату.

Засіб використовують для дезінфекції різного обладнання, інвентарю, поверхонь. Відноситься до малонебезпечних речовин(IV клас небезпеки). Володіє такими пролонгованими властивостями: бактерицидна, віруліцидна та фунгіцидна. Робочі розчини готують концентрацією 0,4 %. Вони можуть зберігатись до 6 місяців[62].

Таблиця 5.1

Узагальнена характеристика витрат миючих та дезінфікуючих засобів

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л (кг) мийного або дез. засобу, Грн/л(кг)	Вартість 1 л робочого розчину мийного або дез.засобу, Грн/л	Витрати роб.розчину, л/м ²	Ефективність використання дез.розчину, Е _{дз} , Грн/м ²
PROFI CHLOR	Поверхні, стіни, двері, підлога	0,1	300	0,3	0,1	30
Делаксон	Поверхні, стіни, двері, підлога	1	170,40	1,70	0,1	17,04
Гембар	Поверхні, стіни, двері, підлога	0,4	516	2,06	0,1	51,6

5.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Оскільки кінцевим продуктом ферментації нашого виробництва є біомаса, то середовище для підготовки інокуляту та виробничого біосинтезу є однаковим. Його склад зазначено нижче, з врахуванням перерахунку (г/л) [3]:

- 1) Глюкоза – 20,
- 2) Пептон – 5,
- 3) Дріжджовий екстракт – 11,63,
- 4) NaCl – 5,
- 5) K_2HPO_4 – 5

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

Спираючись на температурний режим стерилізації кожного компонента, умовно ділимо середовище на дві наступні композиції:

Композиція А: глюкоза. Режим стерилізації: 112 °С, 20 хв при 0,05 МПа.

Композиція Б: пептон та дріжджовий екстракт. Режим стерилізації: 120 °С, 20 хв при 0,075 МПа.

Композиція В: хлорид натрію, гідроортофосфат калію. Режим стерилізації: 131°С, 40 хв при 0,15 МПа.

Глюкозу відокремлюємо, оскільки для неї передбачено невисоку температуру стерилізації, оскільки за більш вищої вона почне карамелізуватись, при цьому змінюючи колір поживного середовища на більш темний, що також може мати вплив на біосинтез. Також, при розділу води на композиції варто передбачити, що цей цукор готують як 40-% розчин, оскільки за такої концентрації в композиції не буде відбуватись ріст сторонньої мікрофлори.

Таблиця 5.2

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в колбах на качалці

Компонент	Концентрація, г/л	Кількість компонента в 300 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глюкоза	20	6	А	15
Вода	9 мл			
Дріжджовий екстракт	11,63	3,5	Б	185

Пептон	5	1,5		
Вода	180 мл			
NaCl	5	1,5	В	100
K ₂ HPO ₄	5	1,5		
Вода	97 мл			

Всі компоненти ще мають невелику вагу, тому їх можна зважити на технічних вагах. Композицію А потрібно готувати в колбі на 50 мл з використанням піпетки на 10 мл для дозування води. Композицію Б варто готувати в колбі 0,5 л, а для дозування води використати мірний циліндр на 250 мл. Для композиції В – колба на 250 мл та циліндр на 100 мл.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Оскільки об'єм стадії отримання інокуляту в апараті об'ємом 5 л є вкрай малим, деякі композиції все ще можна готувати в термостійких колбах, оскільки це буде дешевше, ніж використати додатковий реактор з нержавіючої сталі.

Склад композицій залишається незмінним.

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 5 л

Компонент	Концентрація , г/л	Кількість компоненту в 3 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції ї, мл
Глюкоза	20	60	А	150
Вода	90 мл			
Дріжджовий екстракт	11,63	34,9	Б	500
Пептон	5	15		
Вода	≈ 450 мл			
NaCl	5	15	В	2350
K ₂ HPO ₄	5	15		
Вода	≈ 2090 мл			
Конденсат	≈ 235 мл			

Всі компоненти ще мають невелику вагу, тому їх можна зважити на технічних вагах. Композицію А готуємо в колбі на 250 мл з використанням мірного циліндру на 100 мл для визначення об'єму води. Композицію Б потрібно готувати в колбі на 1 л, а для вимірювання води використати мірний циліндр на 2 л. Для стерилізації композиції В будемо використовувати інокулятор на 5 л, в якому в подальшому буде відбуватись процес підготовки посівного матеріалу, оскільки це солі, які потребують високої температури стерилізації, разом з даною композицією одночасно простерилізується й

апарат . Для попереднього розчинення солей використовуємо колбу об'ємом 1 літр , а для вимірювання води мірний циліндр на 1 л.

Таблиця 5.4

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 50 л

Компонент	Концентрація , г/л	Кількість компоненту в 30 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	612	А	1,5
Вода	900 мл			
Дріжджовий екстракт	11,63	355,87	Б	2,5
Пептон	5	153		
Вода	≈ 2000 мл			
NaCl	5	153	В	26,626
K ₂ HPO ₄	5	153		
Вода	23,7 л			
Конденсат	≈ 2,6 л			

З таблиці 5.4 видно, що всі компоненти ще мають невелику вагу, тому їх можна зважити на технічних вагах. Композицію А варто готувати у термостійкій колбі об'ємом 2 л при цьому використовувати мірний циліндр на 1 л. Композицію Б також можна приготувати в колбі на 5 л, а для вимірювання води передбачити мірний циліндр на 2 л. Композиції А та Б стерилізуються в автоклаві та вносяться через конектор.

Солі будемо розчиняти в окремому реакторі на 10 л , а стерилізувати в інокуляторі на 50 л, який після змішування усіх композицій для одержання повноцінного поживного середовища та внесення посівного матеріалу буде використовуватись для одержання інокуляту на наступну стадію.

Таблиця 5.5

Розрахунок поживного середовища для стадії підготовки інокуляту в інокуляторі на 500 л

Компонент	Концентрація , г/л	Кількість компоненту в 300 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	20	6,06	А	15
Вода	7,5 л			
Конденсат	1,5 л			
Дріжджовий екстракт	11,63	3,52	Б	15
Пептон	5	1,5		
Вода	≈ 8,5 л			
Конденсат	1,5 л			
NaCl	5	1,5	В	273
K ₂ HPO ₄	5	1,5		
Вода	≈242 л			

Конденсат	27,3 л		
-----------	--------	--	--

З табл. 5.5 можна зробити висновок, про те, що всі компоненти зважують на вагових дозаторах через їх немалу вагу. Композицію А та Б готують та стерилізують в окремих реакторах на 20 л відповідно, а композицію В –стерелізують в інокуляторі на 500 л, в якому після усіх відповідних дій буде відбуватись процес підготовки посівного матеріалу для стадії виробничого біосинтезу, а розчиняють в реакторі на 10 л.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Найбільший об'єм поживного середовища припадає на стадію виробничого культивування і складає 2,7 м³. Таку кількість слід також розбити за окремими композиціями з використанням реакторів та інокуляторів, тому додатково передбачувати установку безперервної стерилізації не потрібно. Поділ на композиції залишається незмінним.

Таблиця 5.6

Розрахунок поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері на 5 м³

Компонент	Концентрація , г/л	Кількість компоненту в 3000 л поживного середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції ї, л
Глюкоза	20	60	А	150
Вода	75 л			
Конденсат	15 л			

Дріжджовий екстракт	11,63	34,9	Б	150
Пептон	5	15		
Вода	≈ 85,1 л			
Конденсат	15 л			
NaCl	5	15	В	2700
K ₂ HPO ₄	5	15		
Вода	2400 л			
Конденсат	270 л			

Оскільки середовище готують для виробничого біосинтезу, вага усіх компонентів є значною, а тому необхідною є наявність вагових дозаторів. Композицію А та Б готують та стерилізують в окремих реакторах на 200 л відповідно, а В – стерилізують у виробничому ферментері на 5 м³, а готують у реакторі об'ємом 200 л.

5.5. Обґрунтування вибору розчинів для корекції рН в процесі культивування.

Обраний штам *V. lecanii* ІМІ 332287 культивується рН=7. Значення рН відповідає рамкам можливих значень цього показника для росту. В статті вказувалось, що продуцент на рН 6 показує нижчі показники росту біомаси, ніж на рН 7. Але не було визначено значення рН=6,5. Тому, пропонується змінити це значення на рН=6,5, оскільки за загальною інформацією воно є більш підходящим [3, 51].

Під час росту рН культури рідко залишається постійним через деградацію білків з утворенням лужних продуктів і ферментацію вуглеводів з утворенням органічних кислот. Зміни рН культури, що відбулися під час росту *V. lecanii* в декстрозо-пептонному середовищі, продемонстрували поступове зниження рН протягом

інкубаційного періоду [3]. Тому варто передбачити титрувальні агенти для забезпечення нормальних умов культивування.

У зв'язку з цим, готують розчини кислоти та лугу. Для підкислення поживного середовища в ході росту біомаси обираємо 6% розчин хлоридної кислоти. Для збалансування значення рН до оптимального готують розчин лугу. Обираємо 6% розчин гідроксиду натрію, який готують та стерилізують за температурного режиму, аналогічного для стерилізації солей.

5.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Для отримання Вертициліну необхідно провести наступні стадії (етапи):

1. Концентрування культуральної рідини.
2. Мікробіологічний контроль.
3. Маркування та фасування.

1. Концентрування культуральної рідини.

Концентрування культуральної рідини є процесом зменшення об'єму рідини, у якій вирощують мікроорганізми або клітини, зберігаючи при цьому їхні властивості. Цей процес може здійснюватися шляхом випаровування рідини або використання фільтрації для видалення зайвої рідини, що дозволяє збільшити концентрацію корисних мікроорганізмів чи клітин у кінцевому продукті.

Оскільки, даний кінцевий варіант препарату буде використовуватись, як препарат для захисту рослин, то максимально маємо зменшити собівартість виділення та очищення субстанції. Кінцева форма препарату має вигляд рідини, що містить спори і міцелій ентомопатогенного гриба *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* та його інсектицидні метаболіти[11].

Щоб оптимізувати процес виробництва даного препарату обираємо вакуум – випарювання, як такий що задовольняє виробничі потреби.

Вакуумне випарювання – це метод концентрування рідких розчинів нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника під час кипіння рідини в умовах

вакууму. Використання вакууму дозволяє проводити процес при нижчих температурах, що запобігає руйнуванню речовин, які можуть розкладатися [63].

В кінцевому препараті має бути титр не нижче $2,0 \times 10^9$ КУО/мл [10].

Титр культуральної рідини після біосинтезу 180×10^6 КУО/мл [64].

Щоб визначити ступінь концентрування потрібно виконати відповідні розрахунки:

$$2,0 \times 10^9 - 180 \times 10^6 = 182 \times 10^7$$

$$2,0 \times 10^9 - 100\%$$

$$182 \times 10^7 - x\%$$

$$x = \frac{182 \times 10^7 \times 100}{2,0 \times 10^9} = 91\%$$

Тобто ступінь концентрування становить 91%, що означає що треба провести концентрування до 9% від початкового об'єму.

Процес вакуум-випаровування складається з таких етапів:

1. Подіча культуральної рідини в корпус вакуум випарної установки.

2. Подача первинної пари в апарат.

3. За рахунок різниці тисків культуральна рідина переходить в 2 корпус вакуум випарки. Так як температура кипіння в кожному послідуєчому корпусі знижується, то розчин поступає у 2 корпус з температурою більш високою ніж температура кипіння. В результаті розчин охолоджується і за рахунок тепла, що віддається при цьому, випаровується деяка кількість води (самовипарювання).

4. Пара яка залишилась після 2 корпусу поступає на барометричний конденсатор і зливається.

5. Конденсат який утворився під час випарювання також зливається

6. Після концентрування препарат зливається в резервуар.

2. Мікробіологічний контроль.

На цьому етапі перевіряють кількість живих клітин грибів методом висівання їх на чашку Петрі і використовують агар SMY та ставлять в термостат при $28\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.Маркування та фасування.

Після завершення всіх стадій післяферментаційних процесів, концентрат розливають у каністри та маркують, наносячи етикетку. Щоб максимально зменшити собівартість кінцевого препарату обираєм для розливу ПЕТ-пляшки.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

У таблиці 6.1 наведено специфікацію технологічного обладнання, зображеного на апаратурній схемі у графічній частині курсового проєкту.

Таблиця 6.1

Специфікація ділянки культивування капреоміцину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	<p>Вентиляційний повітрязабірник Т35-5.6А/0.75KW.</p> <p>Матеріал – чавун, алюмінієвий сплав.</p> <p style="text-align: center;">Тип каналу круглий.</p> <p>Компанія: «Guangdong Yujin Ventilation Equipment Co., Ltd.» (Україна) [65]</p>
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	<p>Повітряний фільтр для видалення механічних часток, крапель вологи або зважених частинок.</p> <p>Уловлювання часток розміром понад 0,4 мікрона. Ефективність очищення не менше 40%.</p> <p>Компанія: «Selton» (Україна) [66]</p>
К-3	Компресор	1	<p>Компресор повітряний ремінний SIGMA. Об'єм 200 л. Продуктивність 865 л/хв. Тиск 10 бар.</p> <p>Компанія: «BAUSHOP» (Україна) [67]</p>
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	<p>Охолоджувач стисненого повітря МТА AF 037. Витрата повітря 216 м³/год.</p> <p>Матеріал – оцинкований листовий метал.</p> <p>Компанія: «МТА» (Італія) [68]</p>

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ		
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Рибнікова О.В				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.				55	100	
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

**Розділ 6. Специфікація
обладнання**

Продовження таблиці 6.1

Р-5	Ресивер	1	Ресивер на 200 літрів. Максимальний робочий тиск 12 бар. Максимальна робоча температура 100°C. Мінімальна робоча температура -20°C Компанія: «Компресормаш-Сервіс» (Україна) [69]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000х500-2. Наявний датчик системи антизамерзання, датчик температури. Мінімальний робочий тиск 16 бар. Максимальна температура води 100°C. Компанія: «VENCON» (Україна) [70]
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Повітряний фільтр, затримує частки розміром 0,3 мкм. Ступінь очищення 95%. Об'ємна продуктивність до 50 млн м ³ / добу. Компанія: «NEW FILTER» (Україна) [71]
Д-8	Дозатор рідини	1	Дозатор електричний для корозійних рідин. Продуктивність близько 3л/хв. Дозатор обладнаний спеціальним магнітним насосом, щоб запобігти корозії. Має ручний і автоматичний режим фасування. Компанія: «ShopNow» (Україна) [72]
Р-9 Р-11 Р-16 Р-26	Реактор 10 л	4	Скляний реактор об'ємом 10 літрів з боросилікатного скла. Обладнаний стійким до корозії скляним кожухом. Діапазон температур: -120 °С ~ 250 °С. Тиск сорочки ≤0,05 МПа, тиск в реакторі ≥-0,098 МПа. Швидкість обертів: 1200 об/хв. Компанія: «Labfirst Scientific» (США) [73]

Продовження таблиці 6.1

Д-10 Д-12 Д-15	Ваги технічні	3	Ваги лабораторні ТВЕ ТВЕ-0,3-0,005-а. Максимум зважування 300 г, мінімум 0,1 г. Дискретність 0,005 г. Клас точності за ДСТУ EN 45501 – П, Компанія: «Техноваги» (Україна) [74]
Ф-13 Ф-17 Ф-27 Ф-38	Фільтр індивідуальний	4	Фільтр очистки стисненого повітря. Ступінь фільтрації ХР. Затримка часток розміром 0,01 мкм. Ефективність очистки 99.9999%. Початковий перепад тиску 300 мбар. Продуктивність 365 м ³ /год. Компанія: «Parker» (США) [75]
ІН-14	Інокулятор 5 л	1	Біореактор-ферментер 5 л. Обладнаний датчиками контролю рН, піни, температури, рівня рідини, асептичними портами. Температурний діапазон від 5 до 60 °С. Можливість здійснення підживлення 0.02-40 мл/хв. Габарити 930x800x600 мм. Компанія: «Froilabo» (Франція) [76]
ІН-18	Інокулятор 50 л	1	Біореактор з нержавіючої сталі GUJS-50 на 50 л з механічним перемішуванням. Матеріал: змочувані частини SS316L/незмочувані частини SS304. Можливість здійснення аерації, встановлений піногасник. Можливість стерилізації на місці. Компанія: «EASTBIO» (Китай) [77].
Д-19 Д-22 Д-25 Д-29 Д-32	Дозатор ваговий	6	Ваговий дозатор NPF-5000. Матеріал корпусу нержавіюча сталь. Діапазон дозування 10-5000 г. Робоча температура 10-40°С. Компанія: «ABC TECH» (Україна) [78]

Продовження таблиці 6.1

Д-35			
Р-20 Р-23	Реактор 20 л	2	Лабораторний реактор робочим об'ємом 20 л. Комплектація датчиками: рН, розчиненого O ₂ , рівня рідини та температури. Швидкість обертання мішалки від 150 до 500 об/хв. Габаритні розміри, мм: 1085x600x1150. Компанія: «Промвіт» (Україна) [79]
Н-21 Н-24	Насос діафрагмовий	2	Електричний діафрагмовий насос Remco. Максимальна продуктивність 20,09 л/хв. Максимальний тиск 10 атмосфер. Система захисту насосу від перевантаження до 4 атмосфер. Компанія: «Tech-farming» (Україна) [80]
ІН-28	Інокулятор 500 л	1	Ферментер об'ємом 500 л. Об'єм т/о сорочки 73 л. Матеріали виготовлення поверхонь: сталь AISI 316 L, сталь AISI 304. Габаритні розміри, мм: 1500*1135*3122 мм. Компанія: «Промвіт» (Україна) [81]
Р-30 Р-33 Р-36	Реактор 200 л	3	Вертикальний резервуар Mcmillan з нержавіючої сталі об'ємом 200 літрів. Внутрішній діаметр 600 мм, довжина 1000 мм. Номінальний внутрішній тиск 1,5 бар/повний вакуум при 20 °С. Компанія: «McMillan» (Канада) [82]
Н-31 Н-34 Н-37	Насос відцентровий	4	Поверхневий відцентровий багатоступінчастий насос LEO з нержавіючої сталі AISI 304. Максимальний напір 45 м. Пропускна здатність 100 л/ хв. Мінімальна температура робочої рідини 4 °С. Максимальна температура робочої рідини 40 °С. Матеріал корпусу нержавіюча сталь, чавун. Компанія: «LEO Group» (Китай) [83]

Закінчення таблиці 6.1

Н-40			<p>Поверхневий відцентровий насос LEO 380В з нержавіючої сталі AISI 304.</p> <p>Максимальний напір 50 м. Пропускна здатність 450 л/хв . Мінімальна температура робочої рідини 2 °С. Максимальна температура робочої рідини 45 °С. Матеріал корпусу нержавіюча сталь, чавун.</p> <p>Компанія: «LEO Group» (Китай) [83]</p>
ФР-39	Ферментер 5 м ³	1	<p>Ферментер 5000 л з нержавіючої сталі типу 316L/304L. Оснащений датчиками контролю рН, температури, тиску, розчиненого кисню, піноутворення та подачі повітря, СІР-мийкою. Габаритні розміри 3500мм*3500мм*8000мм.</p> <p>Компанія: «Shanghai bailun biological technology co., LTD» (Китай) [84]</p>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Обране біотехнологічне виробництво передбачає синтез біомаси *Verticillium lecanii* ІМІ 332287. До допоміжних робіт відноситься підготовка аераційного повітря, а також приготування та стерилізація поживного середовища. До технологічного процесу відноситься підготовка інокуляту, а також саме виробниче культивування.

ДР 1 – Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. – Підготовка персоналу (спеціальний одяг, миття рук та ін.)

ДР 1.2. – Підготовка приміщень

ДР 1.2.1 – Щоденне прибирання.

Прибирання виробничих приміщень проводиться виробничим персоналом та прибиральниками виробничих приміщень. Здійснюють контроль ТК, візуально і Км КУО > 800 см². Відпрацьований розчин направляється на знешкодження рідких відходів(ЗВ 1.1).

ДР 1.2.2 – Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання, яке включає в себе миття стін, вікон та дверей, проводять 1 раз на місяць. Також проводять прибирання і наведення порядку в шафах, стелажах, очищення та дезінфекційну обробку повітроводів і вентиляційних камер та виконують усі заходи щотижневої підготовки приміщень. Здійснюють контроль ТК, візуально і Км КУО > 300 см². Відпрацьований розчин направляється на знешкодження рідких відходів(ЗВ 1.1).

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ			
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 7. Опис технологічної схеми.	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Рибнікова О.В						
Перевір.		Воронцов О.О.					60	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1 Забір повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник ПЗ-1 на висоті 3 м. Така висота обумовлена тим фактом, що кількість пилових часток і біологічних агентів є дуже низькою.

ДР 2.2. Груба очистка повітря

Обов'язковим кроком є очищення повітря від пилу та механічних часток. Таку операцію здійснюють у фільтрі Ф-2 із затримуючою здатністю 80%.

ДР 2.3. Компресування повітря

Повітря стискають в компресорі К-3, до тиску близько 0,4 МПа. При цьому передбачається підвищенням температури повітря, тому наступним кроком ми маємо його охолодити.

ДР 2.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості

Для мінімізації контамінації, повітря різко охолоджують до 19 °С у теплообміннику Т-4. Потім одержана волога зріджується в ресивері Р-5, таким чином кінцева вологість становить близько 60 %.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря у теплообміннику Т-6 нагрівають до температури 30 °С.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Нагріте повітря пускають через головний фільтр Ф-7. Ступінь очищення повітря збільшується до $E = 95\%$.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед інокуляторами та ферментером встановлюють індивідуальні фільтри Ф-13, Ф-17, Ф-27, Ф-38, ступінь очищення яких становить $E = 99,99998\%$. Очищене повітря подають до стадій ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1.

ДР 3. Приготування та стерилізація розчинів корекції рН в процесі культивування.

ДР 3.1. Приготування 6% розчину HCl

При приготуванні розчину варто враховувати, що кислоту неможна стерилізувати термічною обробкою, оскільки вона випаровується. Враховуючи те, що титрант готується з сильно концентрованого розчину, на якому нічого не росте, пропонується передбачити стерильний реактор із стерильною водою. При цьому не буде порушуватись правило техніки безпеки щодо додавання кислоти до води.

До реактора Р-9 за допомогою дозатора рідин Д-8 наливають 5,1 л води водопровідної, з врахуванням того що 10% піде на конденсат. Після цього, кришку реактора закривають та до сорочки подають глуху пару. Встановлюється режим стерилізації при 131 °С протягом 40 хв з тиском 0,15 МПа. Після стерилізації, воду обов'язково охолоджують до кімнатної температури. Після цього, в асептичних умовах в стерильний мірний циліндр на 2 л наливають 1,1 л 37-% розчину соляної кислоти, та асептично, через факел, вносять кислоту до реактору. Вмикається мішалка для повної гомогенізації розчину. Розчин подають самоплином до ІН-14, ІН-18, ІН-28, ФР-39.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH

На технічних вагах Д-10 зважують 0,4 г NaOH та вносять в реактор Р-11. В реактор за допомогою лічильника подають 6,66 л води водопровідної, перемішують. При цьому подають глуху пару в сорочку апарата. Стерилізацію проводять при 131 °С протягом 40 хв з тиском 0,15 МПа. Розчин подають самоплином до ІН-14, ІН-18, ІН-28, ФР-39.

ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища.

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

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 6 г глюкози. Після цього, наважку пересипають у колбу об'ємом 50 мл. Після цього, за допомогою піпетки на 10 мл до глюкози доливають 9 мл води водопровідної. Після цього, колбу ставлять на водяну баню та постійно перемішують до повного розчинення цукру. Після цього, колбу закривають

ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію в автоклав при 112 °С протягом 20 хв з тиском 0,05 МПа.

ДР 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 1,5 г пептону та 3,5 г дріжджового екстракту. Після цього, сухі компоненти пересипають в конічну термостійку колбу на 500 мл, доливаючи мірним циліндром на 250 мл 180 мл води водопровідної. Сухі компоненти розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування. Колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію в автоклав при 120 °С протягом 20 хв з тиском 0,075 МПа.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують по 1,5 г хлориду натрію та гідроортофосфату натрію. Солі пересипають в конічну термостійку колбу на 250 мл, доливаючи мірним циліндром на 100 мл 97 мл води водопровідної. Солі розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування. Колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію в автоклав при 131 °С протягом 40 хв з тиском 0,15 МПа.

ДР 4.1.4. Змішування композицій А,Б,В

До простерилізованої композиції Б в асептичних умовах переливають 100 мл стерильної композиції В (від ДР 4.1.3), а також вносять 6 мл стерильного 40-% розчину глюкози (від ДР 4.1.1) за допомогою стерильної піпетки на 10 мл. Вміст колби ретельно змішується, закривається стерильним ватно-марлевым корком та передається на стадію ТП 5.4.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 5 л

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 60 г глюкози. Після цього, наважку пересипають у колбу об'ємом 0,25 л. Після цього, за допомогою мірного циліндру на 100 мл до глюкози доливають 90 мл води водопровідної. Після цього, колбу ставлять на водяну баню та постійно перемішують до повного розчинення цукру. Після цього, колбу

закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію в автоклав при 112 °С протягом 20 хв з тиском 0,05 МПа.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 15 г пептону та 34,9 г дріжджового екстракту. Після цього, сухі компоненти пересипають в конічну термостійку колбу на 1 л, доливаючи мірним циліндром на 0,5 л 450 мл води водопровідної. Сухі компоненти розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування. Колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію в автоклав при 120 °С протягом 20 хв з тиском 0,075 МПа.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують по 15 г хлориду натрію та гідроортофосфату натрію. Солі пересипають в колбу об'ємом 1 л, доливаючи за допомогою мірного циліндру на 1 л , 900 мл води водопровідної. Солі розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування. Після розчинення солей , вміст колби переносять в асептичних умовах у інокулятор об'ємом 5 л ІН-14 та доливають 1190 мл води водопровідної. Інокулятор закривають кришкою, а до сорочки подають гостру пару. Встановлюється режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв з тиском 0,15 МПа.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 612 г глюкози та пересипають наважку до колби об'ємом 2 л. Після цього, за допомогою мірного циліндру на 1 л до цукру доливають 900 мл води водопровідної. Глюкозу розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування. Колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 112 °С протягом 20 хв з тиском 0,05 МПа.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 153 г пептону та 355,87 г дріжджового екстракту. Після цього, сухі компоненти пересипають в колбу об'ємом 5 л. До колби доливають 2000 мл води водопровідної за допомогою мірного циліндру об'ємом 2 л. Компоненти

розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування. Колбу закривають ватно-марлевым корком та передають на стерилізацію при 120 °С протягом 20 хв з тиском 0,075 МПа.

ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах Д-15 зважують по 153 г хлориду натрію та гідроортофосфату натрію. Солі пересипають в реактор Р-16 об'ємом 10 л, доливаючи об'ємно-ваговим дозатором 8,7 л води водопровідної. Солі розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування за допомогою мішалки апарату, після розчинення солей вміст реактора самоплином подають в інокулятор об'ємом 50 л ІН-18 та доливають 15 л води водопровідної. Інокулятор закривають кришкою, а до сорочки подають гостру пару. Встановлюється режим стерилізації 131 °С протягом 40 хв з тиском 0,15 МПа.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 500 л

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі Д-19 зважують 6,06 кг глюкози та подають до реактора Р-20 об'ємом 20 л. Після цього, за допомогою лічильника до глюкози доливають 7,5 л водопровідної води. Субстанції розмішують до повного розчинення глюкози за допомогою перемішування мішалки, якою обладнаний реактор. Апарат закривають кришкою, а до його сорочки подають глуху пару. Встановлюється режим стерилізації 112 °С протягом 20 хв з тиском 0,05 МПа.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі Д-22 зважують 1,5 кг пептону та 3,52 кг дріжджового екстракту. Після цього, сухі компоненти пересипають в реактор Р-23 на 20 л, доливаючи 8,5 л води водопровідної за допомогою об'ємно-вагового дозатора. Сухі компоненти розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування із застосуванням мішалки, якою оснащений апарат. Реактор закривають кришкою та подають глуху пару для стерилізації в умовах при 120°С протягом 20 хв з тиском 0,075 МПа.

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

На ваговому дозаторі Д-25 зважують по 1,5 кг хлориду натрію та гідроортофосфату натрію. Солі пересипають в реактор Р-26 об'ємом 10 л, доливаючи 6 л води водопровідної за допомогою об'ємно-вагового дозатора. Солі розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування із застосуванням мішалки, якою оснащений апарат, після розчинення солей вміст реактора самоплином направляють в інокулятор ІН-28 об'ємом 500 л, та через лічильник додають 236 л води водопровідної. Інокулятор закривають кришкою та подають глуху пару для стерилізації в умовах при 131°C протягом 40 хв з тиском 0,15 МПа.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері на 5 м³

ДР 4.5.1. Приготування та стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі Д-29 зважують 60 кг глюкози та подають до реактора Р-30 об'ємом 200 л. Після цього, за допомогою лічильника до глюкози доливають 75 л водопровідної води. Субстанції розмішують до повного розчинення глюкози за допомогою перемішування мішалки, якою обладнаний реактор. Апарат закривають кришкою, а до його сорочки подають глуху пару. Встановлюється режим стерилізації 112 °С протягом 20 хв з тиском 0,05 МПа.

ДР 4.5.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі Д-32 зважують 15 кг пептону та 34,9 кг дріжджового екстракту. Після цього, сухі компоненти пересипають в реактор Р-33 на 200 л, доливаючи 85,1 л води водопровідної за допомогою об'ємно-вагового дозатора. Сухі компоненти розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування із застосуванням мішалки, якою оснащений апарат. Реактор закривають кришкою та подають глуху пару для стерилізації в умовах при 120°C протягом 20 хв з тиском 0,075 МПа.

ДР 4.5.3. Приготування та стерилізація композиції В

На ваговому дозаторі Д-35 зважують по 15 кг хлориду натрію та гідроортофосфату натрію. Солі пересипають у реактор Р-36 об'ємом 200 л та доливають 150 л води водопровідної за допомогою лічильника. Солі розчиняють у воді шляхом інтенсивного перемішування із застосуванням мішалки, якою оснащений апарат, після розчинення

солей вміст реактора за допомогою насосу Н-37 перекачують в виробничий ферментер ФР-39, та через лічильник додають 2 250 л водопровідної води. Ферментер закривають кришкою та подають глуху пару для стерилізації в умовах при 131 °С протягом 40 хв з тиском 0,15 МПа.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру *Verticillium lecanii* IMI 332287 зберігають на скошеному агарі екстракту солоду при 4 °С. Пересів роблять кожні 1-3 місяці. Всі роботи з культурою виконують в асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається в пробірках з агаром екстракту солоду, розсівають петлею на чашки Петрі із поживним агаром і вирощують при температурі 24 °С упродовж 96 год.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу в пробірках

Отримані ізольовані колонії (від ТП 5.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним агаром екстракту солоду (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). Тривалість вирощування – 96 год. Засіяні пробірки ставлять у термостат з температурою 24 °С. Контроль за чистотою культури здійснюють мікроскопіюванням.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Вміст колби (від ДР 4.1.4.) перемішують і розливають по 150 мл в 2 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *V. lecanii* IMI 332287, вирощеною на середовищі МЕА (агар з екстрактом солоду, що містить 17 г/л солодового екстракту, 3 г/л пептону та 20 г/л агару), вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), стерильною піпеткою відбирають одержану грибну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують грибну суспензію, одержану з однієї пробірки.

Культивування *V. lecanii* IMI 332287 здійснюється у колбах на качалках. Умови культивування наступні: температура – 24 °С, частота обертання – 120 об/хв, час

вирощування – 168 год. Культура вирощується аеробно на качалках. Після вирощування культуральну рідину з колб переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 5 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора ІН-14 на 5 л, що містить близько 2 л композиції В (від ДР 4.2.3) в асептичних умовах вносять 150 мл композиції А (від ДР 4.2.1) та 0,5 л композиції Б (від ДР 4.2.2). В сорочку інокулятора подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 24 °С.

Посівний матеріал (від ТП 5.4) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 24 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 168 год. Через барботер подається стерильне повітря, яке проходить крізь фільтр Ф-13 від ДР 2.7, а також відводяться відпрацьовані гази. Значення рН 6,5 регулюють титрувальними розчинами від ДР 3.1 та ДР 3.2.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора ІН-18 на 50 л в якому знаходиться близько 26 л композиції В (від ДР 4.3.3) в асептичних умовах вносять 1,5 л композиції А (від ДР 4.3.1) та 2,5 л композиції Б (від ДР 4.3.2). В сорочку подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 24 °С.

Посівний матеріал (від ТП 5.5) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 24 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 168 год. Через барботер подається стерильне повітря, яке проходить крізь фільтр Ф-17 від ДР 2.7, а також відводяться відпрацьовані гази. Значення рН 6,5 регулюють титрувальними розчинами від ДР 3.1 та ДР 3.2.

ТП 5.7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 500 л

До простерилізованого охолодженого інокулятора ІН-28 на 500 л в якому міститься стерильна композиція В (від ДР 4.4.3) об'ємом 270 л в асептичних умовах за допомогою насосу Н-21 подають 15 л композиції А (від ДР 4.4.1) та насосом Н-24 - 15 л композиції Б (від ДР 4.4.2). В сорочку посівного апарату подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 24 °С.

Посівний матеріал (від ТП 5.6) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах за допомогою труби перетискування. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 24 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 168 год. Через барботер подається стерильне повітря, яке проходить крізь фільтр Ф-27 від ДР 2.7, а також відводяться відпрацьовані гази. Значення рН 6,5 регулюють титрувальними розчинами від ДР 3.1 та ДР 3.2.

ТП 6. Біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез

До простерилізованого охолодженого ферментеру ФР-39 на 5000 л, в якому міститься стерильна композиція В (від ДР 4.5.3) об'ємом 2700 л в асептичних умовах за допомогою насосу Н-31 подають 150 л композиції А (від ДР 4.5.1) та насосом Н-34 - 150 л композиції Б (від ДР 4.5.2). В сорочку

ферментеру подають холодну воду та глуху пару і контролюють значення температури поживного середовища на рівні 24 °С.

Посівний матеріал (від ТП 5.7) переносять в інокулятор в строго асептичних умовах. Процес культивування проводиться за наступних умов: температура – 24 °С, швидкість перемішування – 120 об/хв, час вирощування – 168 год. Через барботер подається стерильне повітря, яке проходить крізь фільтр Ф-38 від ДР 2.7, а також відводяться відпрацьовані гази. Значення рН 6,5 регулюють титрувальними розчинами від ДР 3.1 та ДР 3.2.

Культивування ведуть до досягнення концентрації біомаси *V. lecanii* ІМІ 332287 в 18,88±0,86 г/л. Отриману культуральну рідину передають далі насосом Н-40 на отримання цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1 Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю синтезу біомаси *Verticillium lecanii* IMI 332287

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 2.1 Забір повітря	Висота забору повітря	Висота труби забору	Протягом всього циклу виробництва	H= 3 м
Кт 2.2 Груба очистка повітря	Очищене повітря, ступінь очищення повітря на виході з фільтра, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі грубого очищення	E=80%, тиск згідно паспорту
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, тиск	Манометр технічний	Повітря після компресування	P=0,4 МПа
Кт 2.4 Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості	Охолоджене повітря, температура, вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря і видалення вологи	t=19°C, W=60%

					НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ		
Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Рибнікова О.В				Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Воронцов О.О.					71	100
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

**Розділ 8. Контроль
виробництва**

Кт 2.5 Нагрівання повітря	Підігріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагріву повітря	$t=30^{\circ}\text{C}$
Кт 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, перепади тисків, ступінь очищення повітря на виході з фільтра	Манометр, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки у фільтрі головного очищення	$E=95\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення повітря	Перевірка ступеню очищення повітря згідно паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальних фільтрах	$E=99,99998\%$
Кх , Км , Кт 3.1 Приготування 6% розчину HCl	Концентрація HCl температура, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Після приготування розчину	$C=6\%$, $P=0,15$ МПа, $t=131^{\circ}\text{C}$, $\tau=40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 3.2 Приготування та стерилізація 6% розчину NaOH	Концентрація NaOH, температура, тиск, час, стерильність	Хімічний метод, манометр технічний, термометр, таймер, мікробіологічний контроль	Концентрацію визначають після приготування розчину. Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$C=6\%$, $P=0,15$ МПа, $t=131^{\circ}\text{C}$, $\tau=40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А для вирощування інокуляту в	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=112^{\circ}\text{C}$, $P=0,05$ МПа, $\tau=20$ хв, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

колбах на качалках				
Кт 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=120^{\circ}\text{C}$, $P=0,075\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В для вирощування інокуляту в колбах на качалках	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=131^{\circ}\text{C}$, $P=0,15\text{ МПа}$, $\tau=40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А для інокулятора 5 л	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=112^{\circ}\text{C}$, $P=0,05\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 5 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=120^{\circ}\text{C}$, $P=0,075\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В для інокулятора 5 л	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=131^{\circ}\text{C}$, $P=0,15\text{ МПа}$, $\tau=40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А для	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний	$t=112^{\circ}\text{C}$, $P=0,05\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

інокулятора 50 л		контроль	метод контролю	
Кт, Км 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 50 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=120^{\circ}\text{C}$, $P=0,075\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.3.3 Приготування та стерилізація композиції В для інокулятора 50 л	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=131^{\circ}\text{C}$, $P=0,15\text{ МПа}$, $\tau=40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.1 Приготування та стерилізація композиції А для інокулятора 500 л	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=112^{\circ}\text{C}$, $P=0,05\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.2 Приготування та стерилізація композиції Б для інокулятора 500 л	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=120^{\circ}\text{C}$, $P=0,075\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.4.3 Приготування та стерилізація композиції В для інокулятора 500 л	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=131^{\circ}\text{C}$, $P=0,15\text{ МПа}$, $\tau=40\text{ хв}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.1 Приготування та стерилізація композиції А для ферментера 5 м^3	Композиція А, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	$t=112^{\circ}\text{C}$, $P=0,05\text{ МПа}$, $\tau=20\text{ хв}$, відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 4.5.2 Приготування та стерилізація композиції Б для ферментера 5 м ³	Композиція Б, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=120°C, P=0,075 МПа, τ=20 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.3 Приготування та стерилізація композиції В для ферментера 5 м ³	Композиція В, температура, тиск, час, стерильність	Термометр, таймер, манометр технічний мікробіологічний контроль	Температура та тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний метод контролю	t=131°C, P=0,15 МПа, τ=40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, мікробіологічна чистота культури	Холодильник	Мікробіологічний контроль	t=4°C, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Пересіяна культура, чашки Петрі з агаром екстракту солоду, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=24°C, τ=48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 Вирощування посівного матеріалу в пробірках	Пересіяна культура, пробірки з МПА, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури	Термостат, мікроскоп, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після вирощування культури	t=24°C, τ=48 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Продовження таблиці 8.1

Кт, Км 5.4 Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, тахометр, мікробіологічний контроль	Після вирощування інокуляту в колбах на качалках	$t=24^{\circ}\text{C}$, $\tau=168$ год, $\omega=120$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.5 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 5 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	$t=24^{\circ}\text{C}$, $\tau=168$ год, $\omega=120$ об/хв, рН=6,5, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.6 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 50 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	$t=24^{\circ}\text{C}$, $\tau=168$ год, $\omega=120$ об/хв, рН=6,5, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 5.7 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі на 500 л	Посівний матеріал, тривалість культивування, температура, рН, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, таймер, рН-датчик, тахометр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування інокуляту і в кінці культивування	$t=24^{\circ}\text{C}$, $\tau=168$ год, $\omega=120$ об/хв, рН=6,5, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 6.1 Виробничий біосинтез	Культуральна рідина, температура, рН, тривалість культивування,	Термометр технічний, годинник, рН-датчик, тахометр,	Мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин, концентрація	$t=24^{\circ}\text{C}$, $\tau=168$ год, $\omega=120$ об/хв, рН=6,5, $C_6=18,88\pm 0,86$ г/л, відсутність

	концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	сушильна шафа, ваги, мікробіологічний контроль	біомаси визначається після закінчення процесу культивування	сторонньої мікробіоти
--	---	--	---	-----------------------

8.2. Мікробіологічний контроль

Культивування грибу *V. lecanii* IMI 332287 з метою одержання біомаси проводиться в асептичних умовах. Мікробіологічний контроль використовується для моніторингу стерильності поживного середовища для засіву та культурального середовища для біосинтезу цільового продукту, а також для виявлення сторонніх мікроорганізмів у культуральному середовищі. Цей контроль здійснюється шляхом нанесення зразка живильного середовища, готового посівного матеріалу або живильного середовища на чашку Петрі з відповідним агаризованим живильним середовищем з подальшим мікроскопічним спостереженням за колоніями, що ростуть на середовищі після інкубації.

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Пряме мікроскопіювання. Для контролю стерильності беруть пробу та готують препарат у вигляді розчавленої краплі. Спочатку стерилізують скельця та фламбують петлю, після чого на скельце наносять воду разом із досліджуваною культурою. Використовуючи світловий мікроскоп, ретельно перевіряють препарат на наявність сторонніх мікроорганізмів. Якщо протягом спостереження в 10 полях зору не виявлено жодних сторонніх мікроорганізмів, поживне середовище вважається чистим і придатним для подальшого використання. Цей метод дозволяє забезпечити високий рівень стерильності та мінімізувати ризик контамінації.

Прямий посів на агаризоване середовище.

Відбирають 50 мл стерильного середовища для виконання декілька посівів на агаризовані середовища. Такий посів виконується для виявлення бактерій та грибів, якщо при цьому росту контамінантів не відбувається – середовище вважається стерильним.

Виконання посівів. Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єму проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА (сусло-агар) – для виявлення грибів і дріжджів і МПА (м'ясо-пептонний агар) – для виявлення бактерій. Зразок розподіляють рівномірно на поверхню агару за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського, який попередньо занурюється в спирт. Засіяні чашки завертають і поміщають у термостат за температури 30-34 °С. Аналіз посівів здійснюють, починаючи з 6...8 години. При успішному аналізі, на поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [85].

Мікробіологічний контроль чистоти культури

Мікробіологічний контроль посівного матеріалу і культуральної рідини можна здійснювати прямим висівом на агаризовані поживні середовища і/або мікроскопіюванням (пряме, або після висіву на чашки).

Прямий висів на агаризоване середовище. Контроль здійснюють шляхом розсівання проби готового посівного матеріалу і культуральної рідини на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем до ізольованих колоній (метод виснажувального штриха) і подальшим мікроскопуванням мікроорганізмів з окремих колоній, які вирости на середовищі після інкубування *V. lecanii* IMI 332287. Для ідентифікації цього гриба використовують агар SMY (склад (г/л): пептон – 10, мальтоза – 40, дріжджовий екстракт – 10, агар – 20). Культуру висівають на агар та ставлять в термостат при 28±1°C та чекають 7-10 днів [86]. Також, додатково можна використати агаризовані середовища PDA (картопляно-декстрозний агар), SDAY (агар Сабуро з декстрозою та дріжджовим екстрактом), СМА (агар з морквяного борошна), МЕА (агар солодовий екстракту) [87]. Приклад його росту зображено на рис.8.1.



Рис.8.1. Колонії *V. lecanii* на SMY агарі [86].

Колонії *V. lecanii* на агаризованому середовищі SMY стають білими або блідо-жовтими, ватними або бархатистими, набувають кремового кольору з борошнистим виглядом і поступово переходять у багряно-рожеву пігментацію.

Мікроскопіювання проводять світловим мікроскопом з імерсійною системою. Методика мікроскопіювання [88]:

З культури гриба, вирощеного на щільному середовищі сусло-агар, готують препарат «роздавлена крапля». У центр предметного скла наносять краплю суміші спирту із гліцерином (1:1). За допомогою бактеріологічної петлі, розігнутої у вигляді гачка, відбирають невелику кількість міцелію (міцелій варто брати в зоні, прикордонній із зоною плодоносіння, - границя між фарбованою й безбарвною частинами). Міцелій поміщають на предметне скло в краплю рідини; за допомогою двох препарувальних голок обережно розосереджують матеріал тонким шаром у краплі й накривають покривним склом. Пухирці повітря під покривним склом заважають мікроскопії. Щоб уникнути їхнього утворення варто опускати покривне скло повільно, попередньо поставивши його ребром біля краю краплі. При мікроскопії (об'єктив 40x) слід відмітити будову міцелію (одноклітинні або багатоклітинні гіфи) та органів розмноження — спорангіїв або конідій [88].

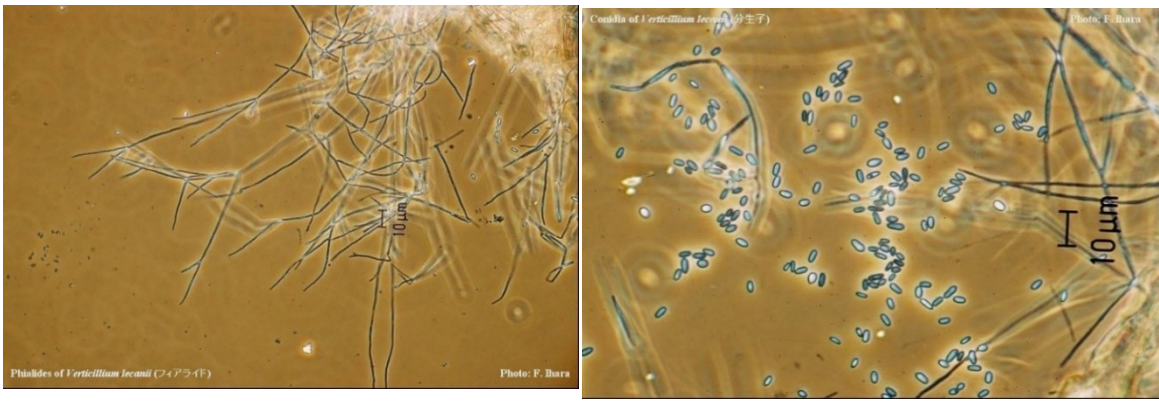


Рис.8.2. Конідії та фіаліди, які утворює *V. Lecanii*
(збільшення в 400 та 40 разів) [89]

Мицелій складається з септованих розгалужених гіф, гіалінових або світлого кольору, конідиєносців прямостоячих, септованих, простих або розгалужених. Фіаліди утворюються поодинокі або в мутовках по 3-4 штуки [86].

8.3 Визначення концентрації джерела азоту та вуглецю

Основним джерелом карбону виступає глюкоза, а основним джерелом амінного азоту – пептон та дріжджовий екстракт. Але для початку, для аналізу необхідно відділити супернатант, саме в ньому аналізується вміст зазначених речовин. Центрифугування біомаси від супернатанту відбувається при 3000 об/хв протягом 10 хв [3].

8.3.1. Визначення концентрації джерела вуглецю

Глюкозооксидазний метод є специфічним і широко застосовується в клініко-діагностичних лабораторіях, оскільки дозволяє визначити істинний вміст глюкози в присутності різних вуглеводів та інших редуруючих речовин неуглеводної природи. Метод базується на специфічності дії ферменту глюкозооксидази, що окиснює глюкозу до глюконової кислоти. Глюкозооксидаза – це флавопротеїн, простетичною групою якого є ФАД. Перенос двох атомів гідрогену на ФАД призводить до його відновлення, а потім ФАДН₂ передає їх на молекулярний кисень з утворенням гідроген пероксиду. Утворений гідроген пероксид в присутності ферменту пероксидази окиснює о-толідін. Відновлений о-толідін безбарвний, а окиснений – блакитно-синього кольору. Інтенсивність утвореного забарвлення прямо пропорційна концентрації глюкози і визначається на ФЕК [90].

До 1 мл надосадної рідини додати 3 мл ензимо-хромогенного реактиву (у мірну колбу на 100 мл помістити 80-90 мл ацетатного буфера [0,25 моль/л, рН=4,8], в якому розчинити 2 мг глюкозооксидази, а потім 1 мг пероксидази; додати 1 мл 1% розчину о-толідину в абсолютному спирті і довести об'єм розчину ацетатним буфером до мітки), перемішати і точно через 20 хвилин виміряти оптичну густину розчину в кюветі з товщиною шару 10 мм при довжині хвилі 625 нм проти контрольної проби, в яку замість надосадової рідини додати воду. Час з моменту додавання ензимо-хромогенного реактиву до вимірювання оптичної густини має бути однаковим для всіх проб. Паралельно провести визначення оптичної густини розчину стандартного зразка глюкози з концентрацією 27,8 ммоль/л, розведеної в 5 раз. Вміст глюкози у пробі розрахувати за формулою [90]:

$$\text{вміст глюкози} = D_{\text{досл}} \cdot C / D_{\text{ст}},$$

де $D_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{ст}}$, – оптична густина розчину стандартного зразка глюкози; C – концентрація глюкози в розчині стандартного зразка [90].

8.3.2. Визначення концентрації джерела азоту

Метод Сьоренса ґрунтується на здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот. Аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу [91].

До 1 мл випробуваного зразка додають воду до об'єму 20 мл. При необхідності розчин нейтралізують потенціометрично до рН 7,0 шляхом додавання натрію гідроксиду розчину 0,1 М або хлористоводневої кислоти розчину 0,1 М. Після закінчення нейтралізації додають 10 мл розчину формальдегіду, нейтралізованого у день аналізу 10 % -ним розчином натрію гідроксиду до рН 7,0, перемішують і титрують розчином натрію гідроксиду 0,1 М до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо-рожевого фарбування (індикатор – фенолфталеїну розчин 1%). Паралельно проводять контрольний досвід з 0,25% розчином амінокислот [91].

1 мл гідроксиду натрію розчину 0,1 М відповідає 1,4 мг амінного азоту [91].

8.4 Визначення показників біосинтезу

8.4.1. Визначення концентрації біомаси

Визначення біомаси виконують гравіметричним методом, який базується на висушуванні зразка при 105 °С до абсолютно сухої біомаси [92].

У дві центрифужні пробірки відібрати по 5 мл культуральної рідини та центрифугувати за 10000 об/хв впродовж 5 хв [93]. Після центрифугування фугат злити в окремі пробірки, а до осаду додати 5 мл дистильованої води (в кожному пробірці) та знову центрифугувати (10000 об/хв впродовж 5 хв). Операцію повторити двічі. Після відмивання біомасу (осад) кількісно перенести у попередньо висушений і зважений бюкс. Далі бюкси висушити до постійної маси у сушильній шафі за 105 °С. Висушені бюкси помістити в ексікатор, охолодити до кімнатної температури та зважити на аналітичних вагах [94].

Різниця у значеннях бюксу з біомасою бактеріальних клітин двох послідовних зважувань – не більше, ніж декілька одиниць у четвертому знаку після коми. На основі отриманих даних розрахувати загальну кількість біомаси, що виросла в колбі та в перерахунку на 1 мл культуральної рідини [94]:

$$X = \frac{(A - B)1000}{V},$$

де X – кількість сухої біомаси в г/л; A – маса біксу з осадом в г; B – маса біксу без осаду в г; V – об'єм культуральної рідини, узятий для центрифугування в мл [94].

8.4.2 Визначення концентрації умовних одиниць

Метод камери Горяєва використовується для кількісного визначення КУО (концентрації умовних одиниць) культуральної рідини при культивуванні *V. lecanii*. Рахункова камера Горяєва складається з прозорого скла, на якому є розміщені поперечні прорізи, утворюючи три рівні майданчики. Середній майданчик поділений поздовжнім прорізом на дві частини, кожна з яких має вгравіровану сітку з квадратами однакової площі. Майданчики з обох боків вищі за середній майданчик на 0,1 мм для протирання скла до утворення Ньютонівських кілець. Після притирання покривного

скла створюється камера з капілярними просторами на двох сторонах, через які заповнюють суспензію мікроорганізмів за допомогою пастерівської піпетки. Підрахунок клітин проводять під мікроскопом так, щоб були видні сітка на камері та розподілені рівномірно клітини мікроорганізмів. Кількість клітин у 5 горизонтальних і 15 діагональних великих квадратах використовують для визначення числа клітин (x) в 1 мл досліджуваної суспензії за встановленою формулою.

$$x = \frac{a}{20} \cdot N \cdot k \cdot b = \frac{a \cdot 225 \cdot 1111}{20} \cdot b = a \cdot 12499 \cdot b,$$

де: a – число клітин в 20 квадратах;

N = 225 – число великих квадратів в камері Горяєва;

$k = \frac{1}{v} = \frac{1}{0.0009} = 1111$ – коефіцієнт, що дорівнює величині, зворотнім обсягом камери Горяєва ($v = 0,9 \text{ мм}^3 = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ мл}$);

b – розведення вихідної суспензії мікроорганізму.

Підрахунок клітин виробляти з об'єктивом $8 \times (10 \times)$, рідше $40 \times$ [95].

8.5. Оцінка біологічної дії

Verticillium lecanii є самостійним агентом у боротьбі з комахами (особливо попелицею та білокрилкою). Мікроорганізм містить ендотоксин бассіанолід [13], саме який і специфічно зв'язується з комахою, загалом, смерть комах проходить через саме проростання гіфів та виділення бассіаноліду, але дослідження та інформації про нього замало, тому потрібно розглянути саме *Verticillium lecanii*, як самостійний агент [5].

Для визначення біологічної активності продукту застосовують перевірку цього ж продукту на комах. Тестування проводять із застосуванням різних концентрацій препарату задля перевірки яка доза є більше або менше летальною.

При використанні *Verticillium lecanii* у концентрації 10^8 спор на мл^{-1} , проти попелиці видів *Brachycaudus sp.*, *Macrosiphoniella sanborni* та *Myzus persicae* на огірках у теплиці та *Macrosiphum avenae* на пшениці в модифікованих польових умовах

(штучно підвищена відносна вологість) показали, що грибок був дуже ефективним і мав високі показники летальності. Контроль *M. persicae* і *M. avenae* був швидким і досяг 100% через 25 днів, тоді як *M. sanborni* і *Brachycaudus sp.* був повільнішим і знадобилося 30 і 35 днів відповідно, щоб досягти 100%[96].

При досліджах на павутинних кліщах роду *Oligonychus* препарат показав високу летальність у 83% через 7 днів після застосування[97].

Для дослідження впливу *Verticillium lecanii* на дорослих білокрилках(*B.tabaci*) використовують *V. lecanii* вирощений на картопляно-декстрозному агарі протягом 20 днів при 25°C. Методом розпилення конідиального концентрату та грибкового фільтрату. При аналізі фільтрату використовували по 2 мл грибкового фільтрату. У аналізі концентрату використовувалися 3 різні концентрації конідій (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 конідій на мл^{-1}) які визначали за допомогою гемоцитометра. Дорослі білокрилки поміщали у чашку Петрі для обробки зі свіжим бавовняним листям і інкубували при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ при 65% вологості повітря. Рівень смертності білокрилок фіксували на 7 день.

При використанні конідиального концентрату максимальні показники смертності були виявлені при найвищій концентрації конідій 1×10^7 конідій на мл^{-1} 90,6% , при концентрації конідій 1×10^6 - 85% , а при 1×10^5 - 70%.

При використанні фільтрату виявив максимальну смертність 93%[98].

РОЗДІЛ 9. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

9.1 Аналіз технологічної схеми проектованого біотехнологічного виробництва.

Згідно схеми біотехнологічного виробництва маємо місце емісії відходів:

Рідких – промивна вода та залишки миючих засобів після миття обладнання, випарена волога після вакуум-випарки, залишки рідкого продукту після фасування.

Твердих – коробки, макулатура та інші паперові відходи

Газоподібних – повітря після культивування

9.2 Способи знезараження води

Рідкі відходи які контактували з клітинами та продуктом проходять дезінтеграцію за допомогою ультразвукового дезінтегратора. Після проходження через ультразвуковий дезінтегратор, відходи можуть бути піддані подальшій фільтрації або біологічній очистці, які часто вважаються одними з найбільш економічно ефективних методів очищення широкого спектру стічних вод. Фільтрація є відносно простим і недорогим методом, який може бути ефективним для видалення різноманітних зважених речовин і мікроорганізмів зі стічних вод. Існує декілька типів фільтрів, які можна використовувати: піщані фільтри, картриджні фільтри, мембранні фільтри.

Підприємство знаходиться на території міста, тому воду будемо відправляти у міську каналізацію.

9.3 Способи знезараження повітря

Газоподібні відходи біотехнологічних виробництв утворюються на етапі отримання посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у вигляді відпрацьованого повітря, що містить аерозоль клітин продуцента. Об'єми відпрацьованого повітря приблизно дорівнюють об'ємам аераційного повітря.

НУХТ БТЕК 04.03.48 КР ПЗ

Зми.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Рибнікова О.В			Розділ 9.Охорона довкілля.	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Воронцов О.О.					86	100
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Тривалість процесу отримання посівного матеріалу складає 96 год, а виробничого біосинтезу – 168 год, а для аерації середовища використовують стерильне повітря зі об'єм аераційного повітря що використовується – 1 л/лПС·хв і у виробничому приміщенні встановлено 3 інокулятори на 5 л , 50 л , 500 л і ферментер на 5000 л коефіцієнт заповнення усіх апаратів дорівнює 0,6 , приблизний об'єм відпрацьованого повітря за 1 цикл ферментації буде становити:

$$(5+50+500) * 0,6 * 96 * 60 + (5000 * 0,6 * 168 * 60) = 32158,08 \text{ м}^3$$

Для утилізації газоподібних відходів ми використовуємо піч в котельній підприємства, де можемо спалити повітря, що містить клітини бактерії. Щоб уникнути забруднення екології викидами газів, ми можемо використати біоабсорбер.

9.4.Способи знезараження твердих відходів

Тверді відходи можна розділити на ті що можна утилізувати і ті що не підлягають утилізації. Ті що неможливо утилізувати по мірі їх накопичення вивозом їх на міське звалище. А ті що підлягають утилізації можна відправляти спеціальним підприємствам які займаються переробкою відходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Васильчук Д. С. Сучасні засоби боротьби зі шкідниками. *Студентський вісник НУВГП*. 2016, (1(6)): 101-103.
2. Крутякова В. І., Пиляк Н. В., Нікіпелова О. М. Мікробні біоінсектициди–захист сільськогосподарських культур. Матеріали доповідей Міжнародної наукової конференції "50 років досліджень Інженерно-технологічного інституту "Біотехніка": досягнення та перспективи" присвяченої 50-річчю ІТІ "Біотехніка" (Одеса, 4-8 жовтня 2021 р.). С. 255.
3. Hanlon G. W., Kooloobandi A., Hutt A. J. Microbial metabolism of 2- arylpropionic acids: effect of environment on the metabolism of ibuprofen by *Verticillium lecanii*. *Journal of applied bacteriology*. 1994, 76(5): 442-447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01100.x>
4. Goettel M. S., Eilenberg J., Glare T. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, editors. *Comprehensive molecular insect science*. 2005. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00088-0>
5. Bassianolide. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bassianolide>
6. Butt T. M., Coates C. J., Dubovskiy I. M., Ratcliffe N. A. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *Advances in genetics*. 2016, 94: 307-364. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00015-4>
7. Hadi M. S., Taufiqurrahman A. F., Choliq F. A., Istiqomah I., Karindah S. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Lecanicillium lecanii* Against Predator Insect *Menochilus Sexmaculatus*. *PLANTA TROPICA: Jurnal Agrosains (Journal of Agro Science)*. 2020, 8(2): 63-68. <https://doi.org/10.18196/pt.2020.115.63-68>
8. An aphid killed by an entomopathogenic fungus (*Verticillium lecanii*), which is used a method for biological control in protected crops. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.alamy.com/an-aphid-killed-by-an-entomopathogenic-fungus-verticillium-lecanii-which-is-used-a-method-for-biological-control-in-protected-crops-image329778864.html?imageid=9F6A8108-5D04-4B84-B98C->

[55E2B2C1A76D&p=1521&pn=1&searchId=6a1a21d0a011d3b7d3a20019e6775b9e&searchtype=0](https://www.researchgate.net/publication/355E2B2C1A76D&p=1521&pn=1&searchId=6a1a21d0a011d3b7d3a20019e6775b9e&searchtype=0)

9. Effective Control Of Waxy Skin Insects & Sucking Pests. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.iplbiologicals.com/verticillium-lecanii/>

10. Вертицилін М БІО ЦЕНТР (біологічний інсектицид). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://centrbio.com.ua/ua/p638092230-vertitsilin-bio-tsentr.html>

11. Вертицилін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cherkasybiozakhyt.com/vertitsilin/p93>

12. Біоінсектицид Вертицилін, 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://agrovita.org.ua/03972/>

13. *VERTICILLIUM LECANII* Biopesticide (1Kg) ForWhiteFlyPest. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bazodo.com/bio-pesticides/503-verticillium-lecanii-biopesticide-1kg-for-white-fly-pest.html>

14. Utkarsh VERTICOZ-P (*Verticillium lecanii* 1 x 10⁸ CFU/gm min.) (Western Flower Thrips) Bio Pesticides. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://utkarshagro.com/product/utkarsh-verticoz-p-verticillium-lecanii-1-x-10-8-cfu-gm-min-western-flower-thrips-bio-pesticides/>

15. ACTIVE IPM *VERTICILLIUM LECANII* (Major - 1Kg) Bio-Pesticide, Insecticide, Plant Growth Promoter, Nutrition Enhancer, Immunity Builder to Improve Health in Garden Plants and Cultivation Crops. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.amazon.in/ACTIVE-IPM-VERTICILLIUM-LECANII-Major/dp/B08LMRRGZ4>

16. Вертицильоз. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://growex.ua/blog/vertitsillez>

17. Reddy S. G. E. *Lecanicillium* spp. for the Management of Aphids, Whiteflies, Thrips, Scales and Mealy Bugs. *Arthropods-Are They Beneficial for Mankind?* 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94020>

18. Meng Y., Wellabada Hewage Don P. D., Wang D. A New Strain of *Lecanicillium uredinophilum* isolated from Tibetan Plateau and its insecticidal activity. *Microorganisms*. 2022, 10(9): 1832. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091832>
19. Ritika J. N., Sangha K. S. Effect of adjuvants on *Lecanicillium lecanii* against nymphs of *Lipaphis erysimi* (Kalt). *Indian Journal of Entomology*. 2019, 81(3): 597-602. <https://doi.org/10.5958/0974-8172.2019.00125.1>
20. Reddy S. E., Sahotra S. Multiplication of entomopathogenic fungus (*Lecanicillium lecanii*) on apple pomace and its toxicity against aphid (*Aphis craccivora*). *Toxin Reviews*. 2020, 39(3): 252-257. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1504222>
21. Xie T., Jiang L., Li J., Hong B., Wang X., Jia Y. Effects of *Lecanicillium lecanii* strain JMC-01 on the physiology, biochemistry, and mortality of *Bemisia tabaci* Q-biotype nymphs. *PeerJ*. 2019, 7: e7690. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27760v1>
22. Singh G., Prakash S. Virulency of *Verticillium* sp. against mosquito vectors for malaria, filarial, and dengue. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2015, 5: S27-S30. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60850-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60850-7)
23. What is the composition of yeast extract? [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.researchgate.net/post/What_is_the_composition_of_yeast_extract#:~:text=I%20did%20just%20find%20a,contribute%200.81%20mg%20COD%20per
24. Zapata-Vélez A. M., Trujillo-Roldán M. A. The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Annals of microbiology*. 2010, 60(4): 661-668. <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-010-0111-7#citeas>
25. Tomé D. Yeast extracts: Nutritional and flavoring food ingredients. *ACS Food Science & Technology*. 2021, 1(4): 487-494. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00131>
26. Subramaniam Mariappan & Azariah Babu & Deka Bhabesh//*Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & Gams, as an efficient biocontrol agent of tea thrips, *Scirtothrips bispinosus* Bagnall (Thysanoptera: Thripidae)//*Egyptian Journal of Biological Pest Control*

2021[Режим доступу:]https://www.researchgate.net/publication/349469357_Lecanicillium_1ecanii_Zimmermann_Zare_Gams_as_an_efficient_biocontrol_agent_of_teathrips_Scirtothrips_bispinosus_Bagnall_Thysanoptera_Thripidae

27. Yong-Jie Zhang, Xue-Bin Yang & Shu Zhang//Complete mitogenome of the entomopathogenic fungus *Akanthomyces lecanii*//Mitochondrial DNA Part B2020[Режим доступу:]<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23802359.2020.1721349>

28. Jitendra Mehta, Neha Kaushal, та ін.// Impact of carbon & nitrogen sources on the *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae*- Entomopathogenic fungi//European Journal of Experimental Biology – 2012, ст. 3-6[Режим доступу:]<https://www.primescholars.com/articles/impact-of-carbon--nitrogen-sources-on-the-verticillium-lecanii-and-metarhizium-anisopliae-entomopathogenic-fungi.pdf>

29. Інтернет джерело: *Verticillium*. Characteristics, Life Cycle, Morphology and Cultures
[Режим доступу:]<https://www.microscopemaster.com/verticillium-fungus.html>

30. Інтернет джерело: *Akanthomyces lecanii* [Режим доступу:]<https://fungi.myspecies.info/all-fungi/akanthomyces-lecanii>

31. Зображення *Akanthomyces lecanii* [Режим доступу:]https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_images_detail_en.php?id=941

32. C. W. Jackson¹, J. B. Heale// Free Relationship between DNA Content and Spore Volume in Sixteen Isolates of *Verticillium lecanii* and Two New Diploids of *V. dahliae* (= *V. dahliae* var. *longisporum* Stark)//Microbiology [Режим доступу:]<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-131-12-3229>

33. Midori Sugimoto, Masanori Koike, та ін.//Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*//Journal of Invertebrate Pathology - 2003 [Режим доступу:]<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201103000144>

34. Зображення колоній *Verticillium lecanii* [Режим доступу:] <https://www.naro.affrc.go.jp/org/fruit/epfdb/Deutte/Vleca/colony/vleca5a.jpg>
35. Інтернет джерело: CECT 20413 FILAMENTOUS FUNGI [Режим доступу:] <https://www.cect.org/vstrn.php?lan=es&cect=20413>
36. J. Sumalatha, S. J. Rahman, та ін.// Evaluation of Type of Growth Media on Biological Attributes and Virulence of *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas against Mealy Bug//International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences – 2017. ст. 2 [Режим доступу:] <https://www.ijemas.com/6-7-2017/J.%20Sumalatha,%20et%20al.pdf>
37. Інтернет джерело: Середовище Сабуро (агар Сабуро) [Режим доступу:] <https://systopt.ub.ua/goods/view/522948/all/seredovishche-saburo-agar-saburo/>
38. Інтернет джерело: Онлайн база даних Mycobank. [Режим доступу:] <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>
39. Інтернет джерело: Онлайн база даних KEGG [Режим доступу:] <https://www.genome.jp/pathway/val00010+M00001>
40. Araújo, M. F., Castanheira, E. M. S., & Sousa, S. F. (2023). The Buzz on Insecticides: A Review of Uses, Molecular Structures, Targets, Adverse Effects, and Alternatives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(8), 3641. <https://doi.org/10.3390/molecules28083641>.
41. Тим, “Хімічний захист рослин з основами агротоксикології” для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за спеціальністю 202 «Захист і карантин рослин». Житомир: Поліський національний університет, 2021, 61 с.
42. Siegwart, M., Graillet, B., Blachere Lopez, C., Besse, S., Bardin, M., Nicot, P. C., & Lopez-Ferber, M. (2015). Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Frontiers in plant science*, 6, 381. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00381>.
43. Оцінка екобіологічної ефективності застосування біоінсектициду актофіт для захисту дерев кінського каштану від мінуючої молі *Cameraria ohridella* / К. Г. Гаркава, А.В. Дращнікова, Т. І. Гудко // Наукові доповіді НУБіП. – 2010. - № 2 (18). – С. 1-6.

44. Україна втрачає посівні площі – Мінагрополітики. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.unian.ua/economics/agro/ukrajina-vtrachaye-posivni-ploshchi-minagropolitiki-12144828.html>
45. Овочі в умовах війни: планове виробництво, посівні площі, залишки. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://kurkul.com/spetsproekty/1282-ovochi-v-umovah-viyni-planove-virobnitstvo-posivni-ploshchi-zalishki>
46. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua/>
47. Вертицилін. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://bio.ck.ua/index.php?route=product/product&product_id=65
48. Вертицилін БТ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biotekhnika.od.ua/uk/produksiia/mikrobiolohichni-preparaty/vertytysylin-bt>
49. OrganicDews Verticillium lecanii (1x10⁸ CFU/g) (1 Kg) for Plants - Against Sucking Insects Like Aphids, Thrips and Whiteflies 1 Kg. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.amazon.in/OrganicDews-Verticillum-lecanii-Insecticide-Plants/dp/B09N8QV1WQ>
50. Огірок - характеристики культури і вимоги до вирощування. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agrolife.ua/ua/blog/ogurets-technologie-viraschivaniya/>
51. Essential knowledge for fermentation industry - what is peptone ? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://en.angelyeast.com/blog/microbial-nutrition/essential-knowledge-for-fermentation-industry-what-is-peptone.html#:~:text=The%20total%20nitrogen%20of%20bacterial%20peptone%20generally%20exceeds%2014.5%25>
52. Патент RU2120756C1. Штамм гриба *Verticillium lecanii* для получения акарицидного и энтомопатогенного препарата / Андреева И. В., Штерншис М. В., Степанова Е. В., Репин В. Е. Опубл. 27.10.1998.
53. Hasan, S., Singh, R. I., & Singh, S. S. (2011). Development of transformation system of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.)(Deuteromycotina: Hyphomycetes) based

on nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. Indian journal of microbiology, 51, 390-395. <https://doi.org/10.1007%2Fs12088-011-0106-5>

54. Barranco-Florido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and microbial technology*, 30(7), 910-915.

55. Méndez-González, F., Loera-Corral, O., Saucedo-Castañeda, G., & Favela-Torres, E. (2018). Bioreactors for the production of biological control agents produced by solid-state fermentation. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 109-121). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00007-4>

56. Процеси і апарати біотехнологічного виробництва. Методичні рекомендації до виконання практичних робіт для здобувачів ступеня вищої освіти «Бакалавр» напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Пастушенко А. С., Храмов Н. С., Норинський О. І. – Миколаїв: МНАУ, 2016. – 49 с.

57. Загальна біотехнологія. Методичні рекомендації щодо розрахунків критеріїв ефективності біотехнологічних процесів для здобувачів вищої освіти «Бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання / Юлевич О. І. – Миколаїв: МНАУ, 2017. – 28 с.

58. Конспект лекцій з дисципліни «Загальна біотехнологія» для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія»/ Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю. – Дніпродзержинськ, ДДТУ, 2016. – 157 с.

59. PROFİ CHLOR.[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vladasept.com.ua/ua/p1063164288-profi-chlor.html>

60. Дезінфікуючий засіб PROFİ CHLOR 20124.[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://greenmedical.com.ua/dezinfikuyuchij-zasib-profi-chlor-20124>

61. "Делаксон" Дезінфікуючий засіб з миючими властивостями на основі оцтової і пероцтової кислоти.[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://lagos.in.ua/ua/p703721320-delakson-dezinfitsiruyuschee-sredstvo.html>

62. Дезінфікувальний засіб Гембар[Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spilna-meta.com.ua/ua/p257133961-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-gembar.html>
63. Випарювання. Способи випарювання. Конструкції випарних апаратів і їх експлуатація. Багатокорпусні випарні установки. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Processes-and-apparatus-of-chemical-productionLecture9.pdf>
64. Verticillium lecani(Zimm.): A potential entomopathogenic fungus. Vinod Upadhyay, Dinesh Rai, Meenakshi Rana, Prateeksha Mehra1 and A.K.Pandey [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.academia.edu/98667274/Verticillium_lecani_Zimm_A_potential_entomopathogenic_fungus
65. New Ventilation exhaust fan industrial energy saving AC axial flow fan T35-5.6A/0.75KW Axial flow fan of cylinder pipe [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/New-Ventilation-Exhaust-Fan-Industrial-Energy_1600877391975.html?s=p .
66. AIR FILTERS [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://selton.com.ua/en/products/filtry-vozdushnye/> .
67. Компресор повітряний ремінний SIGMA 200л 10 бар 380В 5.5кВт 865л/хв (7044761) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://baushop.com.ua/ua/p1621124788-kompressor-vozdushnyj-remennyj.html> .
68. Охолоджувач стисненого повітря МТА AF 037 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://novatek-ukraine.com.ua/ua/p801591546-ohladitel-szhatogo-vozduha.html> .
69. Повітрозбірник (ресивер) 200 к. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/ua/p65371102-vozduhosbornik-resiver-200.html> .
70. Нагрівач повітря Вентс НКВ 1000х500-2 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/ua/products/vents-nkv-1000x500-2> .
71. Coalescing Filter Elements [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/en/compressed-air/oil-water-coalescing-filters.html> .

72. Дозатор електричний для корозійних рідин (спирт, розчинники, фарби, агрохімія, бензин, олива моторна, косметика, харчові рідини) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://shopnow.net.ua/ua/p1992491591-dozator-elektricheskij-dlya.html?source=merchant_center&gclid=EAIAIQobChMI3sat9NnrggMVRZRoCR1PTQ5YEAQYCCABEgKG1fD_BwE .
73. 10L Chemical Lab Jacketed Glass Reactor Vessel with Digital Display for Laboratory Reaction [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://eshop.lab1st.com/products/10l-chemical-lab-jacketed-glass-reactor-vessel-with-digital-display-for-laboratory-reaction?gclid=EAIAIQobChMIwf_Y_trrggMVDIpoCR3LEATjEAQYCCABEgKSB_D_BwE&utm_campaign=sag_organic&utm_content=sag_organic&utm_medium=product_sync&utm_source=google&variant=45399470014759 .
74. Ваги лабораторні ТВЕ “Техноваги” [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://technowagy.com.ua/products/vagi-laboratorni-tve/> .
75. GH Series 350 bar Compressed Air Filters [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.parker.com/content/dam/Parker-com/Literature/Hiross-Zander-Division/PDF-Files/PIS/PISGHHP-00-EN.pdf> .
76. 5 L Bioreactor for Microbial Fermentations [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.froilabo.com/products/5l-microbial-bioreactors/> .
77. 50L Stainless Steel Bioreactor Mechanical Stirred Fermenter Two 6 Blade Rushton Impellers [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.fermentor-bioreactor.com/sale-11798800-50l-stainless-steel-bioreactor-mechanical-stirred-fermenter-two-6-blade-rushton-impellers.html>
78. Ваговий дозатор NPF-5000 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p1714842864-vesovoj-dozator-npf.html> .
79. Лабораторний реактор робочим об'ємом 20 л РС-20.00.000 ПС [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornij-reaktor-robochim-ob%E2%80%B2yemom-20-l-rc-20-00-000-ps/> .

80. Діафрагмовий насос 20 л/хв 12 в. 60 PSI. різьба 1/2"FNPT [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tech-farmingshop.com/diafragmoviy-nasos-20-l-khv-12-v.-60-psi.-rizba-1-2fnpt/> .
81. Ферментер 500 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/fermenter-500/> .
82. 200-ЛІТРОВА ВЕРТИКАЛЬНА ЄМНІСТЬ ДЛЯ ЗБЕРІГАННЯ З НЕРЖАВІЮЧОЇ СТАЛІ MCMILLAN, ДІАМЕТР 600 ММ Х ПРЯМА СТОРОНА 1000 ММ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://perryvidex.eu/product/200-ltr-600-mm-x-1000-mm-v-L1421-07> .
83. Поверхневий відцентровий багатоступінчастий насос LEO (750 Вт, напор 45 м, мах.100 л/хв, нержавіюча сталь) для поливу [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nasostorg.com.ua/ua/p1240386686-poverhnostnyj-tsentrobezhnyj-mnogostupenchatyj.html> .
84. Cell culture bioreactor,Airlift bioreactor,Anaerobic membrane bioreactor. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Cell-culture-bioreactor-Airlift-bioreactor-Anaerobic_62241341320.html
85. 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.
86. Hasan S., Ahmad A., Purwar A., Khan N., Kundan R., Gupta G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*. 2013, 9(5): 238. <http://dx.doi.org/10.6026/97320630009238>
87. Sumalatha J., Rahman S. J., Fatima T., Nagaswathi K. Evaluation of Type of Growth Media on Biological Attributes and Virulence of *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas against Mealy Bug. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2017, 6(7): 2222-2229. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.322>
88. Технічна мікробіологія. Методичні вказівки до лабораторних робіт студентів спеціальностей 7.091704 - технологія бродильних виробництв та

виноробства, 7.091706 - технологія зберігання та консервування плодів та овочів / Рацук М. Є., Кругленко В. П. – Херсон. - ХНТУ. – 2006. - с.

89. *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.naro.affrc.go.jp/org/fruit/epfdb/Deutte/Vleca/Vlecan.htm>

90. Встановлення якісного складу насичених вуглеводнів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sites.google.com/view/allhemi/>

91. Визначення Нітрогену амінних груп методом формольного титрування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stemua.science/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BA%D0%B8/2807-2/>

92. Rocha-Pino Z., Marín-Cervantes M. D. C., Martínez-Archundia M., Soriano-Blancas E., Revah S., Shirai K. Morphological changes, chitinolytic enzymes and hydrophobin-like proteins as responses of *Lecanicillium lecanii* during growth with hydrocarbon. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2013, 36, 531-539. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0808-z>

93. Meng Y., Wellabada Hewage Don P. D., Wang D. A New Strain of *Lecanicillium uredinophilum* isolated from *Tibetan Plateau* and its insecticidal activity. *Microorganisms*. 2022, 10(9): 1832. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091832>

94. Чебан Л.М. Загальна біотехнологія: навчально-методичний посібник. Модуль 1. – Чернівці: Чернівецький нац.ун-т, 2017. – 116 с.

95. Мікробіологія харчових продуктів. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051701 "Харчові технології та інженерія" ден. та заоч. форм навчання / Уклад.: С.М. Тетеріна, Н.М.Грегірчак. – К.: НУХТ, 2013. – 25 с.

96. Effectiveness of *Verticillium lecanii* to reduce populations of aphids under glasshouse and field conditionsb Author links open overlay panelS.K. Khalil , J. Bartos , Z. Landa. *Agriculture, Ecosystems & Environment/* [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(85\)90076-3](https://doi.org/10.1016/0167-8809(85)90076-3)

97. Chapter 15 - Microbial Control of Insect Pests of Tea and Coffee. M. Nakai , L.A. Lacey Microbial Control of Insect and Mite Pests .From Theory to Practice.2017, Pages 223-235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00015-9>

98. In vitro virulence of three *Lecanicillium lecanii* strains against the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae).Yusuf Ali Abdulle, Talha Nazir, Azhar Uddin Keerio, Habib Ali, Shah Zaman, Tauqir Anwar, Trinh Duy Nam & Dewen Qiu. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-020-00328-8>