

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

ДИПЛОМНИЙ БАКАЛАВРСЬКИЙ ПРОЄКТ

на тему: «Технологія отримання Ризобактерину»

Виконав: студент 4 курсу, групи ББТ-19
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Ольга ХАРИТОНОВА
Керівник: к.б.н., Ігор ГРЕЦЬКИЙ
Рецензент: к.б.н., Ольга ШИДЛОВСЬКА

Київ 2023

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 2023 року

**ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНИЙ БАКАЛАВРСЬКИЙ ПРОЄКТ СТУДЕНТУ**

Харитонові Ольги Костянтинівни

1. Тема роботи: **Технологія отримання Ризобактерину**
Науковий керівник роботи Грецький Ігор Олександрович, к.б.н.
затверджені наказом закладу вищої освіти
від «08» листопаду 2022 року № 224-уч.
2. Строк подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломний бакалаврський проєкт;
наукова література щодо технології отримання Ризобактерину;
технологічні схеми промислового отримання Ризобактерину;
матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.
4. Зміст дипломного бакалаврського проєкту (перелік питань, які потрібно розробити): вступ, техніко-економічне обґрунтування, технологічна схема виробництва, характеристика біологічного агента, контроль якості, висновки, список використаних джерел, додатки.
5. Дата видачі завдання _____

5. Консультанти розділів дипломного бакалаврського проєкту

Розділ	Ім'я, прізвище та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 2	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 3	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 4	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Розділ 5	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		
Висновки	Ігор Грецький, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра		

6. Дата видачі завдання _____.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломного бакалаврського проєкту	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1. Техніко-економічне обґрунтування		
3	Розділ 2 Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва		
4	Розділ 3 Характеристика біологічного агента		
5	Розділ 4 Опис технологічної схеми		
6	Розділ 5 Контроль якості		
7	Висновки		
8	Оформлення дипломного бакалаврського проєкту		
9	Подання дипломного бакалаврського проєкту на кафедру для рецензування		
10	Перевірка дипломного бакалаврського проєкту на наявність ознак плагіату		
11	Подання дипломного бакалаврського проєкту на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____ Ольга ХАРИТОНОВА

Науковий керівник _____ Ігор ГРЕЦЬКИЙ

Директор НМЦУПФ _____ Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Харитоновна О.К. Технологія отримання Ризобактерину.

Дипломний бакалаврський проєкт за спеціальністю 162 Біотехнологія та інженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2023 рік.

У даному дипломному проєкті обґрунтовано технологію отримання біомаси штаму *Bradyrhizobium japonicum* М-8 для виготовлення біологічного препарату «Ризобактерин», призначеного для обробки сої.

Охарактеризовано вибір штаму, його особливості культивування, переваги й результати симбіотичної взаємодії з соєю. Описано поживне середовище, умови його приготування й стерилізації, етапи підготовки посівного матеріалу й необхідне для цього обладнання. Виконано розрахунки об'ємів ферментера й посівних апаратів. Викладено умови проведення культивування, обчислено необхідну кількість виробничих циклів й культуральної рідини. Наведено технологічну схему виробництва «Ризобактерину» з описом стадій.

Після обґрунтування технології представлено методики контролю якості продукції.

Ключові слова: азотфіксувальна активність, Bradyrhizobium japonicum, азотфіксація, врожайність, культивування, біологічний препарат, соя, бульбочкові бактерії.

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Харитоновна			АНОТАЦІЯ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Грецький				Д	4	1
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

ABSTRACT

Kharitonova O.K. The Rhizobacterin obtaining technology.

Diploma bachelor's project in the specialty 162 Biotechnology and engineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2023.

In this diploma project, the technology of obtaining biomass of the *Bradyrhizobium japonicum* M-8 strain for the production of the biological preparation "Rhizobacterin" intended for the processing of soybeans is substantiated.

The selection of the strain, its cultivation features, advantages and results of symbiotic interaction with soy are characterized. The nutrient medium, the conditions for its preparation and sterilization, the stages of seed preparation and the necessary equipment are described. Calculations of the volumes of the fermenter and seeding devices have been made. The cultivation conditions are outlined, the required number of production cycles and culture liquid is calculated. The technological scheme of the production of "Rhizobacterin" with a description of the stages is given.

After the substantiation of the technology, the methods of product quality control are presented.

Key words: nitrogen-fixing activity, Bradyrhizobium japonicum M-8, nitrogen fixation, yield, cultivation, biological preparation, soybean, nodule bacteria

ДБП.ПЗ.162.06

					ДБП.ПЗ.162.06		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив		Харитонова			Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Грецький			Д	5	1
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19		
Затвердив							
ABSTRACT							

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
1. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	12
1.1 Характеристика бактеріального препарату «Ризобактерин» для передпосівної обробки сої на основі культури бульбочкових бактерій.....	12
1.1.1 Фізико-хімічні властивості.....	13
1.1.2 Мікробіологічні показники	13
1.1.3 Спосіб дії препарату.....	13
1.2. Потреба у цільовому продукті	14
1.3. Розрахунок потужності виробництва.....	15
1.3.1 Розрахунок частки кількості добрива для виготовлення	16
1.3.2 Розрахунок необхідної кількості біомаси для культивування.....	17
1.3.3 Розрахунок необхідної кількості культуральної рідини	17
1.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної (замовленої) потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера	17
1.4.1 Розрахунок кількості виробничих циклів	17
1.4.2 Розрахунок геометричного об'єму ферментера	18
2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	19
2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	19
2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу	30
2.2.1 Обґрунтування вибору ферментатора	30
2.2.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	33

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розробив		Харитоновна				Д	6	3
Перевірив		Грецький						
Н.Контр.						КНУТД, ББТ-19		
Затвердив								

2.2.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	34
2.2.3.1 Миючі засоби	35
2.2.3.2 Підбір концентрації миючих засобів	36
2.2.3.3 Обґрунтування вибору миючого засобу для оброблювальних.....	36
об'єктів.....	36
2.2.3.4 Дезинфікуючі засоби.....	37
2.2.3.5 Обґрунтування вибору методу дезінфекції.....	37
2.2.3.6 Класифікація хімічних дезінфікуючих засобів за активною діючою речовиною й обґрунтування вибору.....	38
2.2.3.8 Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу для оброблювальних об'єктів Для дезінфекції стін, підлоги та обладнання.	40
2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу з наведенням складу поживного середовища	41
2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	41
2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,5 м ³	42
2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,05 м ³	42
2.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 0,005 м ³	43
2.3.5 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури у качалочних колбах 750 мл.....	43
2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу.....	44
2.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	44
2.4.1.1 Вирощування інокуляту в колбах на качалках.....	45
2.4.1.2 Вирощування культури в інокуляторі 0,005 м ³	46
2.4.1.3. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,05 м ³	49
2.4.1.4. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,5 м ³	50

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						7
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	52
3.1 Таксономічний статус	52
3.2 Морфолого-культуральні властивості.....	52
3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки	53
4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	54
4.1 Поетапна блок-схема технології	54
4.2 Опис технологічної схеми	54
5. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ	74
5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу	74
5.2 Контроль якості біологічного препарату «Ризобактрин»	81
5.3 Контроль ефективності препарату.....	82
ВИСНОВКИ.....	84
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	86
ДОДАТКИ.....	89

ВСТУП

Азотне живлення сої як стратегічної бобової культури, що широко вирощується, є невід'ємною складовою її життєдіяльності, оскільки надходження зазначеного елемента необхідне для підтримки численних процесів в організмі рослини, її росту, розвитку органів й накопичення маси. Окрім того, азот – потужний елемент формування врожаїв, тож у сільськогосподарській практиці завжди зосереджена увага на способах збагачення ним культур.

На даний момент постає проблема використання мінеральних азотних добрив через високі витрати на їх виготовлення, забруднення ґрунтів та їх виснаження. Тому актуальним лишається пошук і впровадження сучасних, екологічних, ефективних й економічно вигідних альтернатив.

Впровадження у практику препаратів, що містять живі азотфіксувальні бактерії, для передпосівної обробки сої є вдалим й перспективним рішенням даної проблеми. Такі біологічні препарати не забруднюють довкілля й не виснажують ґрунти на відміну від хімічних добрив. Утворюючи симбіоз з рослиною-господарем, бульбочкові бактерії виконують ряд корисних функцій. Вони не лише забезпечують рослину доступними формами азоту, річна кількість якого в середньому може становити від 60 до більш як 300 кг азоту на гектар, а й синтезованими фітогормональними сполуками, що стимулюють її ріст. Азотфіксувальна активність сприяє значному підвищенню врожайності сортів сої, покращенню родючості ґрунтів, накопиченню білка в насінні, захисту культури від стресових факторів довкілля й інфекцій.

Отже, враховуючи вищенаведене, існує необхідність використання прогресивних штамів бульбочкових бактерій сої у виробництві добрив.

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Харитоновна			ВСТУП	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Грецький				Д	9	3
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

Мета даного бакалаврського проєкту – дослідити й запропонувати технологію виготовлення біопрепарату «Ризобактерин» на основі високоефективного штаму *Bradyrhizobium japonicum*.

Завдання дипломного проєкту наступні:

1. Проаналізувати вплив бактеріальних добрив для передпосівної обробки сої на дану рослину.
2. Проаналізувати потребу в цільовому продукті, ринок біопрепаратів України для розрахунку необхідної потужності виробництва препарату.
2. Опрацювати літературні джерела щодо різних виробничих штамів *Bradyrhizobium japonicum* для порівняння їх властивостей.
3. Обґрунтувати критерії вибору *Bradyrhizobium japonicum* М-8 як біологічного агента для використання його у технології.
4. Охарактеризувати вибір необхідного обладнання, підготовчі процеси, спосіб здійснення біосинтезу та його умови.
5. Описати стадії підготовки посівного матеріалу й поживного середовища, використовуюваного для культивування штаму.
6. Послідовно дати характеристику етапам всього технологічного процесу від початку до його завершення, умовам, роботам, що проводяться.
7. Дослідити методи контролю якості препарату «Ризобактерин»

Об’єкт дослідження – використання біологічних препаратів для покращення азотного живлення сої та її продуктивності.

Предмет дослідження – впровадження перспективних конкурентних штамів бульбочкових бактерій з кращими азотфіксувальними властивостями для виробництва добрив для сої.

Методи дослідження: теоретичні, статистичні, математичні, порівняння, обробки результатів роботи.

Інформаційна база дослідження: дані наукових публікацій, патентів, посібників (див. розділ «СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ»)

									ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						10

Новизна одержаних результатів – вдосконалення технології виробництва бактеріального добрива внаслідок використання штаму *Bradyrhizobium japonicum* і оптимального складу поживного середовища для культивування, що дозволяє підвищувати показники росту й врожайності сої краще, ніж деякі інші штами роду *Bradyrhizobium*.

Практичне значення одержаних результатів – використання у сільському господарстві в якості біологічного добрива для внесення в агроценози сої задля збагачення культури азотом та фітогормональними сполуками.

Апробація отриманих результатів – участь в Міжнародній науковій конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування», м.Харків, 27-28 квітня 2023 р. (див. Додаток А, додаток Б)

									Аркуш
									11
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					

РОЗДІЛ 1. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

1.1 Характеристика бактеріального препарату «Ризобактерин» для передпосівної обробки сої на основі культури бульбочкових бактерій

Бактеріальний препарат «Ризобактерин» (рис. 1.1) – біологічне добриво, що застосовується у сільському господарстві для покращення азотного живлення сої, росту й розвитку рослин, захисту від фітопатогенів, підвищення показників врожайності та вмісту білків у насінні. Є екологічно безпечним, не забруднює навколишнє середовище й не несе шкоди людині.

До складу оригінального препарату входить штам асоціативних азотфіксувальних бактерій *Klebsiella planticola* 5. У даній технології ми пропонуємо використання іншого штаму, а саме *Bradyrhizobium japonicum* M-8, що є високоефективним та має певні переваги (див. «Обґрунтування вибору біологічного агента»).



Рис.1.1 - Вигляд готового біопрепарату у формі торфу

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розробив	Харитонова					Д	12	7
Перевірив	Грецький					КНУТД, ББТ-19		
Н.Контр.								
Затвердив								

Бульбочкові бактерії *Bradyrhizobium japonicum* М-8, що містить «Ризобактерин», здатні асимілювати молекулярний азот для доступної до споживання рослин форми, та продукти їх метаболізму (вітаміни, фітогормони, амінокислоти).

1.1.1 Фізико-хімічні властивості

Препаративна форма - порошкоподібна, на основі торфу, темно-коричневого кольору (рис. 1.1). Вміст вологи: 6%, рН = 6,0.

1.1.2 Мікробіологічні показники

Кількість живих клітин в 1 грамі препарату - $2,3 \times 10^9$ КУО/ г.

1.1.3 Спосіб дії препарату

Механізм дії інокулянту пояснюється утворенням симбіотичних зв'язків між рослиною-господарем та мікроорганізмом, здатним проникати у кореневі волоски й, спричиняючи їх активний поділ клітин, утворювати бульбочки (рис.1.2), де відбуватиметься фіксація азоту бактеріями для рослини в обмін на синтезовані нею поживні речовини внаслідок фотосинтезу [15].



Рис. 1.2 - Бульбочки на коренях сої, утворені внаслідок симбіозу з

Bradyrhizobium japonicum

									Аркуш
									13
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					

ДБП.ПЗ.162.06

Встановлення й регуляція даної симбіотичної взаємодії тісно взаємопов'язана з под-факторами (сигнальними молекулами) бульбочкових бактерій й синтезованими ними речовинами фітогормональної природи, а також флавоноїдами макроорганізму. [15]

1.2. Потреба у цільовому продукті

Техногенний вплив та перевантаження ґрунтів призводять до відмирання їх азотофіксуючої біоти й появи сторонніх, у тому числі патогенних мікроорганізмів, небезпечних для рослин та людей. Одним з наслідків є також дисбаланс азоту та його перетворень в агроєкосистемах, що може негативно відобразитися на розвитку й врожайності культурних рослин, зокрема сої.

Соя – одна з найбільш затребуваних у вирощенні культурних рослин в Україні, цінність якої полягає у високому вмісті в насінні білка та жиру, рідкісному і різноманітному поєднанні ферментативного та вітамінного складу. [9]

Збалансований раціон людини є запорукою здоров'я й довголіття. Вміст білків у ньому - основа задовільного функціонування організму. Харчова цінність, властивості сої є підставами для використання її у виготовленні великої кількості продуктів-замінників, таких як м'ясо, молоко, сир, тофу тощо, здатних забезпечити добову норму білків у раціоні веганів та вегетаріанців, що складає до 2 грамів/кг ваги.

Окрім поживності, рослина має значний потенціал для виготовлення кормів для тварин, біопалива, косметики та використовується для інших технічних та медичних потреб.

Вищезазначені характеристики, невибагливість у вирощуванні й хороша врожайність сої користуються великим попитом в аграрному секторі України, що входить до десятки провідних країн за масштабами виробництва сої.

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		14

У 2021 р. соєю було засіяно 1,28 млн га української землі, а врожайність становила 26,8 ц/га., що є одним із найвищих показників за весь досвід вирощування сої українцями. [9]

Враховуючи потребу у вирощенні сої й проблему дисбалансу азоту в ґрунтах, необхідна розробка сучасних екологічних енергозберігаючих технологій для її вирішення. Ефективним методом є використання біопрепаратів. Зараз на ринку України є досить широкий спектр інокулянтів на основі бактерій-азотфіксаторів для обробки сої від вітчизняних та європейських виробників.

Передпосівна інокуляція насіння біопрепаратами на основі азотофіксаторів сприяє багатьом факторам, зокрема:

- Виділення прокаріотами антибіотичних речовин попереджує зараження фітопатогенами
- Підвищення активності фотосинтезу
- Підвищення врожайності культури порівняно з культурою без обробки
- Сприяє більшому накопиченню білків у плодах бобових

Окрім того, застосування бактеріальних препаратів є альтернативою мінеральним азотним добривам, виробництво яких є доволі енергозатратним та дорогим. [10]

Норма витрати бактеріального препарату для передпосівної обробки сої на основі культури *Bradyrhizobium japonicum* М-8 становить 2 кг на 1 т насіння.

1.3. Розрахунок потужності виробництва

Враховуючи загальну площу землі, підлаштованої під висівання сої, а саме 1,28 млн га, можна розрахувати кількість біопрепарату, необхідного для випуску.

Титр культури *Bradyrhizobium japonicum* М-8 у 1 г препарату – $2,3 \times 10^9$ КУО.

В Україні практикують технологію посіву сої суцільним способом.

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						15
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Рекомендована густота посіву становить 900-1000 тис. штук сої на гектар.

Вагова норма коливається у межах 120-140 кг/га [20]

Середній показник маси 1000 насінин по сортах сої – 150 г [21]

150 г – 1000 шт

X - 900 000 шт. Тоді $x = 135\ 000$ г (135 кг)

Так, для засіву 1 га території потрібно взяти 135 кг насіння.

Норма витрати препарату – 2 кг на 1 т насіння. Розрахуємо площу, що займає 1 т насіння:

$1000\text{ кг} / 135\text{ кг} = 7,41$ га (площа 1 т насіння)

Таким чином, 2 кг препарату вистачить на 7,41 га.

1.3.1 Розрахунок частки кількості добрива для виготовлення

Нехай середня витрата становить 2кг на 7,41 га.

Розрахуймо кількість препарату, необхідної для обробки 1,28 млн га, тобто, загальної площі для висівання сої:

2 кг– 7,41 га

x кг= 1,28 млн га,

$2 \times 1,280\ 000 / 7,41 = 345\ 479,13$ кг

На ринку України широкий асортимент торф'яних інокулянтів для сої пропонують переважно такі компанії: “ENZIM”, “BASF”, “BAYER”, “BIONA”, “BIONORMA”, “Хімагромаркетинг”, « БТУ-ЦЕНТР».

Виходячи з того, що продукція перелічених компаній користується попитом серед аграріїв, можна зробити висновок, що доцільним буде виготовлення лише певної частки від загального обсягу препарату, необхідного для обробки всіх посівів сої.

В середньому для обробки 1,28 млн га сої необхідно виготовити 345 479,13 кг (або 345,5 т) препарату. Кількість компаній-виробників, представлених на ринку, – 7. Тоді:

7 – 100%

									ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						16

$$1 - x, x = 14\%$$

Тому ми будемо виготовляти 14 % від загальної потреби добрива на території України. Розрахуємо кількість сухого препарату у тонах:

$$345,5 \text{ т} - 100\%$$

$$x - 14\%, x = 48,4 \text{ т препарату}$$

1.3.2 Розрахунок необхідної кількості біомаси для культивування

Для визначення потужності виробництва необхідно знайти кількість культуральної рідини, потрібної для культивування азотфіксувальних бактерій.

Відомо, що якщо 1 г сухого препарату містить $2,3 \times 10^9$ клітин *Bradyrhizobium japonicum* М-8, то така ж кількість клітин буде міститися й в 1 мл культуральної рідини.

1.3.3 Розрахунок необхідної кількості культуральної рідини

Виходячи з цього й враховуючи, що необхідно буде виробити 48,4 т сухого препарату, маємо:

$$48,4 \text{ т} = 48\,400 \text{ кг} = 48\,400\,000 \text{ г};$$

$$1 \text{ г торфу} - 1 \text{ мл КР}$$

$$48,4 \text{ т торфу} - \mathbf{48\,400\,000 \text{ мл КР}}$$

Таким чином бачимо, що для даного технологічного процесу необхідно виготовити 48 400 000 мл (або 48 400 л) культуральної рідини.

1.4. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної (замовленої) потреби в цільовому продукті та геометричний об'єм ферментера

1.4.1 Розрахунок кількості виробничих циклів

Прийmemo кількість робочих трудоднів на рік – 330. Оскільки для

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						17
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

виготовлення заданого обсягу препарату необхідно 48 400 л культуральної рідини, що є відносно невеликим числом, виробництво протягом року буде економічно недоцільним, довготривалим й вимагатиме додаткових трудових ресурсів. Тому значно ефективнішим буде вибір коротшого терміну виробництва. Наприклад, 1 квартал, що дорівнюватиме 3 місяцям:

$$12 \text{ міс} / 4 = 3 \text{ міс.}$$

Звідси визначимо час виробництва для 1 кварталу:

$$330 \text{ тр.дн.} / 4 = 83 \text{ дні}$$

Тривалість культивування *Bradyrhizobium japonicum* М-8 становить 72 год (або 3 доби) [23]. Та слід пам'ятати, що виробничий цикл, крім безпосереднього культивування мікроорганізмів, також включає передферментаційні процеси з підготовки біологічного агента, стерилізації необхідного обладнання, оснащення, повітря, поживного середовища тощо та процеси з одержання готового продукту після ферментації. Тому середня тривалість одного циклу – 7 діб.

Знаючи тривалість одного циклу, можна дізнатися загальну кількість виробничих циклів:

$$83 \text{ дн.} / 7 \text{ діб} = 11 \text{ циклів}$$

1.4.2 Розрахунок геометричного об'єму ферментера

Загальний об'єм КР для 11 циклів становитиме 48 400 л або 48,4 м³, то для одного циклу геометричний робочий об'єм ферментера V_p буде:

$$48\,400 \text{ л} - 11 \text{ циклів}$$

X – 1 цикл, x = 4 400 л або 4,4 м³, що включає коефіцієнт заповнення 0,7 (або 70% від загального об'єму ферментера).

Звідси розрахуємо загальний об'єм V_з :

$$4,4 \text{ м}^3 - 70\%$$

$$X - 100 \%, X = 6,28 = 6,3 \text{ м}^3$$

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						18
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Бульбочкові бактерії різних видів мають індивідуальну вибіркoву здатність до інфікування різних видів бобових рослин, тобто специфічність до певного виду. Так, утворювати симбіотичні зв'язки з соєю та бульбочки на коренях рослини здатні лише бактерії роду *Bradyrhizobium* [6]

Найчастіше у якості азотфіксаторів обирається вид *Bradyrhizobium japonicum*, тому його активно застосовують у світовому виробництві бактеріальних препаратів й для передпосівної обробки насіння сої .Окрім того, даний вид використовується наукою як модельний організм, для якого активно впроваджуються методи генної інженерії для створення нових високоефективних за фіксацією азоту штамів, здатних підвищувати врожайність [2]

Бактерії здатні фіксувати більше азоту, ніж може засвоїти рослина. Тож його надлишок лишається у ґрунтах після посівів ,що покращує ефективність майбутніх штамів та надає додаткове джерело азотного живлення майбутнім культурам [6].

Для вибору біологічного агента було взято декілька високоефективних штамів, що добре зарекомендували себе у бактеріальних препаратах й дослідженнях. Важливими критеріями для відбору були азотфіксувальна активність мікроорганізмів у симбіозі з рослиною, що прямо впливає на врожайність сої й вміст білків у насінні, й концентрація біомаси.

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Харитоновна			РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Грецький				Д	19	33
Н.Контр.						КНУТД, ББТ-19		
Затвердив								

Таблиця 2.1

**Показники нітрогеназної (азотфіксувальної) й нодуляційної активності симбіотичного апарату сої
за результатами інокуляції різними штамми *Bradyrhizobium japonicum***

Біологічний агент	Азотфіксувальна активність, мкМоль С ₂ Н ₂ / (рослину *год)	Врожай насіння, т/га	Приріст врожаю, т/га (% від контролю)
1. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 61A237 [14]	0,00476	2,22	0,65 (41%)
2. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> М-8 [5]	4,66	3,07	1,125 (36,7%)
3. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ІМВ В-7435 [22]	32,9	2,47	0,48 (19,25%)
4. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> УКМ В-6035 [19]	0,46	3,80	0,83 (27,9%)

ДБП.ПЗ.162.06

Зм. Аркуш № Документа Підпис Дата

20

Аркуш

Усі вищезазначені штами (табл. 2.1), як і вид *Bradyrhizobium japonicum* загалом, є активними продуцентами фітогормонів, що значним чином впливають на встановлення й підтримку рослинно-мікробної симбіотичної взаємодії. Окрім того, фітогормони ауксинової, гіберелінової та цитокінінової природи, які виділяються азотфіксувальними бактеріями у навколишнє середовище, є ростовими стимуляторами рослин. Також біологічно-активні метаболіти цих бактерій володіють антифунгальними, бактерицидними та бактериостатичними властивостями [15, 16].

Ці властивості *Bradyrhizobium japonicum* надають додаткову перевагу у якості використання даного виду як мікроорганізму для промислового виробництва біологічних добрив.

За даними показників нітрогеназної й нодуляційної активностей симбіотичного апарату сої за інокуляції штамами *Bradyrhizobium japonicum* (див. табл. 2.1) видно, що найкраще зв'язування азоту ($32,9 \pm 2,6 \text{ C}_2\text{H}_2/(\text{рослину} \cdot \text{год})$) характерне для *Bradyrhizobium japonicum* ІМВ В-7435 [23], проте за показниками врожайності даний штам поступається *Bradyrhizobium japonicum* М-8, *Bradyrhizobium japonicum* 61А237 та *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035.

Натомість, *Bradyrhizobium japonicum* 61А237 демонструє найвищий приріст врожаю насіння сої порівняно з контролем, а саме 0,65 т/га або 41%. [14]

Хоч дані параметри штамів і є ключовими для вибору найбільш ефективного біологічного агента, необхідно також звернути увагу на склад поживних середовищ для кожного штаму, оцінивши їх вартість (табл. 2.1).

									ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
										21
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						

Вартість поживних середовищ для культивування штамів <i>Bradyrhizobium japonicum</i>			
Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища
1	2	3	4
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 61A237	Маніт – 10,0	300	3,0
	Дріжджовий екстракт – 2,0	2620	5,24
	Глюконат кальцію- 1,5	223	0,3345
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	210	0,105
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,2	415	0,083
	FeCl ₃ · 6H ₂ O – 0,01	244	0,00244
	NaCl – 0,1	124	0,0124
Вартість 1л середовища – 8,78 грн			
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> УКМ В-6035	Маніт -10,0	300	3,0
	Дріжджовий екстракт- 2,0	2620	5,24
	Глюконат кальцію- 1,5	223	0,3345
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	210	0,105
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,2	415	0,083
	FeCl ₃ · 6H ₂ O – 0,01	244	0,00244
	NaCl – 0,1	124	0,0124
Вартість 1л середовища - 8,78 грн			
Таблиця 2.2			

ДВ.П.ПЗ.162.06

Зм.

Аркулш

№ Документа

Підпис

Дата

22

Аркулш

Зм.	
Аркулш	
№ Документа	
Пішпис	
Дата	

ДВП.ПЗ.162.06

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища
1	2	3	4
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> IMB B-7435	Маніт -10,0	300	3,0
	Сахароза – 10,0	180	1,8
	Агар-агар- 20,0	810	16,2
	K ₂ HPO ₄ – 0,5	210	0,105
	MgSO ₄ – 2,0	93	0,186
	CaCl ₂ – 0,2	69	0,0138
	Люпиновий відвар – 150 мл (де 7,5 г – люпину)	38	0,285
	(NH ₄) ₂ MoO ₄ - 0,001	1800	0,0018
	CoCl ₃ – 0,001	850	0,00085
	KH ₂ PO ₄ – 0,5	47,33	0,0237
(NH ₄) ₂ SO ₄ - 0,5	52	0,026	
Вартість 1л середовища – 22,51 грн			

Зм.	
Архувш	
№ Документа	
Підпис	
Дата	
ДВП.ПЗ.162.06	
Архувш	24

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища
1	2	3	4
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-8	Маніт -10,0	300	3,0
	Дріжджовий екстракт- 0,5	2620	1,31
	K ₂ HPO ₄ – 0,3	210	0,063
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,2	415	0,083
	NaCl – 0,1	124	0,0124
	FeSO ₄ · 7H ₂ O – 0,01	61	0,0006
	CaCl ₂ - 0,02 г/л	69	0,00138
	Мікроелементний комплекс - 1 мл/л, що включає:		
	H ₃ BO ₃ - 2,86 мг/л	75	0,00021
	MnSO ₄ · 4H ₂ O - 1,81 мг/л	42	0,00008
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O - 0,22 мг/л	85	0,00002
	CuSO ₄ · 5H ₂ O - 0,025 мг/л	175	0,000004
	(NH ₄) ₂ MoO ₄ - 0,025 мг/л	1800	0,00005
CoSO ₄ · 7H ₂ O - 0,025 мг/л	751,6	0,00002	
Вартість 1л середовища – 4, 47 грн			

Посилання на компоненти середовища

1. Агар-агар – 810 грн/кг

<https://selitra.biz/uk/p208745194-agar-agar-dlja-mikrobiologiji.html>

2. CaCl₂ – 69 грн/кг

<https://shop.hlr.ua/ua/kalciy-hloristyj-bv-pishch-granuly-243787.html>

3. Маніт – 300 грн/кг

<https://shop.hlr.ua/ua/mannit-farm-218750.html>

4. Дріжджовий екстракт – 2620 грн/кг

http://agar.com.ua/Yeast_Extras_250

5. Кальцій глюконат – 223 грн/кг

<https://snabhim.com.ua/glyukonat->

[kaltsiya?gclid=Cj0KCQIAxbefBhDfARIsAL4XLRqDJZh0BjOa63FCNFzqOoDtRay](https://snabhim.com.ua/glyukonat-kaltsiya?gclid=Cj0KCQIAxbefBhDfARIsAL4XLRqDJZh0BjOa63FCNFzqOoDtRay07pv-vSLkhifbX0_ItaLzYSXpS7saAsVgEALw_wcB)

[07pv-vSLkhifbX0_ItaLzYSXpS7saAsVgEALw_wcB](https://snabhim.com.ua/glyukonat-kaltsiya?gclid=Cj0KCQIAxbefBhDfARIsAL4XLRqDJZh0BjOa63FCNFzqOoDtRay07pv-vSLkhifbX0_ItaLzYSXpS7saAsVgEALw_wcB)

6. K₂HPO₄ – 210 грн/кг

<https://prom.ua/p1791286002-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>

7. MgSO₄ · 7H₂O – 415 грн/кг

<https://shop.hlr.ua/ua/magniy-sernokislyy-farm-98131.html>

8. NaCl – 124 грн/кг

<https://shop.hlr.ua/ua/natriy-hloristyj-farm-imcopharma-102076.html>

9. FeCl₃ · 6H₂O – 244 грн/кг

<https://shop.hlr.ua/ua/jelezo-hlornoe-6-vodn-ch-231832.html>

10. MgSO₄ – 93 грн/кг

<https://ximindustry.com/ua/p15552519-sulfat-medi.html>

11. H₃BO₃ - 75 грн/кг

<https://addnew.biz/ads/bornaya-kislota-1-kg-bor-ortobornaya-kislota-h3bo3>

12. ZnSO₄ · 7H₂O - 85 грн/кг

<https://himreagent.com.ua/ua/p1305727524-tsink-sernokislyj-sulfat.html>

13. CoSO₄ · 7H₂O - 751,6 грн/кг

<https://ukrkolorhm.prom.ua/ua/p46475484-sulfat-kobalta-meshok.html>

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		25

15. $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 43 грн/кг

<https://himfarminvest.com.ua/margantsa-sulfat>

16. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 61 грн/кг

<https://klebrig.com.ua/ua/p1207572772-zheleznyj-kuporos-klebrig.html>

17. Сахароза – 180 грн/кг

<https://ub.ua/market/view/565977/all/saharoza/>

18. KH_2PO_4 - 47.33 грн/кг

<https://flagma.ua/monokaliyfosfat-digidrofosfat-kaliya-o2757717.html>

19. $(NH_4)_2SO_4$ – 52 грн

<https://klebrig.com.ua/ua/p1758535874-sulfat-ammoniya->

[klebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=Cj0KCQiAi8KfBhCuARIsADp-A54kY-0JSFDBmM6x4EfN6KRE1IfnWIdpXPnBBFqKFBa7kZ598qCeIRsaAjlZEALw_wcB](https://klebrig.com.ua/ua/p1758535874-sulfat-ammoniya-klebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=Cj0KCQiAi8KfBhCuARIsADp-A54kY-0JSFDBmM6x4EfN6KRE1IfnWIdpXPnBBFqKFBa7kZ598qCeIRsaAjlZEALw_wcB)

20. Насіння люпину – 38 грн/кг

<https://svitidey.com/product/178214-trava-lyupin-1-kg-tmsemena->

[ukrainyi.html?gclid=Cj0KCQiAi8KfBhCuARIsADp-](https://svitidey.com/product/178214-trava-lyupin-1-kg-tmsemena-ukrainyi.html?gclid=Cj0KCQiAi8KfBhCuARIsADp-)

[A54jUvnqAscL79G7Ko_1AzYZ3wET0rQ5Vtr4mHZheuzwpqgMYTlaY_QaAl-wEALw_wcB](https://svitidey.com/product/178214-trava-lyupin-1-kg-tmsemena-ukrainyi.html?gclid=Cj0KCQiAi8KfBhCuARIsADp-A54jUvnqAscL79G7Ko_1AzYZ3wET0rQ5Vtr4mHZheuzwpqgMYTlaY_QaAl-wEALw_wcB)

21. $(NH_4)_2MoO_4$ – 1800 грн/кг

https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ammonium_molybdate/

22. $CoCl_3$ – 850 грн/кг

<https://flagma.ua/kobalt-hloristy-o3604777.html>

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		26

Таким чином видно, що найбільш дороговартісним є поживне середовище для культивування *Bradyrhizobium japonicum* ІМВ В-7435 (22,51 грн/л), що є недостатньо економічно обґрунтованим для даного виробництва. Тоді як вартість 1 л середовища для *Bradyrhizobium japonicum* М-8 становить 4,47 грн.

Для останнього етапу порівняння було звернено увагу на тривалість біосинтезу, особливості технологічного процесу й концентрацію біомаси (табл 2.3).

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						27
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

**Порівняння складу поживних середовищ для культивування штамів *Bradyrhizobium japonicum*
з метою отримання біомаси**

Таблиця 2.3

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, КУО/ 1г	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу
1	2	3	4	5
<i>1.Bradyrhizobium japonicum</i> 61A237 [14]	Маніт -10,0 Дріжджовий екстракт - 2,0 Глюконат кальцію - 1,5 K ₂ HPO ₄ – 0,5 MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,2 FeCl ₃ · 6H ₂ O – 0,01 NaCl – 0,1	2,0x10 ⁹	94	Культивування бактерій проводили за інтенсивності перемішування 220 об/хв; Температура - 26-28 °С; рН 6,5-7,5
<i>2.Bradyrhizobium japonicum</i> М-8 [5]	Маніт -10,0 Дріжджовий екстракт- 0,5 K ₂ HPO ₄ – 0,3 MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,2 NaCl – 0,1 FeSO ₄ · 7H ₂ O – 0,01 CaCl ₂ - 0,02 г/л Мікроелементний комплекс – 1 мл/л, що включає: H ₃ BO ₃ - 2,86 мг/л MnSO ₄ · 4H ₂ O - 1,81 мг/л ZnSO ₄ · 7H ₂ O - 0,22 мг/л CuSO ₄ · 5H ₂ O - 0,025 мг/л	2,3 x10 ⁹	72	Глибинне культивування за інтенсивності перемішування 220 об/хв; Температура - 28 ± 1°С. рН 6,5-7,5

Продовження таблиці 2.3

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація біомаси, КУО/ 1г	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу
1	2	3	4	5
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O-0,025 мг/л CoSO ₄ · 7H ₂ O - 0,025 мг/л			
<i>3.Bradyrhizobium japonicum</i> IMB B- 7435 [23]	Маніт – 10,0 Сахароза – 10,0 Агар-агар- 20,0 K ₂ HPO ₄ – 0,5 MgSO ₄ – 2,0 CaCl ₂ – 0,2 Люпиновий відвар – 150 мл(де 7,5 г – люпину) (NH ₄) ₂ MoO ₄ – сліди CoCl ₃ – сліди KH ₂ PO ₄ – 0,5 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 0,5	3,5 x 10 ⁹	72	Глибинне культивування за інтенсивності перемішування 220 об/хв; Температура- 26-28 °С; рН=6,8-7,0,
<i>4.Bradyrhizobium japonicum</i> УКМ B-6035 [16]	Маніт -10,0 Дріжджовий екстракт- 2,0 Глюконат кальцію- 1,5 K ₂ HPO ₄ – 0,5 MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,2 FeCl ₃ · 6H ₂ O – 0,01 NaCl – 0,1	1,9 x 10 ⁹	94	Культивування в періодичних умовах за інтенсивності перемішування 220 об./хв. Температура 28-30 °С, рН 6,6-7,0

ДВП.ПЗ.162.06

Для технологічного процесу важливо, щоб період культивування бажаного мікроорганізму мав оптимальну тривалість для швидшого одержання продукту й скорочення витрат часу й коштів на підтримку необхідних процесів культивування. При культивуванні промислових штамів бульбочкових бактерій зазвичай кращий час збирання припадає на експоненційну фазу росту, коли клітини найбільш активно виробляють корисні метаболіти та інші біохімічні речовини, необхідні для підживлення рослин.

З табл. 2.3 бачимо, що за 72 год найбільший приріст біомаси спостерігається у штамів *Bradyrhizobium japonicum* ІМВ В-7435 й *Bradyrhizobium japonicum* М-8 ($3,5 \times 10^9$ та $2,3 \times 10^9$ КУО на 1 г відповідно [5]).

Отже, підсумовуючи характеристики взятих для порівняння штамів *Bradyrhizobium japonicum* й наведені у табл.2.1, табл.2.2 й табл.2.3 дані, можна стверджувати, що одержання біологічного добрива для сої для ефективної фіксації азоту на основі *Bradyrhizobium japonicum* М-8 є найбільш доцільним, оскільки штам має наступні переваги: коротша тривалість культивування (72 год), після закінчення якого спостерігаються високі показники концентрації біомаси ($2,3 \times 10^9$ КУО / 1 г); низька вартість необхідного поживного середовища (3,99 грн/ л), доведена висока ефективність штаму у складі препарату, що відображається у показниках азотфіксації ($4,66 \text{ мкМоль } \text{C}_2\text{H}_2/(\text{рослину} \cdot \text{год})$), приросту врожаю насіння сої на 1,125 т/га (або 36,7% від контролю), що сумарно складає 3,07 т/га. [5]

2.2 Обґрунтування способу проведення біосинтезу

2.2.1 Обґрунтування вибору ферментатора

Для вибору параметрів технологічного процесу й ферментера, де здійснюватиметься біосинтез бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8, слід врахувати морфолого-культуральні властивості продуцента, щоб умови технологічного процесу не нашкодили мікроорганізму і його важливим у

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						30
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

практичному застосуванні характеристикам.

Особливості культивування даного штаму передбачають аеробні умови, температуру $28 \pm 1^\circ\text{C}$, оптимальний $\text{pH} = 6,5-7,5$ [24]. Знаючи, що біологічний об'єкт потребує вільного кисню для метаболічних потреб, необхідно забезпечити його ефективно надходження у поживне середовище. Отже, обов'язковим оснащенням ферментера для аерації азотфіксуючих мікроорганізмів при культивуванні буде барботер – прилад, що розбиває потоки стерильного повітря на бульбашки. Барботер встановлюється на дні ферментатора.

Проте лише прямої подачі повітря замало. Для його масопередачі й рівномірного розподілу в товщі поживного середовища необхідно оснастити ферментатор мішалкою. Також робота мішалки забезпечуватиме підтримку температурних параметрів рідини.

Оскільки живильне середовище для вирощування обраного штаму не є в'язким та важким, доречним буде вибір гвинтової мішалки (рис. 2.1). Рух рідини при перемішуванні – осьовий.

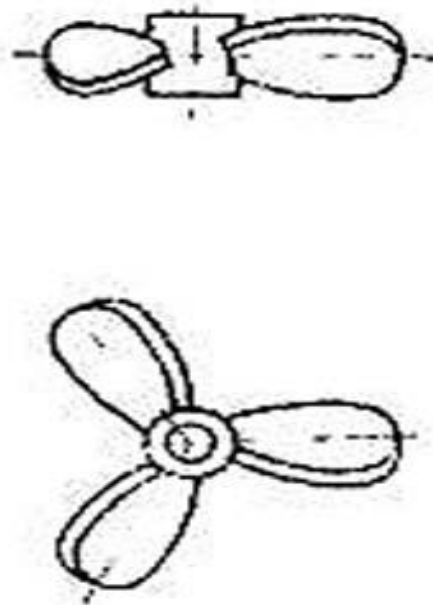


Рис. 2.1 - Гвинтова мішалка

Культивування *Bradyrhizobium japonicum* М-8 відбувається періодично, глибинним способом. Таким чином накопичується як біомаса, так і продукти їх метаболізму у культуральній рідині.

									ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
										31
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						

Враховавши вищезазначені умови культивування нашого мікроорганізму, а також його фізіолого- біохімічні характеристики, слід обрати відповідний для цього апарат. Він має бути оснащений мішалкою з частотою обертів 220 об/хв., барботером, датчиками рН, тиску, температури, газів, піни для повного контролю над технологічним процесом та виключення будь-яких небажаних наслідків.

Тому найкращим рішенням стане вибір біореактора від австрійського виробника «Sysbiotech»(рис.2.2, рис.2.3). Він пропонує широкий спектр апаратів з робочим об'ємом від 500 до 150 000 л. Біореактори забезпечують асептичність процесів, стерильність повітря в апаратах завдяки фільтрам PTFE 0,2 мкм. [3].

Ферментери «Sysbiotech» мають зручну автоматизовану систему управління, що дозволяє контролювати виробничий процес від одного комп'ютера. Простий і інтуїтивно зрозумілий інтерфейс користувача забезпечує швидкий доступ до всіх контролерів і даних. Для кращого контролю біопроцесу можливе й створення власної програми культивування за допомогою застосунка.

Апарати та їх конструктивні елементи вироблені з нержавіючої сталі. Мають різні перемішувачі пристрої з частотою обертання від 10 до 600 об/хв, оснащені усіма необхідними датчиками рівнів рН, температури, тиску, розчиненого у поживному середовищі кисню тощо [3].



Рис. 2.2 - Приклади ферментерів "Sysbiotech"



Рис. 2.3 - Штуцер ферментера "Sysbiotech"

Отже, обираючи ферментер "Sysbiotech", ми задовольнимо всі вимоги до нашого виробництва.

2.2.2 Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Bradyrhizobium japonicum М-8 є аеробом, тож потребує поданого розчиненого у поживному середовищі повітря. Основною вимогою до нього є його стерильність. Перед подачею безпосередньо у ферментер через барботер повітря має пройти етапи підготовки з очистки, щоб виключити ймовірність контамінації сторонніми мікроорганізмами й потрапляння забруднюючих часточок у апарат і його частини.

Перед очисткою атмосферне повітря збирається через спеціальні шахти, розташованих на висоті не менше 8 -10 м у найменш забруднених ділянках заводу [19].

Повітря на аерацію в посівні та виробничі ферментери подається за допомогою компресора й очищується за допомогою спеціальних фільтрів, наповнених волокнистими матеріалами.

Перед стисненням воно проходить попереднє механічне очищення від великих часток, таких як пилу. Для цього використовуються стільникові або оливні фільтри з металевою сіткою, скловолоконом, синтетичними волокнами. На губчатих фільтрах з модифікованого

										ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
											33
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата							

пінополіуретану ефективність уловлювання пилу сягає 50-85 % [19].

Для більш досконалої стерилізації повітря використовують фільтри для біологічного очищення, а саме грубої очистки (або головні фільтри) та індивідуальні фільтри (високоєфективні).

Головні фільтри забезпечують очищення від часток розміром 1- 1,5 мкм (бактерій). Ефективність очистки – до 98% (посилання на книгу з модульного). Такі фільтри також називають глибинними (набивними). Їх встановлюють в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря [19].

Індивідуальні фільтри встановлюють безпосередньо перед ферментером, посівним апаратом чи інокулятором. Слугують для остаточної стерилізації повітря перед його надходженням в апарати. Дані фільтри заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, наприклад, тканиною Петрянова, базальтовим волокном, що дозволяє одержати на виході повітря, очищене до 99,999% [19].

2.2.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Використання мийно-дезінфікуючих засобів дозволяє підтримувати виробничі приміщення, інвентар, поверхні обладнання й оснащення тощо у належному санітарному стані. Сприяє дотриманню особистої гігієни персоналом, попередженню поширення збудників захворювань.

Миючі й дезінфікуючі засоби для своєї ефективності мають володіти певними вимогами. Розчинність їх у воді повинна становити не менше 10 % при температурі 50 °С і розведенні не більше, як 1:20 протягом 15–20 хв. [18]

Мийна здатність засобів повинна бути оціненою не менше, як „добре”. Поверхневий натяг для мийно-дезінфікуючих засобів, що містять поверхнево-активні сполуки, має бути не більше 60 мН/м, піноутворення не більшим ніж 50 % об'єму розчину, стійкість піни не більше, як 0,3 одиниці. Корозія металевих деталей, викликана дією розчинів засобів, допускається не більшою за 2,0 г/м² - рік. [18].

						ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
							34
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			

Також до мийно-дезинфікуючих засобів висувається такий ряд вимог, як:

- Добра розчинність у воді
- Легке змивання при споліскуванні;
- Відсутність різкого неприємного запаху, безбарвність;
- Відсутність агресивної дії щодо матеріалів;
- Слабка корозійна активність;
- Стійкість при зберіганні;
- Зберігати активність протягом тривалого часу;
- Пожежо- і вибухобезпечність
- Безпека для довкілля та повний розпад на нешкідливі сполуки;
- Широкий спектр протимікробної активності;
- Бактерицидна дія щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів;
- Відсутність подразнюючої дії на шкіру рук;
- За токсикологічною характеристикою бути нетоксичними або Малотоксичними.
-

2.2.3.1 Миючі засоби

Миючий засіб – це речовина або препарат, у складі яких є мило та/або інші поверхнево-активні речовини, призначені для прання або очищення [18].

При виборі миючих засобів варто звертати увагу на наступне:

- Миюча здатність;
- Універсальність використання;
- Ціна;
- Оформлення упакування;
- Обсяг розфасування;
- Екологічні властивості;
- Діапазон температурного використання [8].

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						35
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.2.3.2 Підбір концентрації миючих засобів

Для дотримання санітарії застосовуються засоби, схвалені до використання уповноваженими органами під державним наглядом; та перевірки в межах своєї юрисдикції.

Лужні та кислотні мийні засоби та їх концентрації повинні бути підібрані та використані відповідно до ступеня забруднення об'єктів, що підлягають обробці. Для приготування водних розчинів і для ополіскування використовують водопровідну воду, відповідну до вимог ДСТУ 7525:2014 "Вода питна" [12].

2.2.3.3 Обґрунтування вибору миючого засобу для оброблювальних об'єктів

Для обробки поверхонь вдалим вибором буде порошкоподібний миючий засіб «Біонол», оскільки він є оптимальним за вартістю (≈ 175 грн/кг), ефективний при своєму використанні, відповідає всім вимогам до миючих засобів і є універсальним, що дозволяє використовувати цей засіб для миття обладнання, стін, підлоги та устаткування.

Склад «Біонолу» : діюча речовина - алкілбензолсульфонат натрію 4,5-10,0 %, ПАР, ензими, добавки.

Властивості миючого засобу: змочувальні, мийні, емульгуючі властивості, а саме: видалення білкових, жирових забруднень, лікарських та дезінфекційних засобів і зовнішніх поверхонь.

Доводить свою ефективність навіть при низьких концентраціях (0,5-2%) у воді будь-якої жорсткості, що робить його використання економічно вигідним.

Повна розчинність у воді, хороше змивання з поверхонь, відсутність слідів при застосуванні, утворення стабільної піни у воді будь-якої температури показують зручність даного засобу у використанні.

Призначення: передстерилізаціне очищення в медицині, очищення

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						36
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

технологічного обладнання з антикорозійних матеріалів, сильно забруднених підлог,поверхонь, застосування в установах охорони здоров'я та лікувально-профілактичних закладах, на підприємствах харчової та переробної промисловості, громадського харчування та в побуті.

Використання: 14 діб за умов зберігання у тарі зі щільно закритою кришкою.

Фасування: банки по 1кг [13].

2.2.3.4 Дезинфікуючі засоби

На об'єктах господарювання, а особливо на підприємствах мікробного синтезу, де здійснюються біотехнологічні процеси й працює велика кількість персоналу, заходи дезінфекції є дуже важливими. Їх проведення дозволяє

запобігти чи ліквідувати процес накопичення, розмноження і поширення збудників інфекційних захворювань ,таких як патогенних бактерій, вірусів, рикетсій, токсинів, найпростіших, грибів на об'єктах навколишнього середовища.

Дезінфекція широко застосовується в комплексі профілактичних і протиепідемічних заходів. Є важливою не лише по відношенню до здоров'я працівників установи, а й для сприяння повної асептичності технологічних процесів.Заходи дезінфекції здійснюються за допомогою дезінфікуюючих засобів – хімічних речовин, біологічних чинників та засобів медичного призначення.

2.2.3.5 Обґрунтування вибору методу дезінфекції

Існує декілька методів дезінфекції , серед яких виділяють механічний, фізичний, біологічний, хімічний та комбінований [11].

Механічний метод є доступним, включає провітрювання приміщень, вологе протирання поверхонь, прання тощо. Недоліком його є недостатнє знезараження об'єктів.

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						37
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Фізичний метод широко застосовується для знезараження приміщень, апаратів, обладнання, інструментів. Є високоефективним, проте зазвичай не є універсальним, для його використання потрібна спеціальна апаратура, що може бути дороговартісною.

Біологічний метод дезінфекції має суто специфічне призначення, а саме очищення стічних вод, біотермічні камери, компостування. Тому також не підходить для застосування на даному мікробному виробництві.

Хімічний метод дезінфекції заснований на вживанні різноманітних хімічних речовин, що викликають загибель мікроорганізмів. Діють, в основному, поверхнево. Даний метод дедалі зручніший і простіший у використанні, оскільки не вимагає застосування складного, зокрема стаціонарного, обладнання. Тому є широковживаним у практиці [11].

Отже, найкращим й найбільш економічним є саме хімічний метод дезінфекції.

2.2.3.6 Класифікація хімічних дезінфікуючих засобів за активною діючою речовиною й обґрунтування вибору

Усі хімічні засоби, що використовуються в дезінфекційній практиці, можна розподілити за активно діючою речовиною на декілька основних груп:

- 1) галоїдовмісні сполуки;
- 2) окислювачі, або кисневмісні;
- 3) поверхнево-активні речовини (ПАР);
- 4) гуанідиновмісні сполуки;
- 5) альдегідовмісні засоби;
- 6) спирти;
- 7) луги;
- 8) кислоти;

9) композиційні (сукупність діючих речовин із наведених вище груп дезінфектантів) [11].

Діючими речовинами галоїдовмісних сполук є хлор, бром, йод. Хлорвмісні

						ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			38

препарати використовують найчастіше, наприклад хлорамін, хлорантоїн, хлорне вапно, гіпохлорити натрію. Характеризуються ефективною антимікробною активністю, відносно швидкою дією, невисокою вартістю. Проте мають подразнюючу дію на шкіру й слизові оболонки, швидко спричиняють корозію металевих предметів, знебарвлюють тканини.

Окислювачі – засоби, що містять у своєму складі атомарний кисень. Прикладом окиснювачів є пероксид водню. Не мають характерного запаху, малотоксичні, ефективні, є одними з найбільш безпечних для навколишнього середовища. Можуть знезаражувати стійкі до корозії металеві поверхні, скло та пластмасу.

Поверхнево-активні речовини (ПАР)- органічні високомолекулярні сполуки, які знижують поверхневий натяг рідин. Найбільш поширені миючі засоби у господарстві. Їх застосовують як добавки до складу композиційних дезінфекційних засобів. Окрім добрих миючих властивостей, є малотоксичними, не викликають корозії металів, є вискоекономічними. Серед недоліків – вузький спектр протівірусної дії.

Гуанідини містять у своєму складі складні органічні сполуки. Активні щодо грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, проте малоактивні до мікобактерій туберкульозу, вірусів, грибів, спор. Нетоксичні. Утворюють плівку при нанесенні на об'єкти.

Альдегідовмісні засоби мають широкий спектр антимікробної дії: бактерицидні,

віруліцидні, фунгіцидні властивості. Для них притаманна відсутність або низька корозійна активність, відсутність різких подразнюючих запахів.

Спирти є також одними з найпоширеніших дезінфектантів, що використовуються для дезінфекції поверхонь й у якості антисептиків для шкіри.

Отже, серед перерахованих груп дезінфікуючих засобів найбільш обґрунтованими для вибору з точки зору їх ефективності, безпечності й економічності є композиційні, що можуть містити у собі кілька різних активних компонентів[11].

										Аркуш
										39
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						

2.2.3.8 Обґрунтування вибору дезінфікуючого засобу для оброблювальних об'єктів Для дезінфекції стін, підлоги та обладнання.

Дезінфікуючий засіб "Полідез" є оптимальним вибором для обробки виробничих приміщень, зовнішніх частин комунікацій й обладнання. «Полідез» проявляє сильну бактерицидну, туберкулоцидну, фунгіцидну дію. Ефективно діє проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, аеробних, анаеробних мікроорганізмів, біоценозів бактерій, грибів, водоростей і найпростіших. Засіб проявляє дезінфекційний ефект через 20 хв після його нанесення на поверхню. Більша витримка (60 хв або більше) рекомендована при застосуванні розчину низьких концентрацій. Вартість засобу – 210 грн [17].

Даний засіб характерний тим, що не має запаху й не надходить у повітря після обробки ним об'єктів. У рекомендованих концентраціях не подразнює шкіру, слизову оболонку очей, і верхніх дихальних шляхів, проте при роботі з концентрованими розчинами варто використовувати засоби індивідуального захисту. «Полідез» не кородує поверхні металів, не пошкоджує поверхні з дерева, лінолеуму, гуми тощо. Утворюючи полімерну плівку, забезпечує пролонгований знезаражуючий ефект. Знезараження об'єктів може проводитись шляхом протирання, зрошення, занурення й промивання [17].

Склад засобу: діюча речовина – полігексаметиленгуанідин гідрохлорид -1,5 %, алкілдиметилбензиламонію хлорид – 1,5 %, допоміжні речовини: лужний компонент, барвник, ароматизатор, вода.

Приготування робочого розчину: розчин «Полідезу» розводять водою, підігрітою до 30-40 ° С, перемішують розчин до повної однорідності і розчинення. Концентрація готового розчину залежить від ступеня забруднення поверхонь й типу дезінфекції.

Умови зберігання: готовий робочий розчин зберігати протягом 14 днів у закритих ємностях.

Фасування: Каністра ємністю 1 л [17].

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						40
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

2.3 Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу з наведенням складу поживного середовища

2.3.1 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для одержання потрібної кількості біомаси *Bradyrhizobium japonicum* M-8 для виробництва препарату необхідно, щоб посівний матеріал було поступово вирощено у кількох спеціальних апаратах різного об'єму шляхом «масштабування». Розраховуючи кількість стадій, посівного матеріалу й поживного середовища варто починати з найбільшого апарата, закінчуюючи мінімальним за об'ємом з попередньо вирощеною біомасою на колбах.

За виробничий цикл отримують 4400 л культуральної рідини.

При обраному коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,7$ можливий геометричний об'єм ферментера становитиме :

$$4400 \text{ л} / 0,7 = 6280 \text{ л.}$$

Найближчим до цього значенням буде 6300 л або **6,3 м³**:

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 5-10% від об'єму поживного середовища. Кількість поживного середовища відповідно- 90-95%.

Розрахуємо оптимальний вміст посівного матеріалу для ферментатора:

$$V_3 = 6,3 \text{ м}^3:$$

$$V_P = 4,4 \text{ м}^3 \text{ (з урахуванням } K_3 = 0,7 \text{)}.$$

Якщо вміст посівного матеріалу – 10%, то це складатиме 440 л, що буде економічно не вигідним для даного виробництва, оскільки у такому випадку для попередньої стадії доведеться обирати ферментер з загальним об'ємом $V_3 = 1000$ л або 10 м³.

Якщо $V_3 = 10 \text{ м}^3$, тоді коефіцієнт заповнення даного ферментера становитиме:

$$1000 \text{ л} - 1,0$$

$$440 \text{ л} - x, \quad x = 0,4.$$

										ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
											41
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата							

Як бачимо, це значення не відповідає обраному раніше $K_3 (0,7)$ і є досить низьким, що робить використання ферментера недоцільним. До того ж, менший об'єм посівного матеріалу в апараті допоможе зменшити lag-фазу росту бактерій, заощадить час для їх адаптації до умов середовища й дозволить швидше одержати біомасу в активній фазі розмноження, а саме в середині експоненційної фази.

Саме тому для внесення у ферментер з $V_3 = 6,3 \text{ м}^3$ було обрано саме 8% або 350 л посівного матеріалу, оскільки це значення задовольняє коефіцієнт заповнення 0,7 для належного проходження процесів:

$$4,4 \text{ м}^3 - x$$

$$6,3 \text{ м}^3 - 1,0, \quad x = 0,7.$$

Тоді кількість поживного середовища складатиме:

$$V_{\text{ПС}} = 4\,400 \text{ л} - 350 \text{ л} = 4\,050 \text{ л}.$$

2.3.2 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі $0,5 \text{ м}^3$

Для одержання 350 л посівного матеріалу для ферментера $V_3 = 6,3 \text{ м}^3$ необхідно попередньо обрати інокулятор підходящого об'єму.

При коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,7$ можливий геометричний об'єм інокулятора становитиме:

$$350 \text{ л} - 0,7$$

$$X \text{ л} - 1,0, \quad x = 500 \text{ л} \text{ або } 0,5 \text{ м}^3$$

У такому випадку $V_P = 350 \text{ л}$. Оптимальна кількість посівного матеріалу = **10% або 35 л.**

Звідси розрахуємо кількість поживного середовища:

$$V_{\text{ПС}} = 350 \text{ л} - 35 \text{ л} = 315 \text{ л}.$$

2.3.3 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі $0,05 \text{ м}^3$

										Аркуш
										42
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						

Для отримання 35 л посівного матеріалу інокулятора $V_3 = 0,5 \text{ м}^3$ необхідно попередньо обрати інокулятор підходящого об'єму.

Враховуючи коефіцієнт заповнення $K_3 = 0,7$, можемо дізнатися загальний геометричний об'єм інокулятора:

$$35 \text{ л} - 0,7$$

$$X \text{ л} - 1,0, \text{ тоді } x = \mathbf{50 \text{ л або } 0,05 \text{ м}^3}$$

Знаючи, що $V_p = 35 \text{ л}$, то кількість посівного матеріалу = **10% або 3,5 л.**

Тоді кількість поживного середовища складатиме:

$$V_{\text{ПС}} = 35 \text{ л} - 3,5 \text{ л} = \mathbf{31,5 \text{ л}}$$

2.3.4 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі $0,005 \text{ м}^3$

Для одержання 3,5 л посівного матеріалу для інокулятора $V_3 = 0,05 \text{ м}^3$ необхідно попередньо обрати апарат підходящого об'єму.

Враховуючи коефіцієнт заповнення $K_3 = 0,7$, можемо дізнатися загальний геометричний об'єм інокулятора:

$$3,5 \text{ л} - 0,7$$

$$X \text{ л} - 1,0, \text{ тоді } x = \mathbf{5 \text{ л або } 0,005 \text{ м}^3}$$

Тоді $V_p = 3,5 \text{ л}$. Найбільш вигідний об'єм посівного матеріалу для внесення = **10% або 0,35 л**

Звідси випливає, що кількість поживного середовища дорівнюватиме:

$$V_{\text{ПС}} = 3,5 \text{ л} - 0,35 \text{ л} = \mathbf{3,15 \text{ л}}$$

2.3.5 Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури у качалочних колбах 750 мл

Одним з перших етапів підготовки посівного матеріалу для виробництва буде його вирощування у колбах. Пам'ятаємо, що частота обертів при перемішуванні становитиме 220 об/хв. Тому для даного процесу найкращим

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						43
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

вибором буде колба з круглим дном, що забезпечить більшу площу контакту клітин з киснем при перемішуванні на качалці. Необхідний об'єм колби – 750 мл, загальний об'єм посівного матеріалу – 0,35 л.

Враховуюючи, що максимальне заповнення колби – 200 мл, обираємо 100 мл на колбу для кращої аерації клітин під час перемішування.

Отже, необхідно всього **4 колби й 2 додаткові**. Для кожної з колб слід взяти по 1 пробірці з попередньо внесеною культурою.

Таким чином підготовка посівного матеріалу для вирощування у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,7 проходить у 5 етапів.

2.4 Обґрунтування способу приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу

2.4.1 Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Вирощування посівного матеріалу та біосинтез відбувається в середовищі такого складу (г/л):

Маніт - 10

Дріжджовий екстракт – 0,5

K₂HPO₄ – 0,3

MgSO₄ · 7H₂O – 0.2

NaCl – 0,1

FeSO₄ · 7H₂O- 0,01

CaCl₂ –0,02

Мікроелементний комплекс (1 мл/ л), що включає :

H₃BO₃ - 2,86 мг/л

MnSO₄ · 4H₂O - 1,81 мг/л

ZnSO₄ · 7H₂O - 0,22 мг/л

CuSO₄ · 5H₂O - 0,025 мг/л

(NH₄)₂MoO₄ - 0,025 мг/л

CoSO₄ · 7H₂O - 0,025 мг/л

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						44
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Оскільки підготовка посівного матеріалу всього проходитиме у 5 стадій, слід розрахувати необхідну кількість складових поживного середовища для кожної з них.

У табл.2.4 наведено розрахунки для окремих компонентів середовища для заданого об'єму, а також загальний вміст мікроелементного комплексу для внесення.

Варто зазначити, що вміст кожного з мікроелементів дуже незначний, тому більш доречним буде приготування одразу тієї кількості, що дорівнює сумарній для кожного об'єму середовища всіх апаратів, а саме 4,4 л. Перерахунок мікроелементів здійснювався на даний об'єм (табл. 2.5).

2.4.1.1 Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Щоб зберегти складові поживного середовища у стабільному стані для їх подальшого споживання біологічним агентом, слід умовно виділити кілька композицій. Композиції складаються залежно від режимів стерилізації компонентів. Всього виділимо 5 композицій:

Композиція 1 : маніт – режим стерилізації: 1 атм, 121°C, 20 хв.

Композиція 2: K_2HPO_4 , NaCl, $CaCl_2$ - режим стерилізації: 1,5 атм, 131 °С, 50 хв

Композиція 3: $MgSO_4 \times 7H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$ - режим стерилізації: 1,5 атм, 131 °С, 40 хв.

Композиція 4: дріжджовий екстракт - режим стерилізації: 0,75 атм, 112°C, 30хв

Композиція 5: солі мікроелементного комплексу- режим стерилізації: 1,5 атм, 131 °С, 20 хв.

Солі композицій 2 та 3 варто стерилізувати окремо щоб не допустити їх взаємодії між собою та утворення нерозчинного осаду K_2HPO_4 . Дріжджовий екстракт- термолабільний, містить у своєму складі амінокислоти й пептиди, тому вимагає м'якшого режиму стерилізації для запобігання їх руйнуванню. Маніт

										ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
											45
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата							

також потребує менш жорстких умов, проте має бути стерилізований окремо від дріжджового екстракту.

Приготування й стерилізація солей композиції 5 відбувається один раз.

Загальний об'єм мікроелементного комплексу для всіх етапів процесу – 4 400 мл або 4,4 л. Після приготування у ємності розчин розливається по 2 колбах об'ємом 5 л. Заповненість колб – 2,2 л. Далі солі стерилізують в автоклаві за відповідним для композиції режимом.

Після стерилізації композиція 5 додається до решти поживного середовища на кожному етапі у необхідній кількості.

2.4.1.2 Вирощування культури в інокуляторі 0,005 м³

На даному етапі необхідно приготувати 3,15 л поживного середовища для посівного апарату об'ємом 0,005 м³.

Розрахуймо кількість води для розчинення компонентів усіх чотирьох композицій:

$$3,15 \text{ л} = 3150 \text{ мл}$$

$$\text{Солі мікроелементів} - 3,15 \text{ мл}$$

$$3150 \text{ мл} - 3,15 \text{ мл} = 3147 \text{ мл води.}$$

Розрахунок води для приготування маніту такий:

$$3147 - 500 - 500 - 500 = 1647. \text{ Округлимо значення до } 1650 \text{ мл.}$$

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						46
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Таблиця 2.4

Розрахунок компонентів поживного середовища для ферментера та інокуляторів на різних етапах підготовки посівного матеріалу

Компоненти середовища	Об'єм апаратів, м ³					
	-	колба	0,005	0,05	0,5	6,3
	Кількість поживного середовища, л					
	1000 мл	0,35	3,15	31,5	315	4050
		349,7*	3,147*	31,47*	314,7*	4 046 *
Кількість речовини, г						
Маніт	10,0	3,5	31,5	315	3 150	40 500
Дріжджовий екстракт	0,5	0,175	1,58	15,75	157,5	2050
K ₂ HPO ₄	0,3	0,105	0,95	9,45	94,5	1215
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	0,07	0,63	6,3	63	810
NaCl	0,1	0,035	0,315	3,15	31,5	405
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	0,0035	0,0315	0,315	3,15	40,5
CaCl ₂	0,02	0,007	0,0630	0,63	6,3	81
Мікроелементний комплекс, що включає:	1 мл/л					
H ₃ BO ₃ - 2,86 мг/л	Загальна кількість поживного середовища, л					
MnSO ₄ · 4H ₂ O - 1,81 мг/л	0,35	3,15	31,5	315	4050	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O - 0,22 мг/л	Об'єм мікроелементного комплексу для внесення, мл					
CuSO ₄ · 5H ₂ O - 0,025 мг/л	0,35	3,15	31,5	315	4050	
(NH ₄) ₂ MoO ₄ - 0,025 мг/л						
CoSO ₄ · 7H ₂ O - 0,025 мг/л	Всього: 4 400 мл					

Позначкою «*» помічено приблизний об'єм поживного середовища без урахування мікроелементного комплексу

Зм.

Аркуш

№ Документа

Підпис

Дата

ДБП.ПЗ.162.06

47

Аркуш

Розрахунок компонентів мікроелементного комплексу

Мікроелементний комплекс, що включає:	Кількість поживного середовища, мл	
	1000	4 400
	Кількість речовини, мг	
H ₃ BO ₃	2,86	12,58
MnSO ₄ · 4H ₂ O	1,81	7,96
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22	0,97
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,99
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,025	0,99
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,025	0,99

ДВП.ПЗ.162.06

Зм.

Аркуш

№ Документа

Підпис

Дата

Арку

48

Композиції 2,3 і 4 готують у колбах об'ємом 1 л. Для композиції 1 обирається колба об'ємом 3 л (табл. 2.6). Стерилізація відбувається в автоклаві.

Після стерилізації композицій середовища з загальним об'ємом 3,147 л додають мікроелементний комплекс у кількості 3,15 мл. Для стабілізації рН додається розчин NH_4OH до значення 7,0

Таблиця 2.6

Композиції поживного середовища	Кількість компонентів композицій, г	Приблизний об'єм води для розчинення, л	Об'єм ємності, л
1	31,5	1,65 л	3 л
2	1,32	500 мл	1 л
3	0,66	500 мл	1 л
4	1,58	500 мл	1 л

2.4.1.3. Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,05 м³

На цій стадії потрібно одержати 31,5 л поживного середовища для подальшого культивування бульбочкових бактерій в інокуляторі на 0,05 м³

Спершу дізнаймося кількість води для приготування середовища:

$$31,5 \text{ л} = 31\,500 \text{ мл}$$

Солі мікроелементів – 31,5 мл

$$31\,500 - 31,5 = 31,47 \text{ л води всього.}$$

Розрахуємо об'єм води для приготування маніту:

$$31,47 - 0,5 - 0,5 - 0,5 = 29,97 \text{ л.}$$

Таблиця 2.7

Композиції поживного середовища	Кількість компонентів композицій, г	Приблизний об'єм води для розчинення, л	Об'єм ємності, л
1	315	29,97л	40 л
2	13,23	500 мл	1 л
3	6,62	500 мл	1 л
4	15,75	500 мл	1 л

Композиції 2,3 і 4 готують й стерилізують у колбах об'ємом 1 л. Для маніту необхідно встановити реактор-змішувач на 40 л.(табл.2.7).

Наприкінці до 31,47 л поживного середовища додається 31,5 мл стерильних солей мікроелементів. Доводять показник рН до значення 7,0 за допомогою 25%-го розчину NH₄OH.

2.4.1.4. Вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 0,5 м3

На даному етапі необхідно приготувати 315 л поживного середовища для накопичення біомаси *Bradyrhizobium japonicum* М-8 для її внесення в подальшому у ферментер.

Кількість води для розчинення компонентів композицій:

$$315 \text{ л} = 315\,000 \text{ мл}$$

Солі мікроелементів – 315 мл

$$\text{Тоді об'єм води становить: } 315\,000 - 315 = 314\,690 \text{ мл.}$$

Для приготування маніту:

$$314,7 - 1 - 1 - 0,5 = 312,2 \text{ л}$$

Таблиця 2.8

Композиції поживного середовища	Кількість компонентів композицій, г	Приблизний об'єм води для розчинення, л	Об'єм ємності, л
1	3150	312,2	500
2	132,3	1	2
3	66,15	500 мл	1
4	157,5	1	2

Таким чином для композицій 2 і 4 обирають колби об'ємом 2 л. Композиція 3 проходить стерилізацію у колбі об'ємом 1л. Щоб приготувати й згодом

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						52
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

стерилізувати 312,3 л маніту з композиції 1 (табл.2.8), об'єм реактора-змішувача має складати 500 л.

Після закінчення стерилізації 314,69 л основних компонентів до середовища додається 315 мл мікроелементного комплексу. Доводять показник рН до значення 7,0 за допомогою 25%-го розчину NH_4OH .2.4.1.5. Вирощування культури в ферментері об'ємом 6,3 м³

Є заключним етапом підготовки поживного середовища. Для вирощування клітин *Bradyrhizobium japonicum* М-8, внесених з попереднього інокулятора об'ємом 0,5 м³, потрібно приготувати 4050 л середовища.

Розрахуймо кількість води для розчинення компонентів композицій:

$$4050 \text{ л} = 4\,050\,000 \text{ мл}$$

Солі мікроелементів – 4050 мл

Тоді об'єм води становить: $4\,050\,000 - 4050 = 4\,045\,950$ мл або 4046 л.

Таблиця 2.9

Композиції поживного середовища	Кількість компонентів композицій, г	Приблизний об'єм води для розчинення, л	Об'єм ємності, л
1	45 101,5	4 046	5 000

Таким чином для композицій 1,2,3 і 4 необхідно встановити реактор-змішувач об'ємом 5 000 л, де композиції приготуються (табл.2.9). Після цього - подаються до УБС, де відбуватиметься стерилізація поживного середовища.

Після цього до поживного середовища додається 4050 мл стерильного мікроелементного комплексу. Для доведення рН середовища до значення 7,0 додається 25%-ий розчин NH_4OH .

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

3.1 Таксономічний статус

Систематичне положення прокаріота згідно з класифікацією Берджі наступне:

Домен: *Bacteria*

Тип: *Pseudomonadota*

Клас: *Alphaproteobacteria*

Порядок: *Hyphomicrobiales*

Родина: *Bradyrhizobiaceae*

Рід: *Bradyrhizobium*

Вид: *Bradyrhizobium japonicum* [1].

3.2 Морфолого-культуральні властивості

Штам *Bradyrhizobium japonicum* М-8 є грамнегативним. Клітини мають паличковидну форму, розміри – 0,3×1,2 мкм. . Бактероїдні форми більші за розміром. Рухливі, за розташуванням джгутика – монотрихи.

Даний штам є повільнорослим, оскільки на поверхні агаризованих середовищ поява колоній спостерігається на 6-8 добу. Утворюють колонії молочно-білого кольору круглої форми до 1,5 мм у діаметрі. Опуклі, з блискучою поверхнею та рівним краєм, без пігментації. На поверхні агару навколо колоній може утворюватися райдужний ореол.

Bradyrhizobium japonicum М-8 стійкий за ознаками, є невірулентним для теплокровних [24].

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Харитонова			РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Грецький				Д	52	2
Н.Контр.						КНУТД, ББТ-19		
Затвердив								

3.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Є облигатним аеробом. Зростає за інтервалу температури 18-37 °С, температурний оптимум – 25-28 °С. Діапазон значень рН для росту – 4,5-8,5, оптимальна реакція середовища близька до нейтральної (рН = 6,5-7,5).

Штам активно засвоює глюкозу, маніт, мальтозу, галактозу, фруктозу. Активний розвиток – на агаризованих горохових середовищах з глюкозою у присутності сахарози, на середовищах з амонійними солями. Проте на тих, що містять органічний азот (МПА, пептон), росту не відбувається. Під час росту утворюють позаклітинний слиз полісахаридної природи [24].

Bradyrhizobium japonicum М-8 характерний широкою комплементарністю щодо утворення високоефективних симбіотичних систем з різними сортами *Gusnie hispida* Maxim[5]. Продукент належить до бульбочкових бактерій, особливістю яких є наявність ферменту нітрогенази, здатного відновлювати нітрати до аміаку та органічних нітрогенвмісних сполук за умов низької концентрації кисню, що забезпечує зв'язування атмосферного азоту у бульбочках коренів бобових рослин [16].

Бульбочкоутворення відбувається внаслідок активного поділу тканин кореня, інфікованих *Bradyrhizobium japonicum* М-8 під дією под-факторів – сигнальних молекул бактерій, синтезованих у відповідь на флавоноїди рослини [16]. Таким чином в результаті симбіотичної взаємодії рослина забезпечує мікроорганізм оптимальними умовами росту й поживними речовинами-продуктами фотосинтезу, а бактерії у складі бульбочок постачають доступні форми азоту макросимбіонту [6].

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						53
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1 Поетапна блок-схема технології

Технологічна схема у вигляді послідовних стадій виробництва «Ризобактерину» наведена графічно у форматі А1.

4.2 Опис технологічної схеми

Технологічна схема являє собою послідовність, комплекс заходів, необхідних для належного проходження всіх етапів виробничого процесу з метою одержання продукції, що відповідає стандартам якості та безпеки. Процес отримання бактеріального препарату для обробки насіння сої на основі штаму *Bradyrhizobium japonicum M-8* включає допоміжні роботи, технологічний процес, пакування маркування відвантаження та знешкодження відходів.

Технологічну схему отримання даного бактеріального препарату наведено у графічній частині проекту на аркуші формату А3 (додається).

Допоміжні роботи – це початковий крок нашого виробництва. Він містить усі підготовчі процеси, необхідні для нормального перебігу власне технологічних процесів, найважливіших у виробництві, та виключення ризиків, пов'язаних з виробничим процесом.

ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

ДР.1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

ДР 1.1.2. Медичний огляд

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Харитонова			РОЗДІЛ 4. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Грецький				Д	54	19
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

ДР 1.1.3. Підготовка одягу

ДР 1.1.3.1 Пересортування одягу

ДР 1.1.3.2 Прання й сушіння

ДР.1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР.1.2.1. Підготовка мийних засобів

ДР 1.2.1.1 Підготовка мийних засобів для поверхонь

ДР 1.2.1.2 Підготовка мийних засобів для обладнання й комунікацій

ДР.1.2.2. Підготовка дезінфікуючих засобів

ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

ДР.1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР.1.3.1. Щоденне прибирання

ДР.1.3.2. Генеральне прибирання

ДР.1.4. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР.1.4.1. Технічний огляд

ДР.1.4.2 Миття апаратів

ДР.1.4.3 Ополіскування апаратів

ДР.1.3.4. Перевірка на герметичність

ДР.1.3.5. Стерилізація обладнання

ДР.2. Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

ДР 2.3. Стиснення повітря

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

ДР 2.5. Нагрівання повітря

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

ДР.3. Підготовка титрувальних розчинів для поживного середовища

ДР 3.1 Приготування розчину гідроксиду натрію для підлужнення середовища

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						55
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР.4. Підготовка та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1 Приготування та стерилізація солей мікроелементів

ДР 4.2. Приготування та стерилізація середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

ДР 4.2.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 4.2.2. Підготовка та стерилізація композиції 2.

ДР 4.2.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ДР 4.2.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

ДР 4.2.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

ДР 4.3. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,005 м³

ДР 4.3.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 4.3.2. Підготовка та стерилізація композиції 2.

ДР 4.3.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ДР 4.3.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

ДР 4.3.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

ДР 4.4. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,05 м³

ДР 4.4.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 4.4.2. Підготовка та стерилізація композиції 2.

ДР 4.4.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ДР 4.4.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

ДР 4.4.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

ДР 4.5. Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,5 м³

ДР 4.5.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

ДР 4.5.2. Підготовка та стерилізація композиції 2.

ДР 4.5.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

ДР 4.5.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

ДР 4.5.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						56
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

ДР 4.6. Приготування і стерилізація середовища для вирощування культури в ферментері об'ємом 6,3 м³

ДР 4.6.1. Підготовка композиції 1

ДР 4.6.2. Стерилізація композиції 1 в УБС-5 і поєднання компонентів поживного середовища

ТП.5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

ТП 5.2. Отримання робочої культури

ТП 5.3. Вирощування культури в колбах на качалках.

ТП 5.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,005 м³

ТП 5.5. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,05 м³

ТП 5.6. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,5 м³

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м³

ТП 7. Зберігання культуральної рідини

ТП 7.1. Зберігання культуральної рідини

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів

ЗВ 8.2. Знешкодження газоподібних відходів

Перший етап допоміжних робіт – санітарна підготовка виробництва. Головна його мета - забезпечення якнайменшої кількості контамінантів для кожного виконавця виробничого процесу.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Навчання персоналу

Перед тим, як допустити персонал до виконання робіт на підприємстві, для нього якісно проводиться інструктаж з правил техніки безпеки на виробництві, при роботі з обладнанням, мікроорганізмами тощо. Персонал обов'язково ознайомлюють з основами гігієни, санітарії та принципами GMP. Засвоєння

									ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
										57
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата						

матеріалу оцінюють контролем знань.

ДР 1.1.2 Медичний огляд

Як для запобігання поширення збудників захворювань, так і для попередження контамінації на виробничих етапах працівники попередньо проходять медичний огляд. Якщо стан здоров'я задовільний, персонал стає до роботи.

ДР 1.1.3 Підготовка одягу

ДР 1.1.3.1 Пересортування одягу

Для забезпечення задовільного санітарного стану технологічного одягу працівників спочатку проводиться його пересортування, де відбувається перевірка на цілісність.

ДР 1.1.3.2 Прання й сушіння

Далі одяг відправляють на прання з порошком при $t = 80 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 1,5 год. Тривалість сушіння – 2 год, $t = 120 \text{ }^\circ\text{C}$. Відпрацьована вода надходить до ЗВ 8.1. на нейтралізацію. Чистий підготовлений одяг видається працівникам перед кожною зміною.

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних засобів

ДР 1.2.1. Підготовка мийних засобів

ДР 1.2.1.1 Підготовка мийних засобів для поверхонь

Для миття поверхонь обирається порошкоподібний засіб «Біонол». Готують робочі розчини різних концентрацій. Для приготування 1% розчину необхідно 10 г засобу й 990 мл води. Для 3%-го - 30 г засобу й 970 мл води відповідно. Готові розчини надходять до ДР 1.3.1 ($C = 1\%$) та ДР 1.3.2 ($C = 3\%$).

ДР 1.2.1.2 Підготовка мийних засобів для обладнання й комунікацій

Використовується 1%-ий розчин каустичної соди (їдкого натру). Розчин готують, змішуючи NaOH зі складу та воду питну у збірнику, $t = 25^\circ\text{C}$.

ДР 1.2.2 Підготовка дезінфікуючих засобів

Для дезінфекції приміщень готують робочі розчини «Полідезу» різних концентрацій - 1,0% та 5,0% . Щоб одержати 1,0%, беруть 10 мл засобу й 990 мл води, $t = 30\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$. Концентрацію 5,0% отримують змішуючи 50 г засобу з 950 мл

									Аркуш
									58
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					

води. Приготовані розчини дезінфікуючих засобів надходять до ДР 1.3.1(C=1%) і ДР 1.3.2 (C=5%).

ДР.1.2.3. Підготовка дезінфікуючих засобів для персоналу

Для обробки рук персоналу застосовується готовий спиртовмісний засіб «Манорм».

ДР.1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР.1.3.1.Щоденне прибирання

Здійснюють вологе прибирання. Поверхні, підлога, стіни, зовнішні частини обладнання та устаткування обробляють 1% розчином «Біонолу» з ДР 1.2.1.1. Після цього проводять дезінфекцію з використанням 1,0% розчину «Полідезу» від ДР.1.2.2.

ДР.1.3.2 Генеральне прибирання

Проводиться раз на тиждень. Для генерального прибирання приміщень та апаратури застосовують більш концентровані розчини засобів, а саме «Біонол» (3%) від ДР 1.2.1.1. та «Полідез» (5%) від ДР 1.2.2.

ДР.1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР.1.4.1 Технічний огляд

Перед використанням апаратуру уважно оглядають. Якщо не порушена її цілісність, переходять до етапу ДР 1.4.2.

ДР.1.4.2 Миття апаратів

Внутрішні частини апаратури мють при $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ розчином каустичної соди (1%) від ДР.1.2.1.2, що подається по трубопроводу. Розчин, що було застосовано, відправляється до ЗВ 8.1.

ДР.1.4.3. Ополіскування апаратів

Після миття обладнання й комунікації ополіскують очищеною водою протягом 5 хв. Використана вода надходить до ЗВ 8.1.

ДР.1.4.4. Перевірка на герметичність

Щоб запобігти потраплянню мікроорганізмів-контамінантів з навколишнього середовища у апарат, необхідно попередньо провести ретельну перевірку його складових, елементів з'єднань трубопроводів на герметичність.

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						59
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Для цього до апаратів подається повітря під тиском 0,2 МПа, утримується протягом 1 год. Якщо показник тиску на манометрі незмінний –апарат герметичний. Конденсат, що утворився, вилучається до ЗВ 8.1.

Фланцеві з'єднання й ущільнення кришок ємкісного обладнання обробляють розчином господарського мила. За наявністю чи відсутністю бульбашок повітря визначають щільність і надійність.

ДР.1.4.5. Стерилізація обладнання

Забезпечення умов асептики перед початком технологічного процесу досягають стерилізацією апаратів й комунікацій. Ферментаційне та інше обладнання стерилізують насиченою гострою парою протягом 1,5 год при $t = 120\text{ }^\circ\text{C}$ під тиском 0,2 МПа. Утворений конденсат вилучається до ЗВ 8.1.

ДР.2. Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через шахти, що розташовані на висоті 10 м від найвищої точки будівлі у найбільш чистих ділянках підприємства.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Перший етап очистки - проходження повітря через фільтр грубого (попереднього) очищення. На волокнистих матеріалах затримуються частки пилу й бруду розміром 5-10 мкм. Ефективність очистки – до 80%.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Після надходження до компресора повітря стискається до 0,2 МПа для забезпечення необхідного для технологічних вимог тиску. Стискання супроводжується нагріванням повітря до 100-120 $^\circ\text{C}$.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Розігріте повітря від ДР 2.3. надходить до теплообмінника-холодильника, де охолоджується водою до температури 28-30 $^\circ\text{C}$. Вирівнювання тиску повітря й видалення конденсату, утвореного після охолодження, відбувається у ресивері. Вологість повітря на виході – приблизно 65%. Конденсат надходить до ЗВ 8.1.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Для остаточного видалення крапельної вологи повітря нагрівається у

					ДБП.ПЗ.162.06		Аркуш
							60
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			

теплообміннику до температури 50 С. Утворений конденсат надходить до ЗВ 8.1.

ДР 2.6. Очищення повітря в головному фільтрі

У головному повітряному колекторі стиснуте аераційне повітря спершу очищується у головному (набивному) фільтрі від часток розміром 1- 1,5 мкм. Ефективність очищення – приблизно до 98 %.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Фінальна стадія стерилізації повітря відбувається на індивідуальному фільтрі, що встановлюють перед входом у посівний апарат чи ферментер. Проходячи через надтонке волокно, повітря очищується до 99,999 %. Стерильне повітря подається до ТП 5.4, ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1.

ДР.3. Підготовка титрувального розчину для поживного середовища

ДР.3.1. Приготування розчину NH₄OH для підлужнення середовища

Культивування *Bradyrhizobium japonicum* М-8 вимагає додавання розчину для стабілізації значення рН в межах 6,5-7,5, оскільки метаболіти, що продукує даний штам при зростанні, підкислюють поживне середовище. Оптимальним титрувальним розчином є 25%-ий NH₄OH.

Для підвищення значення рН на 1 одиницю витрати розчину складають 300-1000 мл на 1 т середовища. Прийmemo 800 мл як середнє значення. У даному виробництві для контролю рН загального об'єму поживного середовища (4 400 л) необхідно виготовити всього 3 520 мл титрувального розчину.

Для приготування 25%-го розчину зі складу беруть NH₄OH та на технічних вагах зважують 880 г речовини. Наважку вносять до колби, додають 2 640 мл дистильованої води та закривають колбу пробкою. Готовий титрувальний розчин надходить до ТП 5.4, ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 6.1.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1 Підготовка та стерилізація солей мікроелементів

До складу поживного середовища для культивування *Bradyrhizobium japonicum* М-8 входить також мікроелементний комплекс, що вноситься у перерахунку 1 мл на 1 л середовища (табл). Солі мікроелементного комплексу готуються як окрема композиція. Загальна необхідна кількість – 4 400 мл або 4,4

								ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					61

л.

На електронних вагах відміряються наважки кожної зі складових композиції. Реактиви змішують у ємності з 4,4 л дистильованої води, після чого розчин розливають по 2 колбах об'ємом 5 л. Заповнюють колби до відмітки 2,2 л. Колби закривають ватно-марлевими пробками й стерилізують в автоклаві при 1,5 атм, 131 °С, 20 хв. Стерильний мікроелементний комплекс подається до ДР 4.2.5, ДР 4.3.5, ДР 4.4.5, ДР 4.5.5, ТП 4.6.2.

ДР 4.2 Приготування та стерилізація середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Підготовка 0,035 л рідкого інокулянту на качалочних колбах потребує 0,35 л поживного середовища. Вміст компонентів для даної стадії наступний (табл 4.1.)

Таблиця 4.1

Розрахунок компонентів поживного середовища для вирощування інокулянту у колбах

Компонет	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0,35 л середовища,г	Композиція	Об'єм композиції, л	Об'єм ємності для приготування, л
Маніт	10,0	3,5	1	0,11	0,5
Вода	-	110 мл			
Дріжджовий екстракт	0,5	0,175	4	0,08	0,25
Вода	-	80			
K ₂ HPO ₄	0,3	0,105	2	0,08	0,25
NaCl	0,1	0,035			
CaCl ₂	0,02	0,007			
Вода	-	80			
MgSO ₄ ·	0,2	0,07	3	0,08	0,25

Аркуш

ДБП.ПЗ.162.06

62

Зм. Аркуш № Документа Підпис Дата

7H2O					
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	0,0035			
Вода	-	80			

ДР 4.2.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах необхідно зважити 3,5 г маніту, засипати компонент у колбу об'ємом 500 мл, додати 110 мл дистильованої води й ретельно перемішати. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою й відправляють до автоклаву. Режим стерилізації композиції : 1 атм, 121°C, 20 хв.

ДР 4.2.2. Підготовка та стерилізація композиції 2.

За допомогою електронних ваг готують наважки таких компонентів: K₂HPO₄ (0,105 г), NaCl (0,035 г) ,CaCl₂ (0,007 г). Зважені компоненти засипають в колбу об'ємом 250 мл, після чого додають 80 мл дистильованої води й закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C й тиску 1,5 атм протягом 50 хв.

ДР 4.2.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

Зважують на електронних вагах 0,07 г MgSO₄ x 7H₂O й 0,0035 г FeSO₄ x 7H₂O. Вносять до колби об'ємом 250 мл, додають 80 мл дистильованої води й закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Поміщають в автоклав та стерилізують протягом 40 хв при тиску 1,5 атм, температурі 131 °С.

ДР 4.2.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

На електронних вагах зважують 0,175 г дріжджового екстракту, вносять до колби наважку й 80 мл дистильованої води. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою й стерилізують в автоклаві при температурі 112°C, тиску 0,75 атм протягом 30хв.

ДР 4.2.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

Після стерилізації композиції 1,2,3 й 4 в зоні полум'я пальника в умовах стерильності вносять до колби об'ємом 750 мл. З колби з попередньо

										ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата							63

стерилізованим мікроелементним комплексом стерильно відміряють 0,35 мл й вносять до решти компонентів поживного середовища. Готове поживне середовище розливають стерильно по 4 колбах об'ємом 750 мл, вносячи при цьому по 100 мл середовища. Колби в зоні стерильності закривають ватно-марлевою пробкою. Додаванням 25%-го розчину NH₄OH стабілізують показник рН до значення 7,0. Поживне середовище готове для внесення посівного матеріалу і його культивування на качалках.

ДР 4.3 Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,005 м³

Для підготовки інокулянту в посівному апараті об'ємом 0,005 м³ необхідно попередньо приготувати 3,15 л поживного середовища. Вміст компонентів для даної стадії наступний (табл.4.2):

Таблиця 4.2

Розрахунок компонентів поживного середовища для інокулятора об'ємом 0,005 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація , г/л	Вміст компонента у 3,15 л середовища , Г	Композиція	Об'єм композиції , л	Об'єм ємності для приготування , л
Маніт	10,0	31,5	1	1,65	3
Вода	-	1 650 мл			
Дріжджовий екстракт	0,5	1,58	4	0,5	1
Вода	-	500 мл			
K ₂ HPO ₄	0,3	0,95	2	0,5	1
NaCl	0,1	0,315			
CaCl ₂	0,02	0,0630			

Вода	-	500 мл			
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	0,63	3	0,5	1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	0,0315			
Вода	-	500 мл			

ДР 4.3.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 31,5 г маніту, вносять у колбу об'ємом 3000 мл, додають 1650 мл дистильованої води й ретельно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою й відправляють до автоклаву, де стерилізують при 1 атм, 121°C, протягом 20 хв.

ДР 4.3.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах зважують 0,95 г K₂HPO₄, 0,315 г NaCl, 0,0630 г CaCl₂. Після чого вносять у колбу об'ємом 1000 мл й додають туди 500 мл дистильованої води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують при температурі 131 °C упродовж 50 хв у автоклаві. Тиск -1,5 атм.

ДР 4.3.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

Зважують на електронних вагах 0,63 г MgSO₄ x 7H₂O й 0,0315 г FeSO₄ x 7H₂O. Вносять до колби об'ємом 1 000 мл, додають 500 мл дистильованої води й закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Поміщають в автоклав та стерилізують протягом 40 хв при тиску 1,5 атм, температурі 131 °C.

ДР 4.3.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

1,58 г дріжджового екстракту зважують на електронних вагах, вносять у колбу об'ємом 500 мл. Вносять дистильовану воду, перемішують та закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Після цього стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C упродовж

30 хв при тиску 0,75 атм.

ДР 4.3.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

Після закінчення стерилізації 1 647 мл композиції 1, 500 мл композицій 2, 3 і 4 подають до інокулятора. Додають 3,15 мл складових композицій 5 стерильних солей мікроелементів. Додають 25%-ий розчин NH_4OH , стабілізуючи значення рН до 7,0. Поживне середовище для внесення інокулянту готове.

ДР 4.4 Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,05 м³

Для внесення й подальшого культивування 3,5 л інокулянту в посівний апарат об'ємом 0,05 м³, потрібно приготувати 31,5 л поживного середовища. Вміст компонентів для даної стадії наступний (табл 4.3.):

Таблиця 4.3

Розрахунок компонентів поживного середовища для інокулятора об'ємом 0,05 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 3,15 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л	Об'ємності для приготування, л
Маніт	10,0	315	1	29,9	40
Вода	-	29,97 мл			
Дріжджовий екстракт	0,5	15,75	4	0,5	1
Вода	-	500 мл			
K_2HPO_4	0,3	9,45	2	0,5	1
NaCl	0,1	3,15			
CaCl_2	0,02	0,63			
Вода	-	500 мл			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	6,3	3	0,5	1

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	0,315			
Вода	-	500 мл			

ДР 4.4.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На електронних вагах зважують 315 г маніту й вносять у реактор -змішувач об'ємом 40 л. До реактора подається 29 970 мл дистильованої води. Для кращого розчинення маніту встановлюють режим перемішування з кількістю обертів 100 - 150 об/хв до повного розчинення. Після цього розчин самоплином подають в посівний апарат, де стерилізують при температурі 121°C , тиску 1 атм, протягом 20 хв.

ДР 4.4.2. Підготовка та стерилізація композиції 2

На електронних вагах відміряють 9,45 г K₂HPO₄, 3,15 г NaCl, 0,63 г CaCl₂, вносять до колби об'ємом 1000 мл. Також вносять 500 мл дистильованої води й перемішують компоненти. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою , відправляють на стерилізацію при температурі 131 °C упродовж 50 хв у автоклаві при тиску 1,5 атм.

ДР 4.4.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

6,3 г MgSO₄ x 7H₂O й 0,315 г FeSO₄ x 7H₂O зважують на електронних вагах. Вносять наважки до колби об'ємом 1 000 мл, додають 500 мл дистильованої води, перемішують компоненти й закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Поміщають в автоклав та стерилізують протягом 40 хв при тиску 1,5 атм, температурі 131 °C.

ДР 4.4.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

За допомогою електронних ваг відміряють 15,75 г дріжджового екстракту, вносять до колби об'ємом 1000 мл. Додають 500 мл дистильованої води й перемішують. стерилізують в автоклаві при температурі 112 °C упродовж 30 хв при тиску 0,75 атм.

ДР 4.4.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

До посівного апарату об'ємом 0,05 м³ , де вже міститься 29 970 мл стерильного розчину маніту, вносять по 500 мл простерилізованих у автоклаві

						ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
							67
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			

композиції 2,3 і 4. Наостанок до 31,47 л поживного середовища додається 31,5 мл стерильних солей мікроелементів. Додають 25%-ий розчин NH_4OH до значення рН 7,0. Поживне середовище готове.

ДР 4.5 Приготування і стерилізація середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,5 м³

Необхідно приготувати 315 л поживного середовища для вирощування інокулянту і його подальшого внесення у ферментер. Вміст компонентів для даної стадії наступний (табл 4.4.):

Таблиця 4.4

Розрахунок компонентів поживного середовища для інокулятора об'ємом 0,5 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 315 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л	Об'єм ємності для приготування, л
Маніт	10,0	3 150	1	312 ,2	500
Вода	-	312 200 мл			
Дріжджовий екстракт	0,5	157,5	4	1	2
Вода	-	1 000 мл			
K_2HPO_4	0,3	94,5	2	1	2
NaCl	0,1	31,5			
CaCl_2	0,02	6,3			
Вода	-	1 000 мл			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	63	3	500	1 000

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						68
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	3,15			
Вода	-	500 мл			

ДР 4.5.1. Підготовка та стерилізація композиції 1

На технічних вагах зважують 3 150 г маніту та вносять до реактора-змішувача об'ємом 500 л. У реактор подають 312,2 л дистильованої води, після чого відбувається перемішування до повного розчинення маніту. Утворений розчин подається до посівного апарату об'ємом 0,5 м³, де стерилізується при температурі 121°C, тиску 1 атм, протягом 20 хв.

ДР 4.5.2. Підготовка та стерилізація композиції 2.

На електронних вагах відміряють 94,5 г K₂HPO₄, 31,5 г NaCl, 6,3 г CaCl₂, вносять до колби об'ємом 2000 мл. Додають 1000 мл дистильованої води й перемішують усі компоненти. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою, та стерилізують в автоклаві упродовж 50 хв при тиску 1,5 атм та температурі 131 °С.

ДР 4.5.3. Підготовка та стерилізація композиції 3

Зважують на електронних вагах 63 г MgSO₄ · 7H₂O й 3,15 г FeSO₄ · 7H₂O. Вносять наважки до колби об'ємом 1 000 мл, додають 500 мл дистильованої води, перемішують компоненти й закривають колбу ватно-марлевою пробкою. Поміщають в автоклав та стерилізують протягом 40 хв при тиску 1,5 атм, температурі 131 °С.

ДР 4.5.4. Підготовка та стерилізація композиції 4

На електронних вагах відміряють 157,5 г дріжджового екстракту й вносять до колби об'ємом 2000 мл. Додають 1000 мл дистильованої води й перемішують. Стерилізують в автоклаві при тиску 0,75 атм., температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 4.5.5. Поєднання стерильних композицій поживного середовища

До інокулятора об'ємом 0,5 м³, що містить 312,3 л стерильного розчину маніту, вносять 500 мл стерильної композиції 3 й по 1000 мл композицій 2,4.

										ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
											69
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата							

Наприкінці до 314,69 л поживного середовища додають 315 мл стерильного мікроелементного комплексу. Додаванням 25%-го розчину NH_4OH стабілізують показник рН до значення 7,0. Поживне середовище готове.

ДР 4.6 Приготування і стерилізація середовища для вирощування культури в ферментері об'ємом 6,3 м³

На заключній стадії підготовки посівного матеріалу необхідно приготувати 4 050 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування середовища наведено в табл. 4.5.

Таблиця 4.5.

Розрахунок компонентів поживного середовища для ферментатора об'ємом 6,3 м³

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 4 050 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л	Об'єм ємності для приготування, л
Маніт	10,0	40 500	1	4 046	5 000
Дріжджовий екстракт	0,5	2050			
K_2HPO_4	0,3	1215			
NaCl	0,1	405			
CaCl_2	0,02	81			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	810			
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	40,5			

ДР 4.6.1. Підготовка ькомпозиції 1

За допомогою об'ємно-вагового дозатора у реактор-змішувач вносять 40 500 г маніту, 2050 г дріжджового екстракту, 1215 г K_2HPO_4 , 405 г $NaCl$, 81 г $CaCl_2$, 810 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ і 40,5 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Після цього додають 4 046 л дистильованої води, подають гарячу пару в сорочку реактора (до температури розчину $40\text{ }^\circ C$), вмикають перемішуючий пристрій з кількістю обертів 100 - 150 об/хв до повного розчинення компонентів.

ДР 4.6.2. Стерилізація композиції 1 в УБС-5 і поєднання компонентів поживного середовища

Готова композиція подається відцентровим насосом до УБС-5 , у якому проходить стерилізацію гострою парою упродовж 5-7 хвилин за температури $135\text{ }^\circ C$. Після завершення стерилізації охолоджене поживне середовище надходить до ферментатора, де до нього стерильно додають 4050 мл мікроелементного комплексу. Поживне середовище готове для внесення посівного матеріалу.

Після завершення допоміжних робіт починається основна стадія біотехнологічного виробництв, технологічні процеси, що включають в себе підготовку посівного матеріалу й біосинтез.

ТП.5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Музейну колекційну культуру *Bradyrhizobium japonicum* М-8 зберігають у пробірках зі скошеним твердим агаризованим середовищем «Ісварана» за температури $3-5\text{ }^\circ C$. Культуру кожні 6 місяці пересівають в асептичних умовах.

ТП 5.2 Отримання робочої культури

Для використання штаму у подальшій роботі необхідно спершу отримати ізольовані колонії. Для цього стерильно здійснюють пересів музейної культури з пробірок зі скошеним середовищем на чашки Петрі і вирощують згодом у термостаті 72 год при температурі $28\text{ }^\circ C$. Готова робоча культура передається до ТП 5.3.

ТП 5.3 Вирощування культури в колбах на качалках

Щоб одержати суспензію клітин, до пробірки асептично вносять 35 мл

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						71
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

фізіологічного розчину. Бактеріальною петлею вносять до пробірки робочу музейну культуру *Bradyrhizobium japonicum* М-8, одержану від ТП 5.2. Суспендують клітини, піпеткою відбирають отриману бактеріальну суспензію і переносять у колби з поживним середовищем, одержаним від ДР. Вирощення культури здійснюють у колбах на качалці при частоті обертів 220 об/хв протягом 72 години при температурі 28 °С.

ТП 5.4 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,005 м3

В інокулятор об'ємом 0,005 м3 з середовищем, що було отримано від ДР 4.3.5, подають стерильне аераційне повітря від ДР 2.7 й через засівну колбу вносять посівний матеріал від ТП 5.3.

Культивують при температурі 28 °С, рН 6,5-7,5. Швидкість перемішування – 220 об/хв. Тривалість культивування – 72 год.

ТП 5.5 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,05 м3

До інокулятора об'ємом 0,05 м3, що містить поживне середовище, отримане від ДР 4.4.5, подають очищене повітря від ДР 2.7, вирощений посівний матеріал через трубу перетискування від ТП 5.4.

Культивують при температурі 28 °С, рН 6,5-7,5. Швидкість перемішування – 220 об/хв. Тривалість культивування – 72 год.

ТП 5.6 Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 0,5 м3

До поживного середовища, отриманого від ДР 4.5.5, що міститься в інокуляторі об'ємом 0,5 м3, подають стерильне повітря від ДР 2.7, вирощений посівний матеріал через трубу перетискування від ТП 5.5

Культивують при температурі 28 °С, рН 6,5-7,5. Швидкість перемішування – 220 об/хв. Тривалість культивування – 72 год.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м3

До ферментера об'ємом 6,3 м3 з УБС-5 надходить стерильне поживне середовище від ДР 4.6.. Далі через трубу перетискання подають посівний матеріал від ТП 5.6.

Проводять культивування протягом 72 год при температурі 28 °С, рН 6,5-

									Аркуш
									72
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата					

7,5. Швидкість перемішування – 220 об/хв.

ТП 7. Зберігання культуральної рідини

ТП 7.1. Зберігання культуральної рідини

Через насос культуральну рідину від ТП 6.1.подають до збірника, де вона зберігатиметься за кімнатної температури до початку стадій виділення й очищення продукту.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів

Залишки титрувального розчину (від ДР 3.1) та промивну воду (від ДР 1.1.3.2, ДР 1.4.2., ДР 1.4.3., ДР 1.4.5, ДР 2.4, ДР 2.5) утилізують, направляючи до очисних споруд.

ЗВ 8.2. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря, яке надходить від інокуляторів (ТП 5.4.,ТП 5.5.,ТП 5.6.) й ферментера (від ТП 6.1.) відправляють через трубопроводи у системи очищення повітряних відходів.

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						73
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

5.1 Методики контролю на стадії біосинтезу

Контроль якості біотехнологічної продукції передбачає контроль якості готового препарату та усіх стадій виробничого процесу відповідно до чинної нормативно- правової документації, державних й міжнародних стандартів.

Перед здійсненням технологічного процесу проводиться ретельна перевірка усіх контрольних точок допоміжних робіт, що включає в себе перевірку об'єктів та показників на етапах санітарної підготовки виробництва, підготовки й стерилізації атмосферного повітря, підготовки титрувальних розчинів, підготовки й стерилізації поживного середовища та їх відповідність нормативним показникам.

Згідно з принципом НАССР, процес отримання біопрепарату на основі *Bradyrhizobium japonicum* М-8 включає наступні методики контролю на етапі біосинтезу (табл. 5.1)

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Розробив	Харитонова					Д	74	10
Перевірив	Грецький							
Н.Контр.								
Затвердив								
						КНУТД, ББТ-19		

Методики контролю якості препарату на стадії біосинтезу

Назва стадії, що включена до контролю біосинтезу	Контрольна точка	Об'єкт/ показник, що перевіряється	Методи контролю	Нормативний показник
1	2	3	4	5
ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій	КТ 1.4.4	Герметичність обладнання	Візуально, манометр, годинник	Відсутність бульбашок повітря на фланцевих з'єднаннях й ущільненнях кришок, показник манометра- незмінний (0,2 МПа протягом 1 год)
ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій	КТ, Км 1.4.5	Режим стерилізації обладнання (час, тиск, температура)	Візуально, термометр, манометр, годинник	T=1,5 год, t=120 °C, P= 0,2 МПа

ДБП.ПЗ.162.06

Зм.

Архив

№ Документа

Підпис

Дата

Архив

75

Продовження таблиці 5.1

Назва стадії, що включена до контролю біосинтезу	Контрольна точка	Об'єкт/ показник, що перевіряється	Методи контролю	Нормативний показник
1	2	3	4	5
ДР 2 Підготовка та стерилізація аераційного повітря	Кт 2.3	Тиск, температура	Манометр, термометр	P=0,2 МПа, t=100-120 °С
	Кт 2.5	Температура, вологість	Термометр	t=50 °С, відсутність крапельної вологи
	Кт, Км 2.7	Мікробіологічна чистота, ступінь очистки	Мікроскопіювання, седиментаційний метод	КУО/м3= <1 (99,999%)

ДБП.ПЗ.162.06

Зм.

Аркуш

№ Документа

Підпис

Дата

Арх

Продовження таблиці 5.1

Назва стадії, що включена до контролю біосинтезу	Контрольна точка	Об'єкт/ показник, що перевіряється	Методи контролю	Нормативний показник
1	2	3	4	5
ДР 3 Підготовка титрувального розчину для поживного середовища	Кт , Кх 3.1	Концентрація	Методи аналітичної хімії	C=25%
ДР 4 Приготування та стерилізація поживних середовищ	Кт, Км 4.6.2	Дозування компонентів середовища	Мірний посуд	Відповідно до технології
		Мікробіологічна чистота	Мікроскопіювання	Відсутність контамінуючої мікрофлори
		Показник рН	Датчик рН, візуально	рН=7,0

ДБП.ПЗ.162.06

Зм.
Аркулш
№ Документа
Підпис
Дата

Арку

Продовження таблиці 5.1

Назва стадії, що включена до контролю біосинтезу	Контрольна точка	Об'єкт/ показник, що перевіряється	Методи контролю	Нормативний показник
1	2	3	4	5
ТП 5 Підготовка посівного матеріалу	Кт, Км, Кх 5.6	Мікробіологічна чистота	Мікроскопіювання	Відсутність контамінуючої мікрофлори
		Біологічний агент	Морфолого-фізіологічні показники	Паличковидна форма клітин,грамнегативні, розміри клітин - 0,3×1,2 мкм, розміри колоній - до 1,5 мм у діаметрі. Колонії круглі, молочно-білого кольору, поява колоній – 6-8 доба. Опуклі, блискучі, з рівним краєм, пігментація відсутня. Можлива наявність райдужного

ДБП.ПЗ.162.06

Зм.
Аркулш
№ Документа
Підпис
Дата

Арку

Продовження таблиці 5.1

Назва стадії, що включена до контролю біосинтезу	Контрольна точка	Об'єкт/ показник, що перевіряється	Методи контролю	Нормативний показник
1	2	3	4	5
				ореолу навколо колоній
		Температура культивування	Термометр	28°C
		Тривалість культивування	Годинник	72 год
		Показник рН	Датчик рН, візуально	рН=7,0
		Режим перемішування	Візуально	220 об/хв

Зм.
Аркулш
№ Документа
Підпис
Дата

ДБП.ПЗ.162.06

Арку

Назва стадії, що включена до контролю біосинтезу	Контрольна точка	Об'єкт/ показник, що перевіряється	Методи контролю	Нормативний показник
1	2	3	4	5
ТП 6 Виробничий біосинтез	Кт, Км, Кх 6.1	Мікробіологічна чистота	Мікроскопіювання	Відсутність контамінуючої мікрофлори
		Температура культивування	Термометр	28°C
		Тривалість культивування	Годинник	72 год
		Показник рН	Датчик рН, візуально	рН=7,0
		Режим переміщення	Візуально	220 об/хв
		Титр мікроорганізмів	Мікроскопіювання, візуально	2,3 x10 ⁹ КУО на 1

ДБП.ПЗ.162.06

Зм.	
Аркулш	
№ Документа	
Підпис	
Дата	
Арху	

5.2 Контроль якості біологічного препарату «Ризобактрин»

Після здійснення технологічного процесу одержана продукція підлягає обов'язковому контролю за її органолептичними, фізичними й біологічними показниками для встановлення відповідності з вимогами стандартів якості. Перевірена й сертифікована відповідними органами продукція може надходити до споживача. Методи контролю препарату «Ризобактерин» наведено у таблиці 5.2. [5]

Таблиця 5.2

Методи контролю препарату «Ризобактерин»

Об'єкт / показник, що контролюється	Методики контролю	Нормативний показник
1	2	3
Склад препарату	Мікробіологічний (мікроскопіювання)	Живі клітини бактерій штам <i>Bradyrhizobium japonicum</i> М-8
	Хроматографічні, спектральні методи	Продукти метаболізму <i>Bradyrhizobium japonicum</i> М-8 (вітаміни, фітогормони ауксинового, гіберелінового й цитокінінового рядів, амінокислоти).
Титр мікроорганізмів	Мікробіологічний (мікроскопіювання), візуально	Не менше $2,3 \times 10^9$ КУО на 1 г
Препаративна форма (агрегатний стан, колір)	Візуально	Порошкоподібна, на основі торфу, темно-коричневого кольору
Кислотність	рН-метр, візуально	рН = 6,0

Продовження таблиці 5.2

Об'єкт / показник, що контролюється	Методики контролю	Нормативний показник
1	2	3
Вміст вологи	Аналітичні методи	6%
Термін придатності	Аналітичні методи, експериментальні	6 місяців з дати виробництва
Умови зберігання	Аналітичні методи, експериментальні	Зберігати за t° від +2 до +6°C в сухому, захищеному від прямих сонячних променів місці.
Токсичність	Хіміко-токсикологічний аналіз	Нетоксичний для людини і довкілля, ґрунтів.
Тара	Візуально	Поліетиленові пакети
Фасування	Зважування	2 кг

5.3 Контроль ефективності препарату

Окрім вищезазначених у табл показників також перевіряється ефективність дії «Ризогуміну» на цільовій культурі рослин (табл. 5.3)

Таблиця 5.3

Ефективність «Ризобактерину»

Об'єкт / показник, що контролюється	Методи контролю	Нормативний показник
1	2	3
Азотфіксувальна активність	Ацетиленовий метод (хроматографічний)	4,66 мкМоль C ₂ H ₂ / (рослину *год)
Урожайність насіння сої	Полевого дослід, статистичні	Приріст на 1,125 т/га (36,7%)
Цільова культура	Полевого дослід	Gusine hispida Maxim (Соя звичайна)
Синтез фітогормонів	Хроматографічні, спектральні методи	Синтез фітогормонів ауксинової, цитокінінової, гіберелінової природи

ВИСНОВКИ

Виконавши завдання дипломного бакалаврського проекту, було одержано такі результати:

1. Після аналізу українського ринку біологічних препаратів для обробки сої та здійснення розрахунків, визначено, що для виготовлення 48,4 т «Ризогуміну» необхідно виробити 48 400 л культуральної рідини протягом 11 циклів (або 77 діб).

2. Внаслідок пошуку, опрацювання наукової літератури й порівняння властивостей та умов культивування виробничих штамів *Bradyrhizobium japonicum* для технології встановлено, що найбільш економічно обгрунтованим й актуальним є вибір високоефективного штаму *Bradyrhizobium japonicum* М-8, що є перспективним за показниками азотфіксувальної активності й сприятливому впливу на посіви сої .

3. Для проведення біосинтезу *Bradyrhizobium japonicum* М-8 було обрано ферментер геометричним об'ємом 6,3 м³, оснащений барботером та гвинтовою мішалкою зі швидкістю перемішування 220 об/хв відповідно до фізіологічних властивостей біологічного агента й в'язкості поживного середовища. Спосіб культивування штаму – глибинний, періодично. Процес має тривати 72 год при температурі 28 °С, рН 6,5-7,5 в асептичних умовах.

4. Розрахована кількість стадій підготовки посівного матеріалу для його вирощування у ферментаторі – 5, що включає етапи культивування у качалочних колбах, інокуляторах об'ємами 0,005 м³, 0,05 м³, 0,5 м³ й у біореакторі.

5. Обгрунтовано спосіб приготування й стерилізації поживного середовища згідно з фізико-хімічними властивостями компонентів для підготовки посівного матеріалу на різних стадіях.

					ДБП.ПЗ.162.06		
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			
Розробив	Харитоновна				Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив	Грецький						
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19		
Затвердив							

б. Послідовно розроблено технологічну схему виробництва «Ризобактерину» з до якої входять процеси санітарної підготовки виробництва, технологічний процес, що завершується біосинтезом у ферментаторі, та етапи знешкодження відходів.

б. Опрацьовано й викладено методи контролю якості готової продукції. При відповідності усім процесам виробництва, їх умовам нормативним показникам та вимогам забезпечується вихід препарату «Ризобактерин» з титром живих клітин не менше $2,3 \times 10^9$ КУО на 1 г.

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						85
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria: веб-сайт: URL: <https://www.bergeys.org/publications/> (Дата звернення: 20.05.2023)
2. Bradyrhizobium japonicum: веб-сайт: URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Bradyrhizobium_japonicum (Дата звернення: 14.02.2023)
3. Офіційний сайт виробника біотехнологічного обладнання Sysbiotech: веб-сайт: URL: <http://en.sysbiotech.at/>(Дата звернення: 15.03.2023)
4. Адамчук-Чала Н.І. Вплив інокуляції *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 на фотосинтетичний апарат трансгенної сої Агроекологічний журнал, 2014, № 2. С.95-99.
5. Алексеев О.О., Патица В.В. Формування високоефективної симбіотичної системи *Bradyrhizobium japonicum* – соя. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол., 2014, № 3 (60) с.41-43
6. Біотехнологія сільськогосподарських виробництв: Лабораторний практикум.Навчальний посібник/ В.М.Ліновицька та ін. Київ,2022.51 с.
7. Бойко Н.В., Зінчук М.І. До питання розробки технологій мікробіологічної меліорації осушуваних земель західного полісся. Біологічні системи. Т. 4. Вип. 2. 2012. С.131
8. Вакуліч. А.М., Курінна І.Г., Харкута О.В. Основні тенденції та прогноз розвитку ринку миючих засобів в Україні 2010, 2 (33): 147-151 с.
9. Вирощування сої як бізнес.Офіційний сайт компанії "Tetra agro":веб-сайт: URL: https://tetra-agro.com.ua/news/viroshhuvannya_soyi_yak_biznes(Дата звернення: 20.02.2023)

					ДБП.ПЗ.162.06			
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата				
Розробив		Харитоновна			СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	Літ.	Аркуш	Аркушів
Перевірив		Грецький				Д	86	3
Н.Контр.					КНУТД, ББТ-19			
Затвердив								

10. Воробей Н.А., Кукол К.П., Пухтаєвич П.П. Перспективи використання симбіотичної азотфіксації у сучасних агротехнологіях. С. 148-150

11. Дезінфекція : метод. вказ. для самост. роботи студентів 5-го курсу мед. фак-ту з дисципліни «Епідеміологія» / упоряд. Т. О. Чумаченко, М. В. Райлян, Ю. І. Поливянна та ін. – Харків : ХНМУ, 2020. – 12 с

12. ДСТУ 7525:2014.ВОДА ПИТНА. Вимоги та методи контролювання якості.[Чинний від 2014-10-23]Київ,2014.28 с. (Інформація та документація)

13. Інструкція щодо використання засобу "Біонол" у вигляді порошку: веб-сайт: URL:<https://med-line.com.ua/ua/bionol-instr> (Дата звернення: 23.03.2023)

14. Кобак С.Я., Колісник С.І., Лихочвор В.В., Петриченко В.Ф., Пида С.В., Чорна В.М. Формування азотфіксувального потенціалу та продуктивності сортів сої селекції інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН., Мікробіологічний журнал, 2018.Т.80, №5. с.63-71.

15. Козар С.Ф. Продукування фітогормонів *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* за їх сумісного культивування. Сільськогосподарська мікробіологія. 2018. Вип. 28. С. 33–40.

16. Леонова Н.О. Синтез ауксинів та цитокінінів *Bradyrhizobium japonicum* за дії флавоноїдів. Мікробіол. журн., 2015, Т. 77, № 5, с.95-97

17. Методичні вказівки щодо застосування засобу "Полідез" з метою дезінфекції та передстерилізаційного очищення: веб-сайт:URL:<https://cci.vn.ua/wp-content/uploads/2020/04/Polydez-Ynstruktsyya-MOZ-Ukraynu-polnaya-1.pdf>(Дата звернення: 24.03.2023)

18. Про затвердження Технічного регламенту мийних засобів: постанова Кабінету Міністрів України від 20 серпня 2008р. No717. URL:<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/717-2008-%D0%BF#Тех> (Дата звернення: 22.03.2023)

19. Сидоров Ю.І., Влязло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. Технологічні розрахунки.

					ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
						87
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата		

Приклади і задачі. Основи проектування: Навчальний посібник. Львів: “Інтелект-Захід”, 2008, - 736 с

20. Спосіб отримання рістстимулювального фітогормонального препарату для рослин: пат. 58822 Україна : А01N 63/00 С12N 1/14 С05F 11/08. № у 2010 11838 ; заявл. 06.10.2010; опубл. 26.04.2011, Бюл. № 8, 2011 р., 5 с.

21. Технологія вирощування сої під Раундап в Україні на 2023. Офіційний сайт компанії "Агроексперт-трейд": веб-сайт: URL: <https://agroexp.com.ua/uk/tehnologiya-vyiraschivaniya-soi-pod-raundap-ukraina> (Дата звернення: 06.03.2023)

22. Характеристика нових сортів сої. Головний журнал з питань агробізнесу: веб-сайт: URL: <https://propozitsiya.com/ua/harakteristika-novih-sortiv-soyi> (Дата звернення: 06.03.2023)

23. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для виробництва бактеріальних добрив для інокуляції сої: пат. 11320 Україна : С05F 11/08 (2006.01) С12N 1/20 (2006.01) А01Р 21/00 С12R 1/01. № а 2015 01467; заявл. 20.02.2015; опубл. 26.12.2016, Бюл. № 24, 8 с.

24. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8 Kirchner, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої: пат. 39545 Україна: С05F11/08 (2001.06), С12N1/20(2001.06). № 2000105680; заявл. 6.10.2000; опубл. 15 06.2001, Бюл. № 5, 6 с.

						ДБП.ПЗ.162.06	Аркуш
							88
Зм.	Аркуш	№ Документа	Підпис	Дата			

ДОДАТКИ

Додаток А

Матеріали Міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» 27-28 квітня 2023 р.

ВАЖЛИВІСТЬ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ СОЇ АЗОТФІКСУВАЛЬНИМИ БАКТЕРІЯМИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

О.К. Харитонова, І.О. Грецький, І.М. Волошина

Київський національний університет технологій та дизайну
olyakharitonova29@gmail.com

Відомо, що нітроген невід’ємна складова нормального росту й розвитку рослин, перебігу їх метаболічних процесів, мінерального живлення. Він є одним з основних елементів формування врожаю, а також важливим фактором відтворення родючості ґрунтів. Через техногенний вплив та перевантаження ґрунтів відбувається зниження вмісту азоту, що призводить до низьких врожаїв рослин й появи фітопатогенів. Тому в наш час є актуальною проблема його балансу та перетворень в агроекосистемах [1].

Поширене рішення даної проблеми – використання хімічних азотних добрив. Проте їх застосування у рослинництві вимагає високих енергетичних затрат при їх виробництві. Окрім цього, внесення таких добрив може призводити до забруднення ґрунтів [1]. Тому існує потреба в екологізації землеробства, що має прийти на заміну хіміко-технологічній тенденції [2]. Актуальна альтернатива хімічним нітрогенвмісним добривам – використання

біопрепаратів, що містять азотфіксувальні бактерії, здатні перетворювати молекулярний азот на доступну для рослин форму.

Враховуючи, що однією з найбільш затребуваних у вирощенні культурних рослин в Україні завдяки своїй значній поживній цінності й застосуванню у багатьох галузях – є соя. Існує велика потреба у забезпеченні цієї рослини додатковим джерелом азоту при вирощуванні, а саме біологічним, що утворюється специфічними до сої бульбочковими бактеріями виду *Bradyrhizobium japonicum* в результаті симбіотичної взаємодії з кореневою системою [2–4].

Саме тому на ринку існує широкий спектр препаратів для передпосівної обробки сої на основі різних штамів *Bradyrhizobium japonicum* [2]. Окрім фіксації азоту, дані бактерії здатні синтезувати ряд фітогормонів ауксинової, гіберелінової й цитокінінової природи, важливих для встановлення й підтримки рослинно-мікробного симбіозу. Ці сполуки, в свою чергу, є стимуляторами росту рослин, володіють антифунгальними, бактерицидними та бактеріостатичними властивостями, що знижує ризик розвитку хвороб, що становлять небезпеку як для рослин, так і для людини [5].

Відомо, що при обробці насіння сої препаратами з *Bradyrhizobium japonicum* азотфіксувальна активність після утворення бобово-ризобіального симбіозу збільшувалась [2]. Також вагомим показником азотфіксувальної активності є кількість бульбочок, утворених *Bradyrhizobium japonicum* на коренях сої. При інфікуванні коренів штамом *Bradyrhizobium japonicum* збільшується ефективність фіксації атмосферного азоту бактеріями і, як наслідок, підвищення продуктивності рослини та виходу білку у насінні [2, 3].

Отже, підсумовуючи дані літературних джерел можна зробити висновок, що застосування азотфіксувальних бактерій, прикладом яких є *Bradyrhizobium japonicum*, у складі добрив для передпосівної обробки сої є перспективним напрямом в екологізації сільського господарства й поліпшенні азотного балансу ґрунтів. Симбіотична взаємодія бульбочкових бактерій та сої демонструє значне підвищення врожайності культури, приріст вмісту білку в насінні, що покращує його поживну цінність. Фітогормони, синтезовані *Bradyrhizobium japonicum*, мають захисний, сприятливий для росту ефект щодо рослини-господаря. Перераховані особливості *Bradyrhizobium japonicum* роблять внесення препарату з даними бактеріями важливою складовою вирощування сої.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Schroeder M.M., Gomez M.Y., McLain N., Gachomo E.W. // *Mol Plant Microbe Interact.* 2022. 35(3):215-229. doi: 10.1094/MPMI-05-21-0118-R..
2. Krutylo D.V. // *Mikrobiol. Z.* 2017; 79(6):82-94. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj79.06.082>.
3. Крутило Д.В. // *Сільськогосподарська мікробіологія.* 2018. 28:33 – 40.
4. Shah V., Subramaniam S. // *Sci Total Environ.* 2018. 15;624:963-967. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.185.
5. Козар С. // *Сільськогосподарська мікробіологія.* 2018. 28:33-40. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.28.33-40>.



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

СЕРТИФІКАТ

засвідчує, що

Харитоновна Ольга

*брав / ла участь у роботі Міжнародної наукової конференції
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ, ЕКОЛОГІЇ ТА
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ»*

27–28 квітня 2023 року, м. Харків, Україна

*Голова оргкомітету,
проректор з наукової роботи, професор*

*Співголова оргкомітету, декан
факультету біотехнологій, професор*



Валерій МИХАЙЛОВ

Олена ЩЕРБАК