

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації**

До захисту допущено:
Завідувач кафедри
_____ Валентина ПОЛІЩУК
«03» червня 2025 р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
на тему: «Технологія комерційного посівного міцелію опенька
тополевого з проєктуванням апарата для посівного матеріалу»**

Виконала:
студентка IV курсу, групи БТ-11
Голосова Інна Володимирівна _____

Керівник:
Доц. кафедри промислової біотехнології та біофармації, к.б.н.,
Дзигун Лариса Петрівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:
старший викладач кафедри біотехніки та інженерії
Остапенко Жанна Ігорівна _____

Рецензент:
Проф. кафедри біоенергетики, біоінформатики та
екобіотехнології, д.б.н., проф.,
Горго Юрій Павлович _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.
Студентка _____

Київ – 2025 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП БТ-1105. 00 ВДП		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проекту	Лист	Листів
Розробн.	Голосова ІВ.				2	89
Керівн.	Дзигун Л.П.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-11	
Консульт.	Остапенко Ж.І.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

« 14 » квітня 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Голосовій Інні Володимирівні

1. Тема проєкту «Технологія комерційного посівного міцелію опенька тополевого з проєктуванням апарата для посівного матеріалу», керівник проєкту Дзигун Лариса Петрівна, к.б.н., доц., затверджені наказом по університету від «29» травня 2025 р. №1838-с.
2. Термін подання студентом проєкту 09 червня 2025 року
3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт – зерновий посівний міцелій, в пакетах по 0,5 кг; інокулятор для виробничого біосинтезу об'ємом 1 м³.
4. Зміст пояснювальної записки:
5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): технологічна схема – 1 арк., апаратурна схема – 1 арк., креслення апарату – 1 арк., презентація.
6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Остапенко Ж.І., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання 14 квітня 2025 року

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
	Вступ. Характеристика біологічного агента	14.04.25-19.04.25	
	Біохімічні основи виробництва	19.04.25-05.05.25	
	Методи отримання промислових продуцентів	05.05.25-10.05.25	
	Технологічна частина	10.05.25-15.05.25	
	Складання апаратурної схеми	15.05.25-20.05.25	
	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	20.05.25-25.05.25	
	Оформлення пояснювальної записки	25.05.25-30.05.25	
	Перевірка на плагіат дипломного проєкту	31.05.25-04.06.25	
	Подання дипломного проєкту на рецензування	05.06.25-06.06.25	
	Подання дипломного проєкту та рецензії до екзаменаційної комісії	До 09.06.25	

Студент

Інна ГОЛОСОВА

Керівник

Лариса ДЗИГУН

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія комерційного посівного міцелію
опенька тополевого з проєктуванням апарата для
посівного матеріалу»

Київ – 2025 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить 89 с., 8 рис., 4 табл., 63 посилань.

Проєкт присвячено розобці технології виробництва комерційного посівного міцелію опенька тополевого *Cyclocybe aegerita* та дільниці біосинтезу.

Посівний міцелій гриба *Cyclocybe aegerita*, отриманий методом твердофазного культивування, характеризується високою продуктивністю, стабільністю росту, швидким обростанням середовища. Кінцевий продукт даної технології може використовуватися як інокулят для подальшого вирощування плодових тіл гриба *Cyclocybe aegerita* на виробничих субстратах.

У якості продуцента було обрано штам *Cyclocybe aegerita* 2231, що характеризується найвищими результатами з біологічною ефективністю 60 %. Було обрано поживні середовища для вирощування інокуляту продуцента та для його виробничого культивування на основі зернового субстрату.

Для дільниці біосинтезу інокуляту продуцента було використано апаратурне оснащення, представлене інокулятором, який оснащений турбінною мішалкою та барботером з відповідними розрахунками, об'ємом 1 м³ та коефіцієнтом заповнення 0,75.

На основі літературних даних для виробництва цільового продукту було обрано технологічну та апаратурну схеми виробництва посівного зернового міцелію опенька тополевого в герметичних пакетах по 0,5 кг.

СУСЛОСЫВЕ АЕГЕРІТА, БАЗИДІЄВІ ГРИБИ, МІЦЕЛІАЛЬНА
МАСА ГРИБА, ВИРОБНИЧЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, МІЦЕЛІЙ ПОСІВНИЙ,
ІНОКУЛЯТ

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Голосава І.В.			РЕФЕРАТ	Стадія	Арк.	Архувів
Конс.						Д	6	89
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Дзигун Л.П.						

ABSTRACT

The diploma project consists of 89 pages, 8 figures, 4 table, and 63 references.

The project is dedicated to the development of a technology for the production of commercial spawn mycelium of the black poplar mushroom *Cyclocybe aegerita* and the biosynthesis section.

The spawn mycelium of *Cyclocybe aegerita*, obtained through solid-state cultivation, is characterized by high productivity, stable growth, and rapid colonization of the substrate. The final product of this technology can be used as an inoculum for the further cultivation of *Cyclocybe aegerita* fruiting bodies on production substrates.

The selected producer strain is *Cyclocybe aegerita* 2231, which demonstrated the highest performance with a biological efficiency of 60%. Nutrient media were selected for both inoculum production and large-scale cultivation using a grain-based substrate.

For the biosynthesis section of the producer's inoculum, process equipment was selected in the form of an inoculator equipped with a turbine stirrer and a sparger, with corresponding calculations. The working volume is 1 m³ with a filling coefficient of 0.75.

Based on literature data, a technological and equipment scheme was selected for the production of commercial grain spawn of *Cyclocybe aegerita* in sealed 0.5 kg bags.

CYCLOCYBE AEGERITA, BASIDIOMYCETE, FUNGAL MYCELIAL BIOMASS, INDUSTRIAL CULTIVATION, SPAWN MYCELIUM, INOCULUM

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						7
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
1.1. Основні промислові продуценти	12
1.2. Систематичне положення	14
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки	15
1.4. Культуральні ознаки	17
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки	18
1.6. Поширення в природі	20
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	22
2.1. Характеристика цільового продукту	22
2.2. Схема хімічних перетворень	24
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	27
2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	28
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	30
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту	30
3.1.1. Особливості геному	30
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу	31
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту	32
3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів	33
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу	34
3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів	36

предмет:					ДП БТ-1105. 00 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Арк.	Аркушів
Розроб.		Голосава І.В.				Д	8	89
Конс.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.		Дзигун Л.П.						

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	36
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	39
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	39
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві	40
4.3. Опис технологічного процесу	43
4.4. Матеріальний баланс	53
4.5. Контроль виробництва	54
4.6. Технологічна схема виробництва	60
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	61
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	61
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	64
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	74
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	76
ВИСНОВКИ	81
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	82

ВСТУП

У сучасних умовах активного розвитку біотехнологій вирощування їстівних грибів набуває особливого значення як перспективний напрям агропромислового комплексу. Одним із видів грибів, що привертає все більшу увагу дослідників і виробників у всьому світі, є опеньок тополевий *Cyclocybe aegerita*, який поєднує високі смакові якості, значну харчову та лікувальну цінність з відносно простою технологією культивування. Завдяки вмісту біологічно активних речовин, включаючи антиоксиданти, полісахариди, ферменти та мікроелементи, цей гриб розглядається не лише як харчовий продукт, але і як функціональна сировина для біофармацевтичної та нутрицевтичної промисловості [1].

Технологія отримання посівного міцелію є ключовим етапом у виробництві грибів, оскільки від якості міцелію залежить успішність подальшого культивування. Світовий досвід у сфері грибівництва свідчить про зростання попиту на якісний посівний матеріал, що здатен забезпечити стабільне плодоношення та високу врожайність при вирощуванні на промислових субстратах. Проте, незважаючи на численні дослідження та напрацювання в галузі мікології, виробництво посівного міцелію все ще стикається з рядом проблем: нестабільністю росту культури, ризиком контамінації, обмеженою життєздатністю інокуляту при транспортуванні та зберіганні, а також недостатньою стандартизацією технологічних процесів. Окрім того, існуючі технології вирощування посівного міцелію здебільшого орієнтовані на поширені гриби, такі як *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, тоді як методологія культивування менш вивчених, але перспективних видів, таких як *Cyclocybe aegerita*, ще потребує оптимізації [2].

Актуальність дослідження полягає у необхідності розробки ефективної,

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Голосава І.В.				ВСТУП	Стадія	Арк.	Аркушів
Конс.						Д	10	89
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівн.	Дзигун Л.П.							

надійної та масштабованої технології отримання комерційного посівного міцелію *Cyclocybe aegerita*, що забезпечить високу біологічну ефективність при подальшому вирощуванні плодових тіл на різних типах субстратів. Важливим є також вдосконалення стадії біосинтезу інокуляту – ключового етапу, який визначає якість та життєздатність посівного матеріалу. У цьому контексті потребує уваги розробка та підбір оптимального живильного середовища, вибір ефективного обладнання для культивування, забезпечення стерильності процесу, а також визначення технологічних параметрів, що впливають на морфологічні та продуктивні характеристики міцелію.

Метою даного дипломного проєкту є вдосконалення ділянки біосинтезу технології виробництва посівного матеріалу грибів *Cyclocybe aegerita*.

Для досягнення поставленої мети було призначено такі завдання:

1. Проаналізувати характеристики штамів *Cyclocybe aegerita* на основі досліджень наведених в літературі та обрати найбільш продуктивний.
2. Розробити оптимальний склад поживного середовища з урахуванням фізіолого-біохімічних властивостей вибраного штаму.
3. Провести аналіз існуючих методів отримання високопродуктивного промислового штаму *Cyclocybe aegerita*.
4. Обґрунтувати вибір технологічного процесу для отримання цільового продукту та на його основі запропонувати відповідну технологічну та апаратну схеми.
5. Розрахувати матеріальний баланс виробництва зернового посівного міцелію для однієї виробничої партії.
6. Виконати розрахунки для виробничого інокулятора, який задовольнятиме умови культивування обраного штаму.

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Грибництво – це спеціалізована галузь аграрної промисловості, що займається вирощуванням плодових тіл їстівних та лікарських грибів і міцелію у штучно створених умовах. Це інтенсивно розвиваючий напрямок біотехнології, який поєднує в собі аграрні, мікробіологічні та харчові технології [3].

Культивация грибів є джерелом високоякісного рослинного білка, вітамінів, амінокислот, а також біологічно активних речовин, що мають протизапальні, антиоксидантні та імуностимулювальні властивості. Грибна продукція використовується не лише як харчовий продукт, але і в медицині, фармацевтиці, косметології, біоенергетиці та навіть екологічних технологіях (наприклад, мікоремедіація) [3].

Посівний міцелій викорисовується як вихідний інокуляційний матеріал у процесі культивуації плодових тіл гриба. Його застосування також охоплює кілька інших напрямків. На промисловому вирощуванні грибів у грибних господарствах та фермах міцелій використовують для засіву субстратів (тирса, солома, лущиння соняшника, деревні блоки тощо). Також міцелій продається в малих фасуваннях (зерновий, паличковий, блоковий) для домашнього вирощування грибів, часто як частина «грибних наборів» [4]. У біотехнологічних та мікологічних лабораторіях міцелій використовують для дослідження ферментативної активності, генетики грибів, біосинтезу біоактивних речовин тощо. Також використовується для розробки нових методів культивуації, покращення врожайності або підвищення біохімічних характеристик плодових тіл [5]. Міцелій *Cyclocybe aegerita* містить біоактивні сполуки (наприклад, ергостерол, полісахариди), які

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розроб.	Голосова І.В.						
Конс.							
Керівн.	Дзигун Л.П.						
					Стадія	Арк.	Архувів
					Д	12	89
					КПІ ім. Ізоря Сікорського ФБТ		

досліджуються на предмет антиоксидантної, антибактеріальної та протипухлинної активності. Його культивують у рідких середовищах для отримання екстрактів, які можуть бути використані в майбутніх фармацевтичних або функціональних продуктах [2]. Завдяки здатності до розщеплення лігноцелюлозних матеріалів, міцелій може застосовуватись у біодеградації рослинних решток або для підготовки екологічних компостів. Потенційно може використовуватись у мікоремедіації — очищенні забруднених ґрунтів або органічних відходів [5].

В Україні найбільш популярними грибами є шампіньйони, глива звичайна, шіїтаке, опеньок зимовий і літній, та інші [6]. Станом на сьогодні найбільш широко культивованими видами грибів у світі є:

- Шампіньйон двоспоровий (*Agaricus bisporus*) – найбільш популярний гриб у світі, що займає понад 35% ринку. Його вирощування відбувається на компостованих субстратах, зазвичай у спеціалізованих камерах із контрольованими параметрами [6].

- Глива звичайна (*Pleurotus ostreatus*) – другий за популярністю гриб, вирощується на відходах аграрної промисловості (солома, лушпиння соняшника, тирса). Має високу врожайність, просту технологію вирощування і здатність до розкладу целюлози [7].

- Шіїтаке (*Lentinula edodes*) – традиційний гриб східної медицини. Вирощується переважно на деревині або на стерилізованих блоках. Цінується за лікувальні властивості (антивірусна, протипухлинна дія) [8].

- Енокі (*Flammulina velutipes*), Мейтаке (*Grifola frondosa*), Кордицепс (*Cordyceps militaris*) – менш поширені, але дуже перспективні у фармакології та дієтичному харчуванні [6].

- На тлі вищезазначених видів особливе місце займає опеньок тополевий (*Cyclocybe aegerita*, синонім – *Agrocybe aegerita*), що традиційно вирощується у Середземномор'ї, Південно-Східній Азії та останнім часом набуває популярності в Європі [2].

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Гриб *Cyclocybe aegerita* має ряд переваг серед інших грибів. Наприклад, в ньому поєднуються харчові та лікувальні цінності. Опеньок тополевий містить значну кількість білків, полісахаридів, вітамінів групи В, калію, фосфору, а також біоактивні речовини з потенціалом протипухлинної та антиоксидантної дії. Фруктуаційні тіла мають привабливу зовнішність, гарний смак і приємну текстуру. Це робить гриб бажаним продуктом у ресторанах та супермаркетах преміум-класу [2].

Cyclocybe aegerita має гнучку технологію вирощування: його можна культивувати як на традиційних субстратах (деревина, тирса), так і на агровідходах, використовуючи прості технології блокового вирощування [2].

З економічної точки зору, завдяки високій врожайності та порівняно низьким витратам на виробництво, опеньок тополевий дозволяє отримати конкурентоспроможний продукт із гарним співвідношенням "ціна – якість". На додачу, порівнюючи з шампінйонами та гливами, ринок *Cyclocybe aegerita* ще не перенасичений, що створює гарні перспективи для нових виробників [6].

Зважаючи на універсальність використання, технологічну гнучкість та високі споживчі властивості, опеньок тополевий є перспективним об'єктом для подальшого розвитку грибництва в Україні та за її межами. Його інтеграція у малі та середні фермерські господарства або кооперативи дозволяє ефективно використовувати місцеві ресурси та створювати додану вартість в аграрному секторі.

1.2. Систематичне положення

Обраний продуцент *Cyclocybe aegerita*, який також ще має назви-синоніми *Agaricus aegerita*, *Pholiota aegerita*, *Agrocybe aegerita*, згідно з Mycobank CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center Utrecht [9] має наступне систематичне положення:

Надцарство: Eukaryota

Царство: Fungi

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Підцарство: Dikarya

Відділ: Basidiomycota

Клас: Agaricomycetes

Порядок: Agaricales

Родина: Strophariaceae

Рід: *Cyclocybe*

Вид: *Cyclocybe aegerita* (V. Brig.) Vizzini, Опеньок тополинний

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Cyclocybe aegerita формує вторинний міцелій (дикаріотичний), який є основною формою існування гриба на поживному субстраті та здатний до плодоношення. На початкових стадіях розвитку утворюється первинний монокаріотичний міцелій із спор, який у процесі плазмогамії переходить у дикаріотичну форму – базидіальну [10]. Гіфи *Cyclocybe aegerita* мають діаметр від 2 до 5 мкм, причому в процесі розвитку вони можуть потовщуватися залежно від умов росту субстрату та фізіологічного стану культури [11]. Характер розгалуження гіф у *Cyclocybe aegerita* є переважно моноподіальним – основна гіфа безперервно росте вперед, а бічні гілки відходять під гострим кутом від основної осі. Частково спостерігаються дихотомічні розгалуження, – розділення кінчика гіфи на дві рівні гілки –, особливо при інтенсивному розростанні у щільних субстратах [12].

Для *Cyclocybe aegerita* характерна наявність ризоморф. Ризоморфи – це товсті, шнуроподібні структури, що складаються з щільно переплетених гіф. Вони слугують для транспортування поживних речовин і води на значні відстані та для колонізації нових субстратів. Ризоморфи опенька тополевого можуть бути помітними на ураженій деревині [13].

Основним типом запасних речовин у клітинах міцелію *Cyclocybe aegerita* є: глікоген у вигляді гранул у цитоплазмі, ліпіди у формі крапель жиру, у меншій кількості – манітол – алкоголь моносахаридної природи, який служить резервом енергії та стабілізатором осмотичного тиску [14].

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відповідно до «Визначника грибів України» [15], шапинка діаметром 4-12 см гладенька бежева з жовтуватим центром і підвернутим краєм. З часом вона зморщується та розтріскується. Пластинчастий гіменофор, в якого пластинки прирослі, блідо-коричневі. Кільце на ніжці швидко всихає. Ніжка 6-12 см, білувата, сіра при основі, циліндрична, покрита маленькими волокнам. Блідий м'якуш приємно пахне (рис.1.1).



Рисунок 1.1 – Плодове тіло *Cyclocybe aegerita* [16]

Споровий порошок *Cyclocybe aegerita* має коричневий або тютюново-коричневий колір. Окремі спори під мікроскопом виглядають світло-коричневими (рис.1.2). Спори еліпсоїдні, іноді описуються як яйцеподібні. Розміри спор зазвичай становлять 8-11×5-7 мкм. Поверхня спор є гладкою. Спори мають широку проросткову пору на одному кінці: розмір пори близько 1-2 мкм [17].

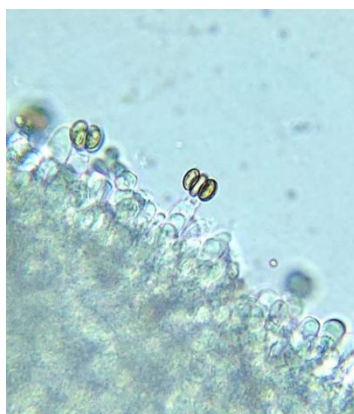


Рисунок 1.2 – Спори *Cyclocybe aegerita* [18]

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

1.4. Культуральні ознаки

Культуральні ознаки грибів можуть дещо варіюватися залежно від складу поживного середовища, температури інкубації та інших умов культивування. Однак, існують загальні характеристики, які є типовими для *Cyclocybe aegerita*.

На щільних середовищах (наприклад, агарі на основі екстракту мальтози або картопляно-декстрозному агарі) *Cyclocybe aegerita* формує швидкоростучі колонії, які за 7–10 днів можуть досягати діаметра 5–7 см при температурі 24–26 °C [11].

На рідких поживних середовищах гриб росте у вигляді плаваючих пухких агрегатів міцелію або формує плівку на поверхні середовища. Візуально культура може утворювати ніжні, розгалужені тяжі міцелію [19].

Колонії на агарі зазвичай мають округлу або неправильно-округлу форму, іноді дещо амебоподібну при швидкому рості. Діаметр колоній залежить від складу поживного середовища, температури та умов інкубації, але в середньому становить 5–9 см за 10–14 днів [12]. Поверхня колоній може бути на початкових стадіях – рівною або трохи шорсткуватою, на пізніх стадіях росту – горбистою або зморшкуватою, особливо у центральній частині колонії через накопичення повітряного міцелію. Край колоній у *Cyclocybe aegerita* є переважно рівним на ранніх стадіях росту, та хвилястим або зубчастим у міру старіння колонії та активного розгалуження міцелію [14]. Пігментація колоній спостерігається залежно від складу поживного середовища і віку культури: у центрі колонії можливе накопичення світло-коричневих або жовтуватих відтінків через старіння клітин або виділення метаболітів [13].

Повітряний міцелій зазвичай має білий або кремовий колір на початку росту; згодом він може ставати злегка сірим або жовтуватим у центрі колонії. Субстратний міцелій інтенсивніше пігментований — від жовтуватого до світло-коричневого кольору, особливо у глибших шарах агарового середовища або в рідкому поживному середовищі [13].

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

Cyclocybe aegerita є сапротрофом і використовує різноманітні органічні сполуки як джерела вуглецю. До них належать целюлоза, геміцелюлоза, лігнін, оскільки він росте на деревині, а також простіші вуглеводи, такі як глюкоза, сахароза, мальтоза в культуральних середовищах [11].

Як джерела азоту *Cyclocybe aegerita* може використовувати як органічні: амінокислоти, пептон, дріжджовий екстракт, так і неорганічні сполуки: нітрати, амонійні солі [19].

Для росту *Cyclocybe aegerita* необхідні основні макроелементи, такі як калій K, фосфор P, магній Mg, сірка S та кальцій Ca, які входять до складу ферментів, нуклеїнових кислот та інших важливих клітинних компонентів [19].

У невеликих кількостях гриб потребує мікроелементів, таких як залізо Fe, цинк Zn, марганець Mn, мідь Cu, молібден Mo, які є кофакторами багатьох ферментів [19].

Cyclocybe aegerita може мати потреби у певних органічних сполуках, які він не здатний синтезувати самостійно, таких як вітаміни групи B (наприклад, тіамін, біотин), які стимулюють ріст міцелію. Дріжджовий екстракт, що часто використовується в поживних середовищах, є багатим джерелом вітамінів та інших факторів росту [13].

Cyclocybe aegerita є гетеротрофним організмом. Це означає, що він отримує енергію та вуглець з органічних сполук, оскільки не здатний до фотосинтезу або хемосинтезу. В природі це сапротроф, що розкладає мертву органічну речовину, зокрема деревину тополі та інших листяних порід [11]. *Cyclocybe aegerita* є аеробним організмом. Для його росту необхідна наявність кисню, оскільки він використовує аеробне дихання для отримання енергії. Отже, основний тип енергетичного метаболізму *Cyclocybe aegerita* – аеробне дихання. Він окиснює органічні сполуки за допомогою кисню, отримуючи значну кількість енергії у вигляді АТФ [13].

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

Мінімальна температура росту зазвичай становить близько 5-10 °С, а максимальна – близько 30-35 °С, оптимальна температура для росту 24-27 °С. Гриб здатний рости в широкому діапазоні рН, приблизно від рН 4,5 до рН 7,5, проте за межами цих значень пригнічується розвиток, а оптимальне значення рН для росту *Cyclocybe aegerita* є слабкокислим або близьким до нейтрального, в діапазоні рН 5,5-6,5 [14].

Клітинна стінка грибів, включаючи *Cyclocybe aegerita*, складається переважно з хітину (β-1,4-полісахариду), глюканів та інших полісахаридів і білків. Клітини можуть містити запасні речовини, такі як глікоген (запасний полісахарид), краплі ліпідів та деякі запаси поліфосфатів [12].

Як сапротроф, *Cyclocybe aegerita* продукує широкий спектр позаклітинних ферментів, необхідних для розщеплення складних органічних полімерів деревини. До них належать целюлази, геміцелюлази, лігнінази (пероксидази, лаккази). Також присутні внутрішньоклітинні ферменти, що беруть участь у метаболізмі вуглеводів, азоту та інших сполук [20].

Cyclocybe aegerita розмножується як статевим, так і нестатевим шляхами. Статеве розмноження є типовим для базидіоміцетів. Воно включає злиття монокаріотичних гіф (плазмогамія), утворення дикаріотичного міцелію, розвиток плодових тіл (базидіокарпів) на базидіях яких відбувається каріогамія (злиття ядер) та мейоз з утворенням базидіоспор. Базидіоспори є основним засобом поширення гриба. Нестатеве розмноження відбувається за допомогою фрагментації міцелію або утворення артроспор (товстостінних клітин міцелію, що відокремлюються) [11].

Стійкість *Cyclocybe aegerita* до конкретних антибіотиків може варіюватися між штамми. Зазвичай гриби мають природну стійкість до деяких антибіотиків, таких як пеніцилін та стрептоміцин, але чутливий до більшості фунгіцидів [21].

Для виділення та культивування *Cyclocybe aegerita* часто використовуються селективні середовища, що містять джерела вуглецю, які цей гриб може ефективно використовувати, наприклад, целюлоза, та можуть

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

включати інгібітори росту для інших мікроорганізмів, наприклад, певні антибіотики у низьких концентраціях для пригнічення бактерій. Поживне середовище на основі мальтозного агарового середовища MEA або картопляно-декстрозного агару PDA використовується для культивування та підтримання активного росту міцелію [19].

Для підтримання та довготривалого зберігання культур використовують тверді поживні середовища на основі агару з різним складом (наприклад, агаризований сусло-агар, агар з дріжджовим екстрактом та мальтозою YMA, агар з картопляно-декстрозним середовищем PDA). Для довготривалого збереження використовуються мінеральні середовища з додаванням кріопротекторів та зберіганням у холодильниках або в умовах кріоконсервації [13].

1.6. Поширення в природі

Опеньок тополевий росте з травня до листопада скупченими групами на стовбурах та на пеньках тополі. Вирощувати гриб можна як на органічних субстратах, так і на тополевих пеньках та колодочках [15].

Гриб найчастіше трапляється на гниючій деревині листяних порід, зокрема тополі, верби, вільхи, каштана, платана, дуба та бука. Значно рідше зростає на хвойних деревах. *Cyclocybe aegerita* є переважно вільноіснуючим сапротрофом, що розкладає органічну речовину мертвої деревини [11], є облігатним симбіонтом, однак іноді виявляє слабку паразитичну активність на ослаблених деревах, викликаючи брунькову або стовбурову гниль [13].

У процесі розкладання деревини *Cyclocybe aegerita* конкурує з іншими дереворуйнівними грибами, такими як *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* та деякі види *Aspergillus* і *Penicillium* [22]. Може бути джерелом їжі для безхребетних (комах та їх личинок), а також для деяких видів грибних кліщів [22].

Віддає перевагу вологим, помірно теплим місцям — берегам річок, вологим лісам, паркам, садам. Може зростати як у природних екосистемах,

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

так і в насадженнях культурних дерев. Широко поширений у Південній та Центральній Європі, Азії (особливо в Китаї та Японії), Північній Африці, зустрічається також у деяких регіонах Північної Америки [19].

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика цільового продукту

Основним чинником для отримання високого урожаю їстівних грибів є використання якісного посівного міцелію, який здатен швидко засвоювати субстрат і має високу стійкість до захворювань. У звичайних умовах виготовити якісний міцелій неможливо через забруднення патогенною мікрофлорою, тому його вирощування здійснюється у спеціалізованих лабораторіях із належним обладнанням. Такі лабораторії повинні бути розташовані окремо від виробничих приміщень, де вирощується товарна продукція грибів. Просторова ізоляція дозволяє захистити міцелій від зараження небажаними мікроорганізмами в процесі його отримання [24].

Якісним зерновим міцелієм вважається міцелій білого кольору і з приємним грибним запахом. Якщо з'явилися жовті краплини на поверхні міцелію, то це ознака старіння зернового міцелію. Такий міцелій втрачає якість, гіфи темніють, висихає зерно, зменшується маса [24].

Готовий кінцевий продукт — зерновий посівний міцелій у пакетах по 0,5 кг, тобто живий вегетативний мікробіологічний матеріал, що складається з добре розвиненого міцелію *Cyclocybe aegerita*, вирощеного на стерилізованому зерні (рис.2.1). Цей продукт є ключовим інокулянтном для подальшого вирощування плодових тіл гриба на виробничих субстратах.



Рисунок 2.1 – Міцелій зерновий гриба Опеньок Тополевий (*Cyclocybe aegerita*) [23]

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб.	Голосова І.В.						
Конс.							
Керівн.	Дзигун Л.П.						
					Стадія	Арк.	Архувів
					Д	22	89
					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		

До складу такого пакету, окрім міцелію гриба, входить зерно злаків (на рис.2.1 ячмінь), та карбонат кальцію, тобто крейда. Продукт потрібно зберігати за температури від +2 до +6 °С до 6 місяців. Грибниця вирощується на стерильному субстраті: проводять інокуляцію на стерильному субстраті в асептичних умовах у ламінарному потоці стерильного повітря, після чого пакет з фільтром для доступу повітря герметично закривають [23].

Біохімічний склад гриба *Cyclocybe aegerita*, отриманий з метанольного екстракту з дикого зразка плодового тіла, представлений у табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Біохімічний склад гриба *Cyclocybe aegerita* (у перерахунку на суху масу) [25, 26]

Компонент	Вміст, %
Білки	13 - 20
Вуглеводи	70 - 85
Ліпіди	2 - 3
Зола (мінеральні речовини)	6 - 7
Вітаміни (В ₁ , В ₂ , В ₆ , D, E)	сліди
Нуклеїнові кислоти	3 - 5
Волога (у живій формі)	60 - 70

Зразок виявився багатим на вуглеводи, золу та білки. Трегалоза була основним вільним цукром, тоді як яблучна кислота була найпоширенішою органічною кислотою. Було ідентифіковано чотири ізоформи токоферолів; γ-токоферол був домінуючою ізоформою 86 %, за ним слідували β-токоферол 9 %, δ-токоферол 3 % та α-токоферол 2 %. Переважали поліненасичені жирні кислоти, з лінолевою кислотою 78 % як найпомітнішою [25].

Посівний міцелій — це грибниця, яка являє собою мікроскопічні нитки, що щільно обплітають стерилізоване живильне середовище (наприклад, зерно), і яка містить комплекс органічних речовин, серед яких домінують:

полісахариди (хітин, β -глюкани), білки, ліпіди, вітаміни, мікро- та макроелементи [24].

Основним структурним компонентом клітинної стінки міцелію є хітин (рис.2.2) — біополімер із хімічною формулою: $(C_8H_{13}O_5N)_n$. Хітин в клітинній стінці грибів існує як міцний комплекс з β -1,3-глюканами завдяки ковалентним зв'язкам, який називають хітин-глюкановим комплексом (ХГК) [27].

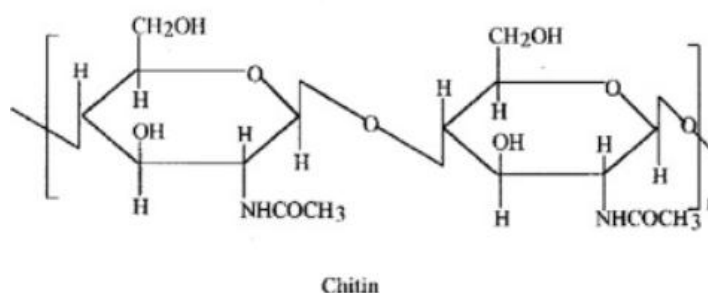


Рисунок 2.2 – Структура хітину [28]

Хітин поширений у грибів у вигляді кристалічних мікрофібрил у трьох ізомерних формах α -хітин, β -хітин і γ -хітин, де α -хітин є найбільш поширеною формою [28].

2.2. Схема хімічних перетворень

У даній роботі цільовим продуктом є комерційний посівний міцелій опенька тополевого *Cyclocybe aegerita*, синтез якого здійснюється методом твердофазного культивування. З огляду на це, ключовим моментом у здійсненні цього процесу є інформація про те, як поживні речовини, що є джерелами живлення, впливають на ріст та характеристики культури. Отже, потрібно визначити найбільш підходящі джерела вуглецю та азоту для розвитку продуцента, щоб вирощувати його в оптимально збалансованому середовищі.

У дослідженні [29] було виявлено, що найвищу біологічну ефективність гриб показував на недеревному субстраті, що складався з 78% пшеничної

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

соломи з додаванням 20% пшеничних висівок, 1% гіпсу та 1% вапна. Таким чином, найоптимальніше співвідношення C:N було встановлено в діапазоні 48-56 %. До зерна додають крейду для регуляції кислотності, покращення структури і рН.

Процес біосинтезу посівного міцелію *Cyclocybe aegerita* є результатом складних метаболічних і ферментативних реакцій, що відбуваються в клітинах гриба під час росту на поживному середовищі. Процес росту міцелію проходить за експоненціальним законом. Оптимальними умовами перебігу процесів є температура 24 - 26°C, рН середовища 6,0 - 6,5, з доступом повітря та стерильними умовами при атмосферному тиску [29].

Основні біохімічні перетворення включають [14]:

- Катаболізм вуглеводів (переважно крохмалю, глюкози, мальтози) — через гліколіз до пірувату, з подальшим окисленням у циклі Кребса.
- Аніболічний синтез білків — з амінокислот, що утворюються з неорганічних та органічних джерел азоту (аміаку, сечовини, пептону).
- Біосинтез клітинної стінки — через полімеризацію N-ацетилглюкозаміну до хітину.
- Синтез запасних речовин — таких як глікоген, ліпіди та поліфосфати.

Джерела вуглецю та азоту мають ключове значення для ефективного вирощування продуцентів серед базидіоміцетів. Вуглецевмісні сполуки виконують дві основні функції в метаболізмі гетеротрофних організмів: вони слугують джерелом вуглецю для побудови клітинних структур і беруть участь в енергетичних процесах, будучи основним джерелом енергії в результаті окислення. Ступінь засвоюваності вуглецевих сполук визначається їхньою хімічною природою, тому для накопичення міцелію *Cyclocybe aegerita* найбільш ефективними є прості цукри — моносахариди та дисахариди, які добре метаболізуються у ферментативних реакціях [12, 29].

Гліколіз, як процес енергетичного обміну, має обмежене значення, оскільки він забезпечує значно менше енергії порівняно з аеробним диханням. Однак основна роль гліколізу полягає у постачанні проміжних метаболітів,

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

необхідних для подальших біосинтетичних шляхів, зокрема: побудови клітинних оболонок; утворення пентоз для синтезу нуклеїнових кислот; накопичення запасних енергетичних речовин — глікогену, жирів, гліцерину та ацетальдегіду; надходження метаболітів у цикл трикарбонових кислот (ЦТК); синтезу ароматичних амінокислот; біосинтезу терпенів, ліпідів та ароматичних безазотистих сполук.

Отже, гліколіз у грибів в першу чергу забезпечує конструктивний обмін речовин. Далі метаболічні процеси переходять до циклу Кребса (ЦТК, рис.2.3), який є головним метаболічним шляхом та джерелом попередників для синтезу білків, пуринів, піримідинів і ферментативних кофакторів [29, 31].

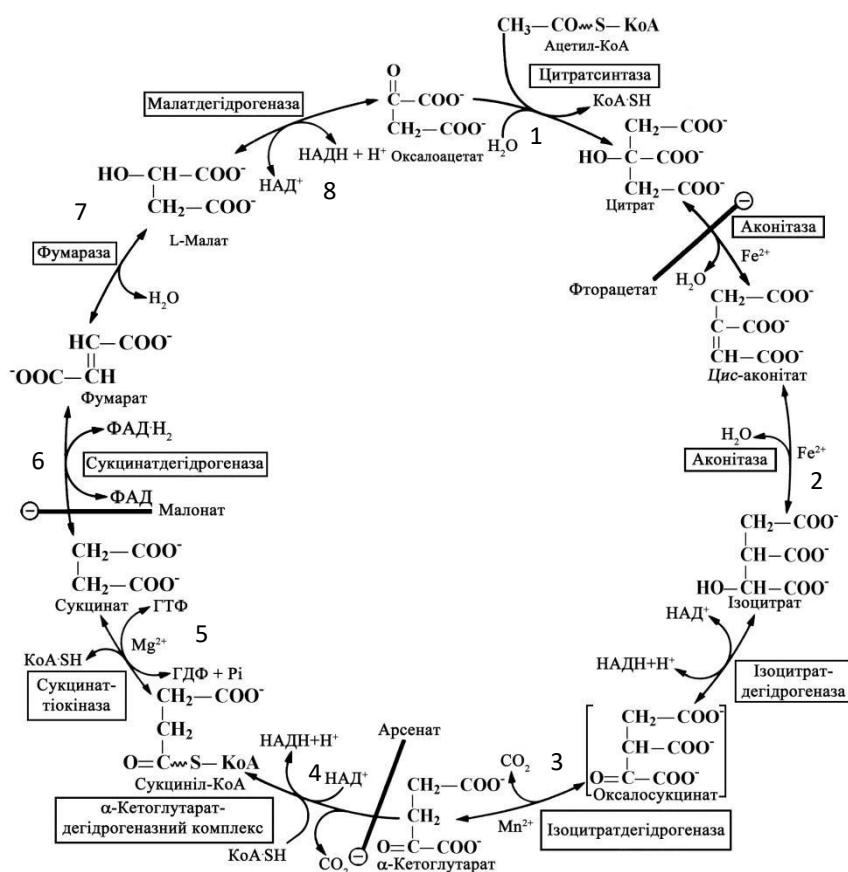


Рисунок 2.3 – Схема ЦТК (цифри відповідають номерам реакцій) [32]

Гриби здатні засвоювати як органічні, так і неорганічні сполуки азоту. Азот відіграє вирішальну роль у метаболізмі, оскільки входить до складу клітинних стінок, білків, пептидів, амінокислот, нуклеїнових кислот тощо. Гриби можуть використовувати нітрати завдяки ферменту нітратредуктазі, хоча часто його активність є адаптивною. Однак багато досліджень показують, що *Cyclocybe aegerita* краще накопичує біомасу при використанні органічних джерел азоту, зокрема амінокислот, пептидів і білків. Це необхідно враховувати при складанні рецептур поживних середовищ для культивування [29].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Кінцевим продуктом біотехнологічного процесу є зерновий посівний міцелій *Cyclocybe aegerita* (опенька тополевого), фасований у герметичні пакети по 0,5 кг із повітропроникним фільтром. Такий формат забезпечує стерильність середовища та постійний доступ кисню, необхідного для дихання гриба.

Компонентний склад препарату [29]:

1. Посівний міцелій гриба *Cyclocybe aegerita* – основна біологічно активна складова, що забезпечує заселення субстрату та подальше формування плодових тіл. Міцелій має добре розвинену гіфальну структуру з вираженим білим або світло-кремовим забарвленням.

2. Зерно пшениці – слугує твердим носієм і джерелом поживних речовин (вуглеводів, білків, мінералів) для росту і розгалуження міцелію.

3. Гіпс (CaSO_4) – стабілізує кислотність, перешкоджає злипанню зерен, покращує аерацію.

4. Вапно (CaCO_3) – регулює рівень рН поживного субстрату та сприяє пригніченню розвитку контамінаційної мікрофлори.

Вміст основної активної речовини, міцелію *Cyclocybe aegerita*, складає не менше 30 - 40% масової частки від загальної маси препарату. Допоміжні

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						27
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

речовини – зерно, гіпс, вапно – складають решту суміші, зазвичай уміст зерна становить понад 55 - 65%, гіпсу та вапна – до 2 - 3%. Домішки – вільна волога та стороння органіка – не більше 1% [29].

Перед фасуванням міцелій проходить контроль на наявність сторонньої мікрофлори (бактерій, пліснявих грибів), яка може негативно вплинути на якість інокуляту. Препарат має відповідати вимогам мікробіологічної чистоти – допустима кількість сторонніх мікроорганізмів не перевищує 10^2 КУО/г [34].

Препарат також перевіряється на наявність залишкових хімічних речовин, що могли бути внесені на етапах стерилізації або обробки – зокрема залишків дезінфектантів або важких металів. Вміст токсичних елементів не перевищує допустимі норми згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я України № 368 від 13.05.2013 «Про затвердження Державних гігієнічних правил і норм "Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах"» [33].

2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Зерновий посівний міцелій опенька тополевого *Cyclocybe aegerita*, будучи активною формою базидіального гриба, чинить істотний вплив на біохімічні процеси, що відбуваються у природних екосистемах, зокрема у ґрунті, деревині та рослинних залишках. Основним біологічно активним компонентом у препараті є життєздатний вегетативний міцелій гриба, який вносить значний вклад у мінералізацію органічних речовин та перетворення біогенних елементів.

Cyclocybe aegerita є типово сапротрофним організмом, який бере участь у розкладанні складних полімерів, таких як целюлоза, геміцелюлоза та лігнін, що містяться у деревині та рослинному детриті. Міцелій гриба синтезує потужні ферментні комплекси — целюлази, ксиланази, лігнази, лаккази, які каталізують гідроліз та окиснення вищезгаданих речовин [35]. У результаті деструкції утворюються простіші сполуки — моносахариди,

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

фенольні кислоти, спирти — що далі використовуються іншими мікроорганізмами або самим грибом у процесі метаболізму.

За рахунок своєї ферментативної активності *Cyclocybe aegerita* активно включається у кругообіг вуглецю: перетворює полімерні вуглецеві сполуки у доступні форми, сприяє накопиченню гумусових речовин у ґрунті та вивільненню CO₂. Одночасно гриб бере участь у кругообігу азоту, оскільки здатен засвоювати органічні форми азоту – амінокислоти, білки, перетворюючи їх на мінеральні сполуки – аміак, нітрати, що доступні для вищих рослин та ґрунтової мікрофлори [19].

У процесі росту міцелію *Cyclocybe aegerita* синтезуються вторинні метаболіти, які можуть мати антибактеріальну або фунгістатичну дію, пригнічуючи ріст патогенної або конкурентної мікрофлори. Це змінює мікробне співтовариство середовища, сприяючи стабілізації біоценозу [35].

Деякі штами *Cyclocybe aegerita* демонструють здатність до біодеградації токсичних сполук, включаючи феноли, поліциклічні ароматичні вуглеводні та важкі метали, завдяки наявності ферментів типу лакказ і пероксидаз, які окислюють токсиканти до менш небезпечних форм [35].

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Опеньок тополевий *Cyclocybe aegerita* є добре вивченим представником базидіальних грибів, який активно досліджується в генетичних, біохімічних і молекулярно-біологічних аспектах. Геном цього гриба був секвенований та анотований, що зробило *C. aegerita* моделлю серед дереворуйнівних їстівних грибів для вивчення фізіології росту, метаболізму вторинних метаболітів і синтезу плодових тіл. Його також використовують для виробництва біотехнологічно значущих ферментів UPO-типу (неспецифічні пероксигенази, ЕС 1.11.2.1), а також він служить джерелом корисних природних продуктів, таких як біоактивні терпеноїди та риботоксини. Використовуючи послідовність геному *C. aegerita* AAE-3, нещодавно було розроблено набір молекулярно-генетичних інструментів, який тепер дозволяє використовувати функціонально-генетичні підходи до цього гриба [36].

3.1.1. Особливості геному

Геном *C. aegerita* має відносно невеликий розмір – приблизно 43 Мб – і містить понад 13 тисяч генів [38]. Особливу увагу в геномі приділено генам, які кодують ферменти деградації лігноцелюлози (лігнінази, целюлази, геміцелюлази), що мають вирішальне значення у природному середовищі для розкладання деревини та в процесах ферментативного перетворення субстрату в умовах культивування. Щодо кількості генів, що кодують CAZymes, які відповідають за деградацію лігніну, *C. aegerita* демонструє більшу схожість з грибами білої гнилі, ніж з грибами-деструкторами опалого листя, включаючи 18 генів, що кодують неспецифічні пероксигенази, та три гени

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Арк.	Аркушів
Розроб.		Голосава І.В.				Д	30	89
Конс.								
Керівн.		Дзигун Л.П.						
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

пероксидази, що знебарвлюють барвники, розширюючи свій лігноцелюлолітичний апарат [37].

У *C. aegerita* виявлені плейотропні гени, що беруть участь у морфогенезі плодових тіл, включаючи гени, відповідальні за клітинну диференціацію, сигнальні шляхи MAP-кіназ та регуляцію транскрипції [39].

Інформація про плазмід у *C. aegerita* є обмеженою, однак деякі дослідження припускають можливість наявності позахромосомних генетичних елементів, характерних для певних штамів або умов культивування. У більшості випадків активність генів, що регулюють біосинтез міцелію, контролюється ядерними генами, а не плазмідами [40].

Для *C. aegerita* створено первинні генетичні карти, зокрема карти QTL (quantitative trait loci), пов'язані з продуктивністю та морфологією плодових тіл [42]. Існують також трансформаційні системи на основі бактерій, що дозволяють створення рекомбінантних штамів та вивчення функцій окремих генів [43].

3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу

Механізми експресії генів у *C. aegerita* включають класичну регуляцію транскрипції, у якій задіяні активатори та репресори, що реагують на присутність певних сполук у середовищі. Наприклад, індуктори гідролітичних ферментів сприяють експресії відповідних генів, тоді як легкозасвоювані джерела вуглецю можуть діяти як репресори цього процесу (механізм вуглецевої катаболітної репресії) [41].

Генетичні дослідження свідчать про наявність механізмів індукованої експресії ферментів залежно від умов середовища, таких як джерела вуглецю, наявність індукторів (наприклад, ксилану або целюлози), рівень освітлення та доступність кисню [39].

Мейотична та мітотична експресія генів демонструє два різні піки експресії під час розвитку плодового тіла. Мітоз і мейоз є ключовими для

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

росту та розвитку грибів: мітоз призводить до проліферації клітин на ранніх стадіях розвитку плодового тіла, тоді як мейоз відбувається в базидіях, які розташовані в пластинках, для утворення спор. За допомогою мікрочипів досліджували транскрипцію, що відбуваються в пластинках *C. aegerita* протягом часу, який охоплює мейоз. Було виявлено, що 2721 ген демонстрував зміну інтенсивності зондування протягом шести часових точок навколо мейозу. Використовуючи дикаріотичний міцелій як референс, було ідентифіковано 886 генів, які експресувалися лише в тканині пластинок; ці гени включали основні мейотичні компоненти. Гени індукувалися послідовними хвилями під час мейозу; ці хвилі були згруповані в 9 кластерів на основі траєкторій експресії. Кластери розділили гени на функціональні групи, наприклад, ті, що необхідні для профазі I або споруляції на ранніх і пізніх етапах часового ряду відповідно. Ранні гени також включали ті, що пов'язані з реплікацією ДНК, організацією та регуляцією цитоскелета. Експресія генів, що кодують рибосомальні білки, була високою аж до каріогамії, після чого вона починала знижуватися і більше не відновлювалася. Це може відображати припинення синтезу білка, коли плодове тіло вступає у фазу споруляції [44].

Завдяки своїй генетичній вивченості, *Cyclocybe aegerita* є зручним об'єктом для подальшої оптимізації біотехнологічних процесів, спрямованих на отримання зернового посівного міцелію високої якості.

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Високопродуктивний промисловий штам *Cyclocybe aegerita* повинен бути здатний швидко формувати міцелій, ефективно колонізувати субстрат, мати високу біомасу, генетичну стабільність, а також високий потенціал до утворення плодових тіл у контрольованих умовах культивування. Такий продуцент має бути стійким до конкурентної мікрофлори, мати покращені біохімічні властивості, наприклад, інтенсивніший синтез ферментів для

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

деградації субстрату та покращену енергоефективність клітинного метаболізму.

Для покращення продуктивності штамів *Cyclocybe aegerita* застосовується низка класичних і сучасних методів біотехнології, таких як: природний та штучний добір, індукований мутагенез, гібридизація, методи генної та клітинної інженерії, також існують специфічні методи для Basidiomycota і поєднання перерахованих методів.

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Природний добір є одним з найстаріших методів, що застосовується для селекції штамів з природної популяції з метою виявлення ізолятів з найкращими властивостями (швидке зростання, утворення плодових тіл, ферментативна активність тощо). Штучний добір дозволяє виділити найперспективніші культури за певними морфологічними та культуральними ознаками [30].

Природний добір використовується на початкових етапах селекційної роботи. Він полягає у відборі найкращих штамів *Cyclocybe aegerita*, що вже існують у природному середовищі — з дерев тополі, верби, осики, іноді з інших листяних порід. Ці ізоляти можуть відрізнятись за такими властивостями: швидкість росту міцелію на субстраті; здатність до утворення плодових тіл; стійкість до забруднень (особливо бактеріальних); здатність до колонізації зернового середовища; активність ферментних систем (целюлази, лаккази тощо). Зібрані дикі ізоляти культивуються в лабораторії, де порівнюються їх культуральні та морфологічні характеристики. Найкращі з них можуть використовуватись для подальшого розмноження або підлягати додатковій селекції [45].

Штучний добір є наступним етапом після ізоляції природних форм або може застосовуватись для вдосконалення вже використовуваних штамів. Його основна мета — відбір клонів чи спорових рекомбінантів з найвищою

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

продуктивністю для використання в промисловості. Критерії для відбору високопродуктивного штаму: швидке наростання міцелію на зерновому субстраті; висока конкурентоспроможність у стерильному середовищі; гомогенність культури (однорідна колонія без дегенерацій); генетична стабільність у процесі багаторазового субкультивування [29].

Іноді в межах одного штаму спостерігається клонова варіабельність. Клони, які утворюються з вегетативних клітин, можуть дещо відрізнятись за метаболічною активністю або толерантністю до стресів. Їх культивують і тестують окремо. Клони з найвищими темпами росту або утворенням біомаси зберігаються у колекції як перспективні продуценти [46].

Умови вирощування можуть створювати селективний тиск (наприклад, термічний стрес, зміна рН, наявність антагоністів), що дозволяє відібрати штами, які краще переносять зовнішні навантаження [46]. Це особливо важливо для міцелію, який тривалий час зберігається у герметичних упаковках із зерном.

Використовують спеціальні живильні середовища, які моделюють умови майбутнього субстрату, наприклад, середовища з вмістом пшеничного зерна, гіпсу та вапна. Штами, які показують найвищу адаптацію, наприклад, швидке обростання середовища або стабільність росту, підлягають подальшому розмноженню [29].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Індукований мутагенез є ефективним методом для створення високопродуктивних штамів *Cyclocybe aegerita*, він дозволяє отримати суперпродуценти з покращеними властивостями, такими як підвищена швидкість росту міцелію, ефективніше засвоєння субстрату та посилений синтез ферментів.

Було проведено сайт-спрямований мутагенез ліпоксигенази Lox1 з *C. aegerita* для покращення її активності щодо довголанцюгових поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), це точкове редагування

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

нуклеотидної послідовності гена *in vitro* з подальшим перенесенням у експресійну систему. Мутації були цілеспрямовано внесені у дві амінокислотні позиції (W330 та V581) гена ліпоксигенази Lox1, які, за структурним моделюванням, беруть участь у взаємодії з довголанцюговими ПНЖК. Об'єктом селекції була підвищена специфічна активність ферменту до ПНЖК C20:3 (ω -3) і C22:3 (ω -3). Основний механізм виникнення здатності до суперпродукування — це зміна активного центру ферменту, що покращила його здатність взаємодіяти з довгими жирними кислотами, підвищення рівня активності ферменту. Ці зміни потенційно сприяють ефективнішому каталізу, але не впливали безпосередньо на експресію гена [47].

Сайт-спрямований мутагенез був проведений із використанням методу PCR (полімеразної ланцюгової реакції) з праймерами, що містили задані мутації. Після внесення мутацій гени експресували в *E. coli* для подальшого аналізу активності. Повторного впливу не проводили, бо мутації були цілеспрямованими і поодинокими. Обробці підлягала ДНК гена Lox1 *in vitro*. Після модифікації, гени експресувалися в бактеріальній системі *E. coli*, тому клітини *Cyclocybe aegerita* безпосередньо не оброблялися. Це було зроблено для зручності експресії та очищення ферменту.

У результаті було отримано два мутантні варіанти ферменту: W330L та V581, які демонстрували підвищену специфічну активність до ПНЖК C20:3 (ω -3) та C22:3 (ω -3) відповідно. Зокрема, варіант W330L показав приблизно на 20% вищу активність до C20:3 (ω -3), а варіант V581 — приблизно у 2,5 рази вищу активність до C22:3 (ω -3) порівняно з диким типом ферменту.

Ці результати свідчать про ефективність використання сайт-спрямованого мутагенезу для покращення ферментативних властивостей *C. aegerita*, що може мати практичне значення у біотехнологічних застосуваннях, зокрема у виробництві специфічних оксіліпінів.

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						35
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів

На сьогоднішній день існують дослідження, які стосуються генетичної характеристики та селекції *Cyclocybe aegerita*, однак конкретних публікацій, що описують практичне застосування гібридизації для створення високопродуктивних штамів цього гриба, наразі не виявлено.

Проте, у дослідженні, присвяченому аналізу В-типу спарювальних локусів у *Cyclocybe aegerita* та *C. salicicola*, було виявлено значну генетичну різноманітність серед штамів *C. aegerita*. Дослідники ідентифікували два В-локуси спарювання у *C. aegerita*, що дозволяє розрізняти штамми за типами спарювання. Це відкриває можливості для селекції та гібридизації шляхом контрольованого схрещування монокаріотичних міцеліїв з різними типами спарювання [48].

Таким чином, хоча практичне застосування гібридизації для *C. aegerita* ще не було детально описано в науковій літературі, наявні генетичні дослідження створюють основу для подальших робіт у цьому напрямку.

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Метод отримання продуцента *Cyclocybe aegerita* 2231 (рис. 3.1), придатного для промислового використання, включає кілька основних етапів, які забезпечують високу продуктивність, стабільність та відповідність біотехнологічним вимогам.

Початковий етап – вибір штаму. Для даної роботи взято штам *Cyclocybe aegerita* 2231, так як дослідження [26] щодо перспективи впровадження у промислове виробництво штамів *Cyclocybe aegerita* 2229, 2230, 2231 показало найвищі результати за вирощування штаму 2231 з тривалістю вегетації та морфогенезу 42 - 43 доби і з біологічною ефективністю 59 - 60 %. Плодові тіла штаму *C. aegerita* 2231 характеризувалися найбільшим вмістом протеїнів 19 % та золи 7 %.

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Наступний етап – отримання чистої маткової культури. Плодові тіла їстівних грибів збирають на стадії повного дозрівання спор. Серед них відбирають екземпляри, що відповідають морфологічним ознакам обраного

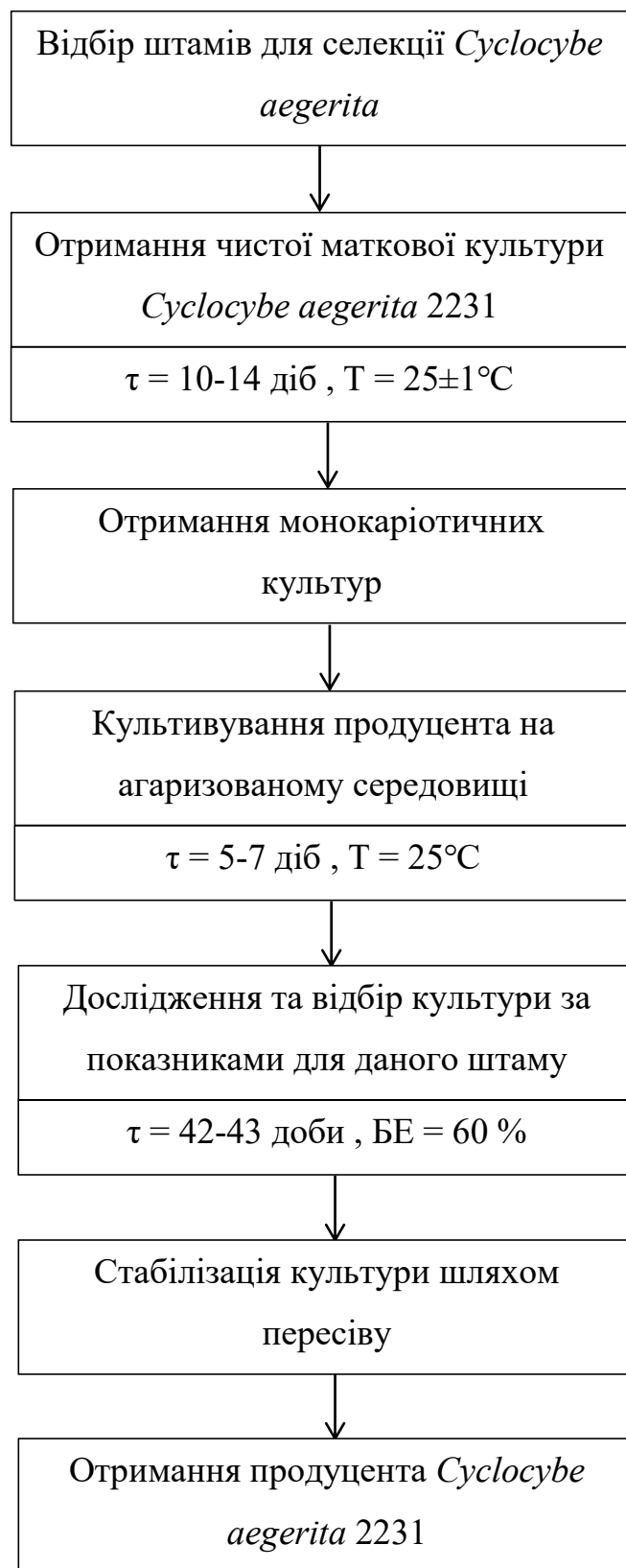


Рисунок 3.1 – Схема отримання продуцента *Cyclocybe aegerita* 2231

штаму. Для отримання культури використовують або висів спор на поживне середовище в чашках Петрі, або здійснюють виділення стерильного фрагмента м'якоті з середини шапинки гриба, попередньо розламавши плодове тіло стерильним інструментом. Після проростання спор чи росту міцелію, сформовану маткову культуру зберігають при температурі 0–2 °С у холодильнику [45].

Агаризоване поживне середовище, що використовується в селекційній роботі, це PDA (картопляно-декстрозний агар) [49]. Готують скошене поживне середовище у пробірках, заповнюючи їх наполовину, закриваючи гумовими пробками та стерилізуючи при 101 °С протягом 25–30 хвилин. Після охолодження під кутом пробірки з середовищем використовують для вирощування і зберігання маткової культури. На поживному агаризованому середовищі культивування відбувається протягом 5 - 7 діб при 25°С [45].

Матковий міцелій застосовують для швидкого одержання посівного матеріалу. Його висівають на чашки Петрі, стабілізують культуру шляхом множинного пересіву, а згодом переносять на субстрати на основі зерна пшениці, ячменю, вівса, проса, кукурудзи або компост [45].

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевий продукт виробництва являє собою комерційний посівний зерновий міцелій гриба опенька тополевого *Cyclocybe aegerita*, виготовлений згідно з ДСТУ 7316:2013 – «Міцелій їстівних грибів субстратний. Технічні умови» та запакований і фасований у герметичні пакети по 0,5 кг з мікрофільтром для доступу повітря. Продукція належить до категорії «Посівний матеріал для культивування їстівних грибів». Виробництво продукції сертифіковане відповідно до НАССР.

Зерновий посівний міцелій *C. aegerita* призначений для використання у промисловому, фермерському та приватному грибовництві з метою отримання плодових тіл опенька тополевого. Може застосовуватись у відкритому ґрунті, теплицях, тунельних приміщеннях або в контрольованих умовах індустриального культивування.

Зерновий посівний міцелій *C. aegerita* представлений сипкою зерновою масою (пшенична культура), повністю оброслою міцелієм білого або кремово-білого кольору. У зрілих культурах можливе утворення повітряних гіф. Зерно помірно вологе, але не липке, характерний грибний запах, без сторонніх запахів бродіння, цвілі чи гниття. Вологість зернового субстрату 50–55%. Стандартизація посівного міцелію опенька тополевого *C. aegerita* в Україні здійснюється відповідно до ДСП 4.4.4.070-2000.

Зерновий міцелій фасується у герметичні поліетиленові пакети по 0,5 кг, обладнані повітропроникним мікрофільтром, що відповідає ДСТУ 7275:2012, для забезпечення газообміну та запобігання контамінації. Пакети повинні бути стерильними та одноразовими. На кожному пакеті наносяться такі відомості: назва продукції; штам гриба та його реєстраційний номер

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Голосова І.В.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Конс.							
Керівн.		Дзигун Л.П.					
					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Арк.	Аркушів
					Д	39	89

(*Cyclocybe aegerita* 2231); дата інокуляції; термін придатності; номер партії; умови зберігання; назва і адреса виробника.

Продукт, фасований у пакети, по 100 одиниць вкладають у групову тару у вигляді картонних коробок згідно з ГОСТ 12301-81. Допускаються перевезення автомобільним транспортом у холодильниках або термобоксах при температурі від 0 до +8 °С. Не допускається заморожування. Посівний міцелій зберігається в холодильниках за температури від +2 до +6 °С до 6 місяців, за відносної вологості повітря 60–70%, без доступу прямих сонячних променів [23].

При зміні кольору на жовто-бурий, появи крапель вологи, затхлого або кислого запаху, появи плям сторонньої мікрофлори (зелений, чорний, рожевий, оранжевий кольори) – продукція підлягає утилізації шляхом автоклавування при 121–130 °С [45].

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів для даного виробництва наведена в табл. 4.1.

Таблиця 4.1 – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1. Агар	ГОСТ 16280-2002	Всі показники згідно з ГОСТ	Компонент ПС
1.2. Вапно	ДСТУ Б В.2.7-90:2011	Всі показники згідно з ДСТУ	Домішки до субстрату

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
1.3. Вода питна	ДсанПіН №383	Кольоровість, каламутність, смак, запах, рН, жорсткість, вміст мікроорганізмів, бактерій згідно з ДСанПіН	Для приготування розчинів, компонент ПС, для приготування зерна
1.4. Гіпс	ДСТУ Б В.2.7-82:2010	Всі показники згідно з ДСТУ	Домішки до субстрату
1.5. Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Масова частка вологи не більше 9%	Компонент ПС
1.6. Екстракт дріжджів	ДСТУ 4812:2007	Мікробіологічна чистота	Компонент ПС
1.7. Пептон	ДСТУ CEN/TR 15215-3:2022	Масова частка істинного пептону не менше 70%	Компонент ПС
1.8. Пшеничне зерно	ДСТУ 3768:2019	Всі показники згідно з ДСТУ	Основа субстрату
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Вода технічна	ДСТУ 7525:2014	Відсутність механічних часточок	Для мийки обладнання та приміщень, для подачі в сорочку, для генерації насиченої водяної пари
2.2. Кислота сульфатна (H ₂ SO ₄)	ГОСТ 2184-2013	Масова частка моногідрату 92,5-94,0%	Для регулювання рН, для нейтралізації стічних вод та відходів
2.3. Натрій гідроксид (NaOH)	ГОСТ 4328-77	Масова частка NaOH не менше 99%	Для регулювання рН
2.4. Натрій їдкий технічний	ДСТУ ISO 3196-2001	Всі показники згідно з ДСТУ	Для нейтралізації стічних вод та відходів, для приготування розчину каустичної соди

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
2.5. Спирт етиловий	ГОСТ 5962-97	Масова частка спирту (70%)	Для дезінфекції
2.6. Пропінол	ТУ 6-14-300-80	Всі показники згідно з ТУ	Піногасник
2.7. Хлорамін Б	ТУ 9392-031-00203306-97	Всі показники згідно з ТУ	Для дезінфекції
3. Матеріали:			
Базальтове супертонке волокно	ТУУВ.2.7-26.8-32673353-001:2007	Всі показники згідно з ТУ	Для індивідуального фільтру
3.1. Картонні коробки	ГОСТ 9142-2014	Зовнішній вигляд, цілісність, розміри	Групова тара для готового продукту
3.2. Колби	ДСТУ ISO 1042:2005	Всі показники згідно з ДСТУ	Для відновлення музейної культури
3.3. Мембрани	ДСТУ EN 15836-2:2020	Всі показники згідно з ДСТУ	Для процесу фільтрації
3.4. Пакети поліетиленові з мікрофільтром	ГОСТ 12302-83	Всі показники згідно з ГОСТ	Пакування готового продукту
3.5. Папір етикеточний	ГОСТ 7625-86	Зовнішній вигляд	Нанесення на пакети
3.6. Пробірки	ДСТУ ISO 1042:2005	Всі показники згідно з ДСТУ	Для відновлення музейної культури
3.7. Скловолокно	ГОСТ 19170-2001	Всі показники згідно з ГОСТ	Для головного фільтру та фільтру попередньої очистки
3.8. Спецодяг	ДСТУ 7239:2011	Зовнішній вигляд	Для персоналу
3.9. Стрічка клеєва на паперовій основі	ГОСТ 18251-87	Всі показники згідно з ГОСТ	Для заклеювання коробок
3.10. Фарба штемпельна	ГОСТ 6-15-459-90	Всі показники згідно з ГОСТ	Для маркування продукту

Кінець таблиці 4.1

4. Напівпродукти:			
1	2	3	4
4.1. Музейна культура	Згідно з виробничим регламентом виробництва	Усі показники відповідно до регламенту	Для отримання посівного інокуляту

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу починається з проходження санітарного інструктажу, навчання з охорони праці та техніки безпеки, а також ознайомлення з особливостями виконання обов'язків на конкретному робочому місці. Забезпечення належного санітарного стану працівників включає медичне обстеження під час працевлаштування та планові медичні огляди відповідно до вимог Міністерства охорони здоров'я України — не рідше одного разу на рік або за потреби. За необхідності також може проводитися диспансеризація для виявлення хронічних хвороб та перевірки дотримання гігієнічних вимог [50].

Усі співробітники біотехнологічного виробництва, незалежно від досвіду, спеціалізації чи стажу роботи, повинні проходити інструктаж з техніки безпеки. Перед початком роботи персонал також проходить навчання та підготовку, а в разі потреби – перепідготовку в процесі роботи. Особлива увага приділяється кваліфікації працівників [50].

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та мийних розчинів

Під час приготування мийних та дезінфекційних засобів слід використовувати речовини, дозволені для застосування у біотехнологічній практиці, такі як розчин хлораміну Б, розчин їдкого натру, біомой та інші [51].

ДР 1.2.1. Підготовка розчину хлораміну Б

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						43
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Як дезінфікуючий засіб застосовується хлорамін Б у формі порошку з вмістом активного хлору 25–30%. Для приготування дезінфекційного розчину порошок розчиняють у воді у пропорції 1:20, витримуючи 10 хвилин. Подача хлораміну Б у реактор Р-5 здійснюється за допомогою дозатора Д-1, а вода подається дозатором Д-2. Готові водні розчини зберігають свою активність протягом 15 днів, тому їх можна заготовляти заздалегідь [51].

Готовий розчин хлораміну Б направляють до ДР 1.3.2, ДР 1.3.1.

ДР 1.2.2. Підготовка розчину каустичної соди

Готують розчин 1% лугу. Для цього NaOH та вода питна подаються у реактор Р-6 дозаторами Д-3 та Д-4 відповідно та перемішують протягом 10 хв. Готовий розчин каустичної соди направляють до ДР 1.3.2, ДР 1.3.1.

Дезінфікуючі та миючі розчини використовують при щоденному та генеральному прибиранні та для миття обладнання і комунікацій. [51]

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Перед початком кожної зміни здійснюється щоденне прибирання, яке включає в себе такі стадії: обробка та витирання робочих поверхонь, зон штуцерів та отворів, миття підлоги, потім висушують або витирають насухо та проводять дезоброблення. Відпрацьовані розчини направляються на етап ЗВ 12.

Після завершення прибирання проводиться мікробіологічна перевірка: здійснюють змиви з поверхонь і вимірюють кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) у повітрі. Вміст КУО/м³ повітря має відповідати класам чистоти приміщень: не більше 1 для класу А, 10 — для В, 100 — для С і 200 — для D. Якщо показники перевищують допустимі значення, концентрацію дезінфікуючого засобу збільшують [50].

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання виконується раз на 30 днів або за призначенням мікробіолога. Воно включає очищення стін, стелі, дверей, меблів та важкодоступних ділянок. Для генерального прибирання

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

використовують миючі та дезінфікуючі розчини з ДР 1.2.1 та ДР 1.2.2. Відпрацьовані розчини направляються на ЗВ 12.

Після завершення — знову проводиться мікробіологічний контроль за вже згаданими критеріями. Кількість КУО/м³ повітря повинна відповідати класам А, В, С і D чистоти приміщень не більше 1, 10, 100 і 200 відповідно. При невідповідності умовам збільшують концентрацію дезінфікуючого розчину [50].

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття вузлів обладнання та комунікацій

Використовуючи готовий розчин з ДР 1.2.2, обладнання та комунікації занурюють у цей розчин та постійно перемішують протягом 30 хв за температури 50°C. Рідкі відходи направляють до збірника нейтралізації.

ДР 1.4.2. Дезінфекція обладнання та комунікацій

Обробка внутрішніх поверхонь здійснюється готовим розчином хлораміну Б з ДР 1.2.1. Рідкі відходи направляють до збірника нейтралізації.

ДР 1.4.3. Ополіскування обладнання та комунікацій

Після дезінфекції обладнання промивають питною водою з температурою близько 50 °C протягом 10 хвилин. Усі рідкі відходи відправляються до системи нейтралізації.

ДР 1.4.4. Перевірка на герметичність

Перед початком експлуатації проводиться огляд обладнання на предмет цілісності: перевіряють торцеві ущільнення, вентилі та інші вузли. Герметичність системи перевіряється шляхом нагнітання повітря під тиском 0,2 МПа. Після герметизації усіх клапанів і фітингів тиск контролюють протягом 30 хвилин за манометром. Якщо показник залишається стабільним, обладнання вважається готовим до роботи.

ДР 1.4.5. Стерилізація обладнання і комунікацій

Стерилізація апаратів та трубопроводів здійснюється насиченою парою під тиском $0,25 \pm 0,05$ МПа при температурі 124 ± 4 °C протягом однієї

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

години. Ефективність процесу стерилізації визначається стерилізуючим коефіцієнтом, який повинен знаходитися в межах 90–560.

Після завершення процесу парову арматуру закривають, вводять стерильне повітря, а в сорочку подають холодну воду. Охолодження проводять до температури 30–40°C і надлишкового тиску 0,003–0,005 МПа. У процесі охолодження утворюється конденсат, який відправляють до ЗВ 12.

ДР 2. Підготовка вентиляційного та стерильного повітря

ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери

Забір повітря з атмосфери здійснюється через повітрозбірник ПЗ-7 трубчастої конструкції, розташований на висоті 8–10 метрів. Повітря проходить через решітку в трубопроводі, яка затримує великі механічні частинки, такі як гілки, листя тощо. Повітрозбірники повинні бути встановлені в місцях із мінімальним рівнем забруднення та запиленості. Вологість, температура і кількість мікроорганізмів у повітрі залежать від пори року, погодних умов і географічного розташування [51].

ДР 2.2. Груба очистка повітря

Головна мета грубого очищення повітря — усунення аерозольних і механічних частинок, а також запобігання абразивному зношенню компресорів. Для цього застосовується фільтр грубого очищення Ф-8, який встановлюють на всмоктувальній лінії перед вентилятором або компресором. Це дозволяє видаляти частинки розміром понад 5 мкм. Ефективність такого очищення становить 80% [51].

Тверді відходи йдуть до ЗВ 12.

ДР 2.3. Стиснення та транспортування повітря

Для подолання опору системи та виконання інших виробничих потреб повітря необхідно стискати.

У процесі стискання в компресорі К-9 температура повітря підвищується з 15–25°C на вході до 120–150°C на виході, а також зростає його вологість. Після компресора повітря має такі характеристики: тиск — 0,35 МПа, температура — 120–150°C, вологість — 70% [51].

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
						46
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2.4. Стабілізація термодинамічних показників

Оскільки температура повітря підвищується до 120–150°C, його необхідно охолодити в теплообміннику Т-10. Для охолодження використовують технічну воду з температурою 10°C. При надходженні повітря у міжтрубний простір, воно зневоднюється до 40-60% вмісту вологи у ресивері Рс-11. Тиск повітря падає до 0,2 МПа. Конденсат прямує на переробку до ПВ 11 [51].

ДР 2.5. Очистка повітря на головному фільтрі

Попереднє очищення повітря від мікробних організмів проводиться за допомогою головного фільтра Ф-12 із ефективністю очищення $E = 95\%$. Фільтрувальний матеріал замінюють двічі на рік, а за необхідності, у разі забруднення, зволоження чи інфікування, проводять позачергову заміну [51].

Усі відходи до ЗВ 12.

ДР 2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

На завершальному етапі очищення повітря від контамінантів застосовують індивідуальні фільтри, що забезпечують ступінь очищення $E = 99,9999\%$ [51].

ДР 3. Підготовка поживного середовища

Підготовка поживного середовища є ключовим етапом у виробничому процесі, оскільки від його якості залежить ефективність подальшого отримання посівного матеріалу, а також кінцевого продукту в процесі культивування. Основними вимогами до складу поживного середовища є доступність компонентів, економічність, добра засвоюваність продуцентом і забезпечення його необхідними джерелами вуглецю та азоту.

У даному виробничому процесі інокулят опенька тополевого *Cyclocybe aegerita* готують у качалкових колбах і посівному апараті з використанням ефективного комплексного поживного середовища YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) бульйону, до складу якого входять наступні компоненти [52]:

- екстракт дріжджів - 0,2%;

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- пептон - 0,2%;
- глюкоза - 2%;
- вода питна - інше.

Це середовище забезпечує необхідні джерела вуглецю та азоту, що сприяє активному росту міцелію та є вигідним з економічної точки зору. Дослідження [52] показали, що культивування *Cyclocybe aegerita* в YPD середовищі при температурі 25°C у темряві протягом 8 днів призводить до значного накопичення міцеліальної біомаси. Глюкоза в даному середовищі виступає як основне джерело легко засвоюваного вуглецю для грибів. Пептон, який містить пептиди, амінокислоти та інші азотовмісні сполуки, слугує як джерело азоту. Гриби можуть використовувати їх для синтезу власних білків, ферментів, нуклеїнових кислот тощо. Дріжджовий екстракт – також містить певну кількість амінокислот та нуклеотидів, але більше служить як джерело вітамінів та факторів росту, хоча й додатково може забезпечувати незначну кількість азоту.

Для відновлення музейної культури на чашках Петрі, використовують поживне середовище, приготоване в умовах лабораторії.

ДР 3.1. Приготування розчину термостабільних компонентів

Дріжджовий екстракт і пептон – це складні поживні компоненти, багаті на амінокислоти, пептиди, вітаміни групи В і мінерали. Вони зазвичай добре переносять стандартне автоклавування [53].

Термостабільні компоненти, дріжджовий екстракт і пептон, подають дозатором Д-13 у реактор Р-15 з коефіцієнтом заповнення 0,9, після чого змішуються за допомогою мішалки разом із водою, яка подається дозатором Д-14.

ДР 3.2. Стерилізація розчину термостабільних компонентів

Розчин термостабільних компонентів стерилізують в реакторі Р-15 протягом 20 хвилин при температурі 121°C і тиску 0,1 МПа. Після стерилізації розчин подається до ДР 6.2 та ДР 7.

ДР 3.3. Приготування розчину термолабільних компонентів

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Глюкоза – це відновлювальний цукор, що легко деградує при високих температурах [54], спільна наявність білкових компонентів (пептон, дріжджовий екстракт) і цукрів призводить до реакції Майяра при нагріванні, при якій утворюються сполуки, що не засвоюються продуцентами і можуть пригнічувати їх ріст [55], тому готують і стерилізують розчин глюкози окремо.

Глюкоза термолабільна, тому її розчин готується наступним чином: глюкоза подається дозатором Д-18 до реактора Р-20, оснащеному мішалкою, після чого змішується разом із водою, яка подається дозатором Д-19.

ДР 3.4. Стерилізація розчину термолабільних компонентів

Розчин термолабільних компонентів стерилізують в реакторі Р-20 протягом 10 хвилин при температурі 121°C і тиску 0,1 МПа, і одразу охолоджують. Після стерилізації розчин подається до ДР 6.2 та ДР 7.

ДР 3.5. Підготовка розчинів для регулювання рН

Для досягнення необхідного рівня рН у поживному середовищі на виробництві готуються окремі розчини кислоти та лугу, які застосовуються для його коригування.

ДР 3.5.1. Підготовка лужного розчину

Для регулювання рН середовища використовується 20% розчин гідроксиду натрію. Його отримують шляхом внесення точно зваженої кількості речовини дозатором Д-23 у реактор Р-25 та доведення об'єму питною водою до заданого рівня.

ДР 3.5.2. Підготовка розчину кислоти

Розчин кислоти, необхідний для корекції рН, забезпечується 2-нормальним розчином сірчаної кислоти. Його готують у реакторі Р-28, розбавляючи концентровану кислоту водою до потрібної концентрації.

ДР 4. Підготовка піногасника

У процесі підготовки посівного матеріалу як піногасник застосовується пропінол у концентрації 0,05% від загального об'єму середовища. Його стерилізація відбувається шляхом нагрівання протягом 2 годин при

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

температурі 125–128 °С. Після охолодження піногасник додається до середовища в міру потреби.

ДР 5. Підготовка зернового субстрату

Зерновий міцелій є матеріалом що використовується досить широко в інтенсивному грибівництві.

ДР 5.1. Приготування зернового субстрату для посівного міцелію

Зерно перед посівом міцелію готують наступним чином: на 1 кг зерна пшениці заливають $1,5 \cdot 10^{-3}$ м³ води і відварюють 1 год. Потім зливають воду, охолоджують та висушують.

ДР 5.2. Змішування зернового субстрату з добавками

До зерна додають дозатором Д-37 вапно та гіпс, у відношенні зерна до цієї суміші як 20:1, для регуляції кислотності, запобігання злипання, покращення структури і рН.

ДР 5.3. Стерилізація зернової суміші

Стерилізація здійснюється в реакторі Р-36 при температурі 120-127°С протягом 1,5-3 годин і тиску 0,1 МПа. Після стерилізації субстрат охолоджують до температури 24-26°С, який є придатним до посіву матковим міцелієм.

ДР 6. Отримання посівного матеріалу

ДР 6.1. Відновлення музейної культури

Відновлення музейної культури *Cyclocybe aegerita* 2231 проводять шляхом перенесення музейної культури на чашки Петрі, здійснюючи культивування на поживному середовищі протягом 7 діб при температурі 25°С. Основою поживного середовища на даному етапі є середовище YPD із додаванням до нього агару в концентрації 15 кг/м³. Після повного обростання середовища міцелієм маткову культуру зберігають в холодильній камері при температурі 0-2°С.

ДР 6.2. Вирощування посівного матеріалу в колбах

Отриманий на попередньому етапі посівний матеріал переносять з агаризованого середовища на рідке YPD та проводять культивування в

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

качалкових колбах Кл-39. Процес триває протягом 96 год за температури 25 °С при частоті обертання качалки 180 об/хв.

ДР 7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Для культивування продуцента в інокуляторі посівний матеріал із колб вносять до поживного середовища реактора Р-40 об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,75, куди попередньо були додані компоненти поживного середовища, та піногасник за потреби. Тривалість культивування складає 48 год при механічному перемішуванні з частотою 140 об/хв та аерації 1 дм³/дм³·хв. Температура проведення процесу 25 °С при рН 6,0 - 6,5 та тиску 0,03-0,05 МПа.

ТП 8. Виробниче культивування

На даній стадії відбувається інокуляція зернового субстрату в стерильних умовах та подальша інкубація.

ТП 8.1. Інокуляція

У реактор Р-36, де знаходиться стерилізований та охолоджений до температури 25 °С зерновий субстрат, подається інокулят – чиста культура рідкого маточного міцелію. На 0,5 кг субстрату витрачається 50 см³ інокуляту.

ТП 8.2. Фасування інокуюваного зернового субстрату

Інокуюваний зерновий субстрат у стерильних умовах фасують у спеціальні ємності для промислового вирощування — герметичні поліетиленові пакети з мікрофільтром для контакту міцелію з очищеним повітрям.

ТП 8.3. Інкубація

Ємності із зерном та міцелієм переносять у камери з контрольованими умовами з температурою 24-26°С, де проходить подальше обростання зерна. Вологість чистого повітря в цей період 60%. На зерні міцелій розростається не рівномірно, з різною швидкістю і в процесі його росту передбачено 1-2 разове струшування зерна. Через 3-4 тижні міцелій готовий до подальшого

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

використання. Зерновий міцелій зберігають в холодильній камері при температурі 2-4°C.

ТП 9. Перевірка якості посівного міцелію

Поява чорних, зелених або оранжевих плям на посівному міцелії свідчить про порушення стерильних умов під час виробництва. У випадку виявлення ознак бактеріального або грибкового зараження контаміновані ємності з зерновим міцелієм негайно ізолюють від основної партії, піддають автоклавуванню при температурі 130 °C протягом двох годин. Після цього заражений субстрат вивозять за межі лабораторії, а використаний посуд ретельно миють і просушують.

Ознакою старіння зернового міцелію є поява жовтуватих крапель на поверхні, потемніння гіфів, висихання зерна та зменшення його маси.

ПМВ 10. Фасування та пакування продукту

ПМВ 10.1. Маркування та пакування готового продукту

Пакети маркують нанесенням етикеток.

ПМВ 10.2. Фасування продукту в контейнери

Готові марковані герметичні пакети масою по 0,5 кг з посівним міцелієм фасують в картонні контейнери по 100 штук в кожний, відправляють на зберігання.

ПВ 11. Переробка відходів

На стадії переробки виробничих відходів проводиться регенерація фільтрувальних матеріалів, які надходять із різних етапів технологічного процесу. Відновлення здійснюється шляхом промивання гарячою водою з додаванням дезінфекційних засобів.

ЗВ 12. Знешкодження відходів та викидів

У процесі виробництва утворюється значний об'єм відходів, які потребують ретельного знешкодження з метою збереження екологічної чистоти кінцевого продукту. До таких відходів належать: непридатний посівний матеріал, промивні води, вентиляційні та технологічні викиди повітря, забраковані партії продукції, залишки пакувальних матеріалів тощо.

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Усі вони підлягають утилізації згідно з чинними санітарно-екологічними нормами.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс складається на одну серію виробництва зернового посівного міцелію у пакетах по 0,5 кг, розраховану на інокулятор обсягом 1 м³ (з урахуванням коефіцієнта заповнення 0,75). Матеріальний баланс представлений у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 – Матеріальний баланс виробничої серії

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт	м³		кг	шт	м³
1	2	3	4	5	6	7	8
ДР 5. Підготовка зернового субстрату							
Зерно пшениці	7140			Зерновий субстрат	7280		
Вода питна			10	Втрати (3%)	220		
Вапно	175						
Гіпс	175						
Всього:	7500			Всього:	7500		
ДР 6. Отримання посівного матеріалу							
Поживне середовище від ДР 3			0,018	Посівний матеріал			0,020
Музейна культура			0,003	Втрати (3%)			0,001
Всього:	0,021			Всього:	0,021		
ДР 7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі							

Кінець таблиці 4.2

1	2	3	4	5	6	7	8
Поживне середовище від ДР 3			0,730	Інокулят			0,728
Посівний матеріал від ДР 6			0,020	Втрати (3%)			0,022
Всього:	0,750			Всього:	0,750		
ТП 8. Виробниче культивування							
Зерновий субстрат від ДР 5	7280			Розфасований інокульований субстрат	7207,728	14414	
Інокулят від ДР 7			0,728	Втрати (1%)	73		
Пакети		14414					
Всього:	21694,728			Всього:	21694,728		

4.5. Контроль виробництва

У таблиці 4.3 наведено контрольні точки виробництва посівного зернового міцелію *Cyclocybe aegerita*.

Таблиця 4.3 – Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірок	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР1.1. Підготовка персоналу Км	Персонал, перевірка спецодягу на предмет контамінації	Бактеріологічний контроль (засів на ПС) або візуально	Перед початком зміни	Класи чистоти, КУО/м³: A<1; B≤10; C≤100; D≤200

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР1.2.1. Підготовка розчину Хлораміну Б Кт, Кх	Розчин Хлорамін Б, концентрація розчину	Концентратомі р	Кожну операцію	$Q = 5\%$
ДР1.2.2. Підготовка розчину каустичної соди Кт, Кх	Розчин NaOH, концентрація розчину	Концентратомі р	Кожну операцію	$Q = 1\%$
ДР1.3.1. Щоденне прибирання Кт, Км	Об'єкти приміщення, мікробіологічн ий контроль	Аналіз змиву з поверхонь, аналіз кількості КУО в повітрі	Після прибиран ня	Класи чистоти, КУО/м ³ : $A < 1$; $B \leq 10$; $C \leq 100$; $D \leq 200$
ДР1.3.2. Генеральне прибирання Кт, Км	Об'єкти приміщення, мікробіологічн ий контроль	Аналіз змиву з поверхонь, аналіз кількості КУО в повітрі	Після прибиран ня	Класи чистоти, КУО/м ³ : $A < 1$; $B \leq 10$; $C \leq 100$; $D \leq 200$
ДР1.4.1. Миття вузлів обладнання та комунікацій Кт, Кх	Обладнання та комунікації, температура та час миття	Термометр, годинник	Під час миття	$\tau = 30\text{хв}$, $t = 50^\circ\text{C}$
ДР1.4.2. Дезінфекція обладнання та комунікацій Кт, Км	Обладнання та комунікації, температура, час дезінфекції	Термометр, годинник	Під час дезінфекц ії	$\tau = 30\text{хв}$, $t = 50^\circ\text{C}$
ДР1.4.3. Ополіскува ння обладнання та комунікацій Кт	Обладнання та комунікації, температура та час ополіскування	Термометр, годинник	Під час ополіскув ання	$\tau = 10\text{хв}$, $t = 50^\circ\text{C}$

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР1.4.4. Перевірка на герметичніс ть Кт	Обладнання та комунікації, тиск та час перевірки	Годинник, манометр	Безперерв но під час перевірки	$P = 0,2 \text{ МПа}$, $\tau = 30 \text{ хв}$
ДР1.4.5. Стерилізаці я обладнання та комунікацій Кт, Км	Обладнання та комунікації час стерилізації, ефективність стерилізації	Годинник, мікробіологічн ий контроль	безперерв но під час стериліза ції	відсутність мікробіоти, $\tau = 1 \text{ год}$
ДР 2.1. Забір 2.1. повітря з атмосфери Кт, Кх	Атмосферне повітря, температура, вологість	Термометр, психрометр	Кожну операцію	
ДР 2.2. Груба очистка повітря Кт	Очищене повітря, розмір аерозольних і механічних частинок, ефективність очищення	Датчик запиленості	Двічі на місяць	$d = 5 \text{ мкм}$, $E = 80\%$
ДР 2.3. Стиснення та транспорту вання повітря Кт	Стиснене повітря, тиск, температура, вологість	Манометр, термометр, психрометр	Кожну операцію	$P=0,35 \text{ МПа}$, $t=120-150^\circ\text{C}$, $W = 70\%$
ДР 2.4. Стабілізація термодинам ічних показників Кт	Охолоджене повітря, температура, вологість, тиск	Термометр, психрометр, манометр	Кожну операцію	$t = 25^\circ\text{C}$, $W = 40-60\%$, $P = 0,2 \text{ МПа}$

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 2.5. Очистка повітря на головному фільтрі Кт	Стерильне повітря, ефективність очищення	Датчик запиленості	Двічі на місяць	E = 95%
ДР 2.6. Очищення повітря на індивідуаль ному фільтрі Кт, Км	Стерильне повітря, ефективність очищення, мікробіологіч ний контроль	Датчик запиленості, висів на чашки Петрі	Перед початком виробнич ого процесу	E = 99,99%, КУО ≤ 200 од/м ³
ДР 3.1. Приготуван ня розчину термостабіл ьних компоненті в Кт, Кх	Компоненти ПС в дозаторі, маса	Дозатор	Кожну операцію	Масова частка дріжджового екстракту - 0,2%, пептону - 0,2%
ДР 3.2. Стерилізаці я розчину термостабіл ьних компоненті в Кт, Км	Стерилізовані розчини термостабільн их компонентів, температура, тиск, час, мікробіологіч ний контроль	Термометр, манометр, годинник, мікробіологі чний метод (висів на чашки Петрі)	Кожну операцію	t = 121°C, P = 0,1 МПа, τ = 20хв, відсутність контамінантів
ДР 3.3. Приготуван ня розчину термолабіль них компоненті в Кт, Кх	Компоненти ПС в дозаторі, маса	Дозатор	Кожну операцію	Масова частка глюкози - 2%

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 3.4. Стерилізація розчину термолабільних компонентів в Кт, Км	Стерилізовані розчини термолабільних компонентів, температура, тиск, час, мікробіологічний контроль	Термометр, манометр, годинник, мікробіологічний метод (висів на чашки Петрі)	Кожну операцію	$t = 121^{\circ}\text{C}$, $P = 0,1 \text{ МПа}$, $\tau = 10 \text{ хв}$, відсутність контамінантів
ДР 3.5. Підготовка розчинів для регулювання рН Кх	Розчин кислоти і лугу, концентрація розчину	Концентратомір	Перед початком виробничого процесу	$Q (\text{NaOH}) = 20\%$, $Q (\text{H}_2\text{SO}_4) = 3,5 \%$
ДР 4. Підготовка піногасника Кт, Км	Пропінол, температура, час, мікробіологічний контроль	Термометр, годинник, мікробіологічний метод (висів на чашки Петрі)	Кожну операцію	$t = 128^{\circ}\text{C}$, $\tau = 2 \text{ год}$, відсутність контамінантів
ДР 5.1. Приготування зернового субстрату для посівного міцелію Кт	Процес, температура, час	Термометр, годинник	Кожну операцію	$t = 100^{\circ}\text{C}$, $\tau = 1 \text{ год}$
ДР 5.2. Змішування зернового субстрату з добавками Кт, Кх	Гіпс, вапно, маса	Дозатор	Кожну операцію	Масова частка вапна і гіпсу - 2 %

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 5.3. Стерилізація зернової суміші Кт, Км	Стерильна зернова суміш, температура, час, тиск, мікробіологічний контроль	Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний метод (висів на чашки Петрі)	Кожну операцію	$t = 127^{\circ}\text{C}$, $P = 0,1 \text{ МПа}$, $\tau = 2 \text{ год}$, відсутність контамінантів
ДР 6.1. Відновлення музейної культури Кт, Км	Термостат, культура на скошеному агарі, температура, час, контамінація	Візуальний, термометр, годинник	Кожну операцію	$t = 25^{\circ}\text{C}$, $\tau = 7 \text{ діб}$, відсутність контамінантів
ДР 6.2. Вирощування посівного матеріалу в колбах Кт, Км	Шейкер-інкубатор, культура в колбах, час, частота обертання, температура, контамінація	Візуальний, годинник, тахометр, термометр	Кожну операцію	$n = 180 \text{ об/хв}$ $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\tau = 96 \text{ год}$, відсутність контамінантів
ДР 7. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі Кт, Км	Інокулятор, ПС, повітря, коефіцієнт заповнення, температура, рН, витрата повітря, частота обертання, контамінація	Рівнемір, термометр, рН-метр, витратомір, тахометр, мікробіологічний метод (висів на чашки Петрі)	Кожну операцію	$\phi = 0,75$, $n = 140 \text{ об/хв}$ $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48 \text{ год}$, $a = 1 \text{ дм}^3 / \text{дм}^3 \cdot \text{хв}$ рН 6,0-6,5 відсутність контамінантів
ТП 8. Виробниче культивування Кт, Км	Упаковка, термостат, цілісність упаковки, маса, температура, вологість, час, контамінація	Візуально, ваги, термометр, психрометр, годинник	Кожну операцію	Маса пакета - 0,5 кг, $\tau = 3-4 \text{ тижні}$, $t = 25^{\circ}\text{C}$, $W = 60\%$, відсутність контамінантів

Кінець таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ТП 9. Перевірка якості посівного міцелію Км	Готовий посівний міцелій, контамінація	Візуально	Кожну операцію	Відсутність контамінантів
ПМВ 10. Фасування та пакування продукту Кт	Упаковка, цілісність упаковки, вага фасованих продуктів	Візуально, ваги	Кожну операцію	Пакети масою по 0,5 кг в коробки по 100 шт
ПВ 11. Переробка відходів Кт	Фільтрувальні матеріали, регенерація	Візуальний	Двічі на місяць	Згідно з технологічни м регламентом
ЗВ 12. Знешкодже ння відходів та викидів Кт, Кх	Відходи, ефективність очищення	Візуальний	Кожну операцію	Згідно з чинними санітарно- екологічними нормами

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва посівного зернового міцелію *C. aegerita* подана на 1 аркуші формату А1 у графічній частині дипломного проєкту.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

У біотехнологічному виробництві реактори задіюються на різних етапах — починаючи від допоміжних операцій і закінчуючи основним технологічним процесом та обробкою кінцевого продукту. Для даного проєкту використовується інокулятор на стадії вирощування посівного матеріалу *Cyclocybe aegerita* 2231. Цільовий продукт в даному випадку отримують за рахунок проведення процесу в режимі глибинного культивування в інокуляторі при механічному перемішуванні та аерації.

Застосування методу глибинного культивування забезпечує кращий контроль над процесами біосинтезу, однак потребує точного регулювання технологічних параметрів: температури, рН, тиску, часу культивування тощо. Саме тому вибір конструкції обладнання повинен відповідати біологічним властивостям промислового продуценту для максимального підвищення ефективності його використання [51]. Оптимальними умовами для росту *C. aegerita* 2231 є наступні :

- температура вирощування – 25 °С;
- інтенсивність перемішування – 140 об/хв;
- аерація – 1 м³/м³·хв.

Для реалізації культивування доцільно використовувати апарат для глибинного аеробного вирощування з механічним перемішуванням. Така конструкція забезпечує необхідний рівень гомогенності культурального середовища, підтримання стабільних умов культивування, а також інтенсивне насичення поживного середовища киснем, що є критичним для

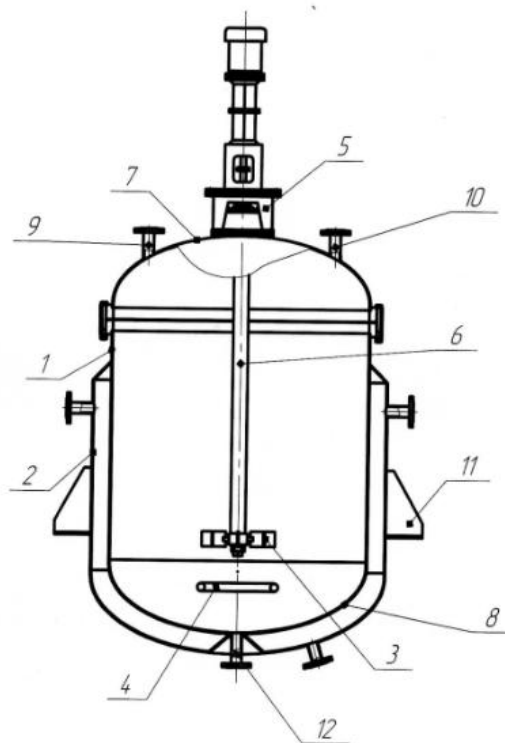
					ДП БТ-1105. 00 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Арк.	Аркушів
Розроб.		Голосова І.В.				Д	61	89
Конс.		Остапенко Ж.І.						
Керівн.		Дзигун Л.П.						
						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		

активного росту аеробного міцелію. Найбільш поширеними у промисловості є реактори з мішалками, оскільки вони забезпечують гнучке регулювання технологічних умов та ефективне насичення культурального середовища киснем і поживними речовинами, що безпосередньо впливає на ріст і метаболічну активність продуцентів. Подавання повітря у такі реактори відбувається через барботер – кільцеву конструкцію з отворами, яка створює потік дрібних бульбашок. Рівномірний розподіл цих бульбашок у середовищі досягається за допомогою мішалки – однієї або декількох, залежно від типу реактора [51].

Мішалки бувають різного типу: турбінні, лопатеві, якірні, рамні чи пропелерні. Культуральна рідина з міцелієм є складною трифазною системою (рідина, газ, тверді частинки), яка змінюється в процесі за своїми реологічними характеристиками. У світовій практиці для подібних систем найчастіше використовують турбінні мішалки з прямими або вигнутими лопатями, які формують радіальний потік, забезпечуючи інтенсивне перемішування та покращення кисневої масообмінної взаємодії [56].

Для аерації середовища в реакторі застосовується барботер кільцевого типу, який у комбінації з турбінною мішалкою гарантує рівномірне насичення культурального середовища киснем [56].

Аналізуючи технологічні вимоги та літературні джерела, для біосинтезу вибрано вертикальний інокулятор із циліндричною обичайкою, еліптичними днищем і кришкою. Схематичне зображення інокулятора з відкритою турбінною мішалкою та кільцевим барботером показано на рис.5.1.



1 – корпус, 2 – сорочка; 3 – мішалка; 4 – барботер; 5 – двигун з приводом; 6 – вал мішалки; 7 – кришка; 8 – днище; 9,10 – штуцери; 11 – опора; 12 – штуцер для зливу продукту

Рисунок 5.1 – Схема інокулятора [56]

Матеріали для виготовлення апарата повинні бути стійкими до кислотного середовища, корозії та хімічних впливів, оскільки робоче середовище має слабокисле значення рН (6,0–6,5). Враховуючи ці вимоги, для виробництва обрано нержавіючу сталь Ст3сп4, яка забезпечує надійність конструкції та стабільну якість цільового продукту під час технологічного процесу. Ущільнення, прокладки, манжети виготовляються з фторопласту або силікону, які витримують автоклавування та не вступають у взаємодію з компонентами середовища, привод мішалки та опора вала — встановлюються поза стерильною зоною, з герметичним сальниковим ущільненням або магнітною муфтою для запобігання інфекціям [51].

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Вихідні дані для розрахунку:

1. Об'єм апарата: $V_p = 1 \text{ м}^3$
2. Коефіцієнт заповнення: $\varphi = 0,75$
3. Час культивування: $\tau = 48 \text{ год}$
4. Температура культивування: $T = 25^\circ\text{C}$
5. Процес аеробний, аерація: $1 \text{ м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{хв}$
6. Тип перемішуючого пристрою: відкрита турбінна мішалка.

Враховуючи невисоку концентрацію компонентів поживного середовища, для розрахунків прийняті теплофізичні характеристики води за температури 25°C :

густина $\rho = 997 \text{ кг/м}^3$

коефіцієнт динамічної в'язкості $\mu = 902 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$

коефіцієнт кінематичної в'язкості $\nu = 0,91 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$

теплоємність $c = 4,185 \cdot 10^3 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$

коефіцієнт теплопровідності $\lambda = 60,85 \cdot 10^{-2} \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$

критерій Прандтля $Pr = 6,22$

поверхневий натяг $\sigma = 719,5 \cdot 10^{-4} \text{ кг/с}^2$

Конструктивний розрахунок

Метою розрахунку є визначення розмірів виробничого інокулятора та його основних конструктивних елементів.

Визначаємо робочий об'єм апарата [56]:

$$V_p = V_n \cdot \varphi, \quad (5.1)$$

$$V_p = 1 \cdot 0,75 = 0,75 \text{ м}^3$$

Отже, згідно з ГОСТ 6533-78 було встановлено інші конструктивні розміри:

Діаметр апарата: $D = 1,2 \text{ м}$

Площа поверхні теплообміну сорочки: $F_p = 3,4 \text{ м}^2$

Висота рівня рідини: $H_p = 0,76 \text{ м}$

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

Діаметр валу мішалки: $d_b = 50$ мм

Висота відбортованої частини: $h_1 = 0,025$ м

Висота еліптичного днища: $h_b = 0,3$ м

Внутрішня поверхня еліптичного днища: $F_{\text{вн.дн}} = 1,66$ м²

Об'єм еліптичного днища: $V_{\text{дн}} = 0,255$ м³

Визначаємо повну висоту днища апарату:

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_b \quad (5.2)$$

$$h_{\text{дн}} = 0,025 + 0,3 = 0,325 \text{ м}$$

Визначаємо об'єм циліндричної частини апарату:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 1 - 2 \cdot 0,255 = 0,49 \text{ м}^3 \quad (5.3)$$

Визначаємо висоту циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{4 \cdot V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot 0,49}{\pi \cdot 1,2^2} = 0,43 \text{ м} \quad (5.4)$$

Розрахунок потужності перемішування

Тиск на вході становить:

$$P_{\text{п}} = P_{\text{к}} + \rho_p \cdot g \cdot H_p \quad (5.5)$$

де $P_{\text{к}}$ – тиск на виході з апарату, приймаємо $P = 1,01 \cdot 10^5$ Па;

$$P_{\text{п}} = 1,01 \cdot 10^5 \text{ Па} + 997 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3} \cdot 9,81 \frac{\text{м}}{\text{с}^2} \cdot 0,76 \text{ м} = 1,08 \cdot 10^5 \text{ Па}$$

Концентрація кисню на виході з інокулятора:

$$y_{\text{к}} = \frac{W_{\text{г}} \rho_{\text{п}} y_{\text{п}} - q_{\text{VC}} V_{\text{п}}}{W_{\text{г}} \rho_{\text{п}} - q_{\text{VC}} V_{\text{п}}} \quad (5.6)$$

де $y_{\text{п}} = 0,232$ - масова частка кисню в атмосферному повітрі;

$q_{\text{VC}} = 5 \cdot 10^{-3}$ питома швидкість масопередачі по кисню, кг $\text{O}_2/\text{м}^3\text{с}$;

$W_{\text{г}} = 0,8$ витрата повітря, що подається в апарат, м³/с;

$\rho = 1,185$ – густина повітря при 25 °С, кг/м³.

$$y_{\text{к}} = \frac{0,8 \cdot 1,185 \cdot 0,232 - 5 \cdot 10^{-3} \cdot 0,75}{0,8 \cdot 1,185 - 5 \cdot 10^{-3} \cdot 0,75} = 0,23$$

Рівноважні концентрації кисню на вході і виході з інокулятора:

$$C_p^n = \frac{\rho_p M_{\text{г}}^p y_{\text{п}}}{M_p m_{\text{px}}} \quad (5.7)$$

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

$$C_p^K = \frac{\rho_p M_r P_{K_y}}{M_p m_{px}} \quad (5.8)$$

де $M_r = 32$ – молекулярна маса кисню;

$M_p = 18$ – молекулярна маса рідини;

$m_{px} = 5,13 \cdot 10^9$ Па – константа фазової рівноваги, що встановлює зв'язок між парціальним тиском кисню в повітрі та його концентрацією в рідкій фазі.

$$C_p^n = \frac{997 \cdot 32 \cdot 1,08 \cdot 10^5 \cdot 0,232}{18 \cdot 5,13 \cdot 10^9} = 0,00866 \text{ кг/м}^3$$

$$C_p^K = \frac{997 \cdot 32 \cdot 1,01 \cdot 10^5 \cdot 0,23}{18 \cdot 5,13 \cdot 10^9} = 0,00803 \text{ кг/м}^3$$

Рівноважна концентрація для системи рідина-повітря:

$$C_p = \frac{C_p^n + C_p^K}{2} = \frac{0,00866 + 0,00803}{2} = 0,00835 \text{ кг/м}^3 \quad (5.9)$$

Поточна концентрація кисню, розчиненого в рідині, в процесі культивування при повному перемішуванні в усіх точках інокулятора:

$$C = 0,1 \cdot C_p = 0,1 \cdot 0,00835 = 0,000835 \text{ кг/м}^3 \quad (5.10)$$

Різниця концентрацій на вході повітря в інокулятор:

$$\Delta C_\sigma = C_p^n - C = 0,00866 - 0,000835 = 0,007825 \text{ кг/м}^3 \quad (5.11)$$

Різниця концентрацій на виході повітря з інокулятора:

$$\Delta C_M = C_p^K - C = 0,00803 - 0,000835 = 0,007195 \text{ кг/м}^3 \quad (5.12)$$

Середня різниця концентрацій:

$$\Delta C_{cp} = \frac{\Delta C_\sigma - \Delta C_M}{\ln \frac{\Delta C_\sigma}{\Delta C_M}} = \frac{0,007825 - 0,007195}{\ln \frac{0,007825}{0,007195}} = 0,007506 \text{ кг/м}^3 \quad (5.13)$$

Об'ємний коефіцієнт масопередачі:

$$K_V = \frac{q_{Vc}}{\Delta C_{cp}} = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{0,007506} = 0,6661 \quad (5.14)$$

Приведена швидкість повітря, віднесена до поперечного перерізу інокулятора:

$$\omega = \frac{4 \cdot W_r}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot 0,8}{\pi \cdot 1,2^2} = 0,71 \text{ м/с} \quad (5.15)$$

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

Для знаходження відносного газовмісту ϕ прийнято значення питомої потужності $N_v = 2$ кВт/м³:

$$\phi = \left(\frac{\omega}{\omega_0} \cdot \phi \right)^{0,5} + 3,42 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{N_v^{0,4} \cdot \rho_p^{0,2}}{\sigma_p^{0,6}} \cdot \left(\frac{\omega}{\omega_0} \right)^{0,5} \quad (5.16)$$

ω_0 - швидкість вільного підйому бульбашок газу, $\omega_0 = 0,3$ м/с;

σ_p - поверхневий натяг рідини, Н/м;

$$\begin{aligned} \phi &= \left(\frac{0,71}{0,3} \cdot \phi \right)^{0,5} + 3,42 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{2^{0,4} \cdot 997^{0,2}}{0,07195^{0,6}} \cdot \left(\frac{0,71}{0,3} \right)^{0,5} \\ &= 1,5384(\phi)^{0,5} + 1,33976 \\ \phi &\approx 4,6611 \end{aligned}$$

Визначаємо газовміст ϕ та перераховуємо значення питомої потужності N_v :

$$N_v = \left(\frac{K_v}{0,171 \cdot \phi^{0,67}} \right)^{\frac{1}{0,44}} = \left(\frac{0,6661}{0,171 \cdot 4,6611^{0,67}} \right)^{\frac{1}{0,44}} = 1,38885^{\frac{1}{0,44}} = 2,1 \quad (5.17)$$

Отримане значення відрізняється від прийнятого менше ніж на 5%, тому приймаємо його.

Розрахунок перемішуючого пристрою

Для інтенсифікації перемішування приймаємо 1 мішалку на 20 м³ культуральної рідини. Тобто число мішалок 0,75 м³ / 20 м³, тому приймаємо 1 мішалку.

Частота обертання мішалки $n = 140$ хв⁻¹. Приймаємо попередньо значення критерія Ейлера для мішалки Eu_m рівним такому для відкритої турбінної мішалки з параметрами:

$$\Gamma_{D0} = \Gamma_{H0} = 3; \Gamma_{n0} = 1; \Gamma_{v0} = 0,3; Eu_m = 6.$$

Потужність перемішування газорідинної системи:

$$N_{p-r} = N_v \cdot V_p = 2 \cdot 0,75 = 1,5 \text{ кВт} \quad (5.18)$$

Діаметр мішалки:

$$d_M = \left[\frac{N_{p-r} \cdot W_r^{0,25}}{0,695 \cdot (Eu_m \cdot \rho_p)^{0,9} \cdot n^{3,15}} \right]^{\frac{1}{5,85}} = \left[\frac{1500 \cdot 0,8^{0,25}}{0,695 \cdot (6 \cdot 997)^{0,9} \cdot (140/60)^{3,15}} \right]^{\frac{1}{5,85}} = 0,612 \quad (5.19)$$

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

Приймається діаметр мішалки зі стандартного ряду 630 мм або 0,63 м.

Уточнюється значення Eu_M – критерій Ейлера:

$$Eu_M = Eu_{M0} \left(\frac{\Gamma_D}{\Gamma_{D0}} \right)^{-0,33} \left(\frac{\Gamma_H}{\Gamma_{H0}} \right)^{0,5} \left(\frac{\Gamma_B}{\Gamma_{B0}} \right)^{0,3} \quad (5.20)$$

де $\Gamma_D = \frac{D}{d_M}$, $\Gamma_H = \frac{H}{d_M}$, $\Gamma_B = \frac{0,1 \cdot D}{d_M}$ – симплекси геометричної подібності;

$$\Gamma_D = \frac{1,2}{0,63} = 1,91, \quad \Gamma_H = \frac{0,76}{0,63} = 1,21, \quad \Gamma_B = \frac{0,1 \cdot 1,2}{0,63} = 0,19$$

$$Eu_M = 6 \left(\frac{1,91}{3} \right)^{-0,33} \left(\frac{1,21}{3} \right)^{0,5} \left(\frac{0,19}{0,3} \right)^{0,3} = 3,8564$$

Визначаємо допоміжний параметр θ :

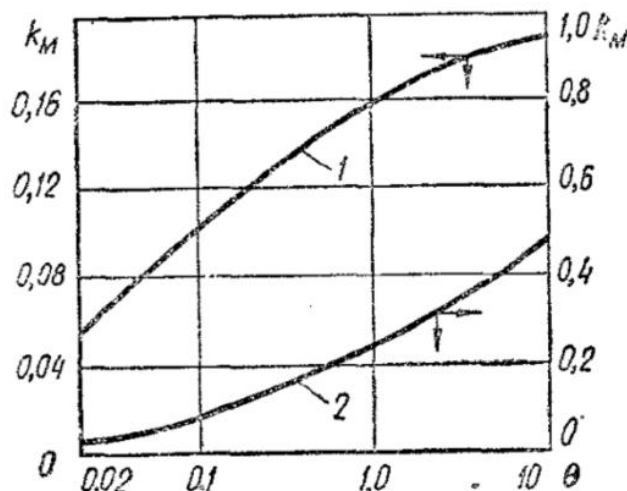
$$\theta = \frac{2 \cdot \Gamma_D \cdot z_n \cdot H}{\varepsilon_M \cdot D \cdot z_M} \cdot \ln \frac{D}{D - 2b} \quad (5.21)$$

b – ширина лопаті мішалки $b = 126$ мм; $\xi_M = 8,4$, z_n – кількість відбиваючих перегородок, $z_n = 4$; z_M – кількість мішалок;

$$\theta = \frac{2 \cdot 1,91 \cdot 4 \cdot 0,76}{8,4 \cdot 1,2 \cdot 1} \cdot \ln \frac{1,2}{1,2 - 2 \cdot 0,126} = 0,272$$

Знову уточнюємо значення

$$Eu_M = 4 \cdot \varepsilon_M \cdot z_M \cdot K_M \quad (5.22)$$



1 – для турбінної та пропелерної мішалок; 2 – для кліткових та рамних

Рисунок 5.2 – Залежність коефіцієнта K_M від θ

З графіка визначаємо, що $K_M = 0,12$, тоді

$$Eu_M = 4 \cdot 8,4 \cdot 1 \cdot 0,12 = 4,032$$

Приймаємо $Eu_M = 4,032$ для подальших розрахунків.

Уточнюємо потужність перемішування газорідинної системи:

$$N_{p-r} = 0,695 \cdot \frac{(Eu_M \cdot \rho_p)^{0,9} \cdot n^{3,15} \cdot d_M^{5,85}}{W_r^{0,25}} \quad (5.23)$$

$$N_{p-r} = 0,695 \cdot \frac{(4,032 \cdot 997)^{0,9} \cdot \left(\frac{140}{60}\right)^{3,15} \cdot 0,63^{5,85}}{0,8^{0,25}} = 1245,3 \text{ Вт} = 1,245 \text{ кВт}$$

Питома потужність перемішування газорідинної системи:

$$N_V = \frac{N_{p-r}}{V_p} = \frac{1,245}{0,75} \approx 1,66 \text{ кВт} \quad (5.24)$$

Значення є близьким до розрахованого раніше, таким чином мішалка забезпечить необхідну швидкість масообміну.

За значенням N_{p-r} вибираємо привід перемішуючого пристрою. Номінальна потужність електродвигуна приводу з урахуванням КПД редуктора ($\eta = 0,9$):

$$N_e = \frac{N_{p-r}}{\eta} = \frac{1,245}{0,9} = 1,383 \text{ кВт} \quad (5.25)$$

Тепловий розрахунок

У ході культивування відбувається реакція з тепловиділенням

$$q = 92,72 \text{ кДж/кг.}$$

Питома швидкість виділення теплоти:

$$q_{vt} = \frac{q \cdot \rho_p}{\tau \cdot 3600} \quad (5.26)$$

де ρ – густина середовища при t_c , кг/м^3 ; τ – час культивування, год.

$$q_{vt} = \frac{92720 \cdot 997}{48 \cdot 3600} = 534,964 \text{ Вт/м}^3$$

Теплове навантаження на охолоджуючу поверхню:

$$Q = (q_{vt} + N_V) \cdot V_p = (534,964 + 2000) \cdot 0,75 = 1901,2 \text{ Вт} \quad (5.27)$$

Більша різниця температур:

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$\Delta t_{\sigma} = t_c - t'_B = 25 - 18 = 7 \text{ }^{\circ}\text{C} \quad (5.28)$$

Менша різниця температур:

$$\Delta t_M = t_c - t''_B = 25 - 23 = 2 \text{ }^{\circ}\text{C} \quad (5.29)$$

де t'_B , t''_B - температура холодного теплоносія на вході і виході із сорочки, (18 та 23 $^{\circ}\text{C}$ відповідно).

Визначення середньої температури:

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_{\sigma} - \Delta t_M}{\ln\left(\frac{\Delta t_{\sigma}}{\Delta t_M}\right)} = \frac{7-2}{\ln\left(\frac{7}{2}\right)} \approx 4 \text{ }^{\circ}\text{C} \quad (5.30)$$

Розрахунок коефіцієнту тепловіддачі від середовища культивування до стінки апарату - α_1 .

Критерій Нуссельта:

$$Nu_1 = 0,76 \cdot Re_M^{0,67} \cdot Pr_c^{0,33} \cdot \left(\frac{\mu_c}{\mu_{ct}}\right)^{0,14} \cdot \left(\frac{\Gamma_D}{\Gamma_{D0}}\right)^{-0,13} \cdot \left(\frac{\Gamma_H}{\Gamma_{H0}}\right)^{0,56} \quad (5.31)$$

Модифікований критерій Рейнольдса:

$$Re_M = \frac{nd^2}{\nu} = \frac{2,33 \cdot 0,63^2}{0,91 \cdot 10^{-6}} = 1,02 \cdot 10^6 \quad (5.32)$$

При розрахунку температура стінки умовно розрахована як:

$$t_{ct} = \frac{t_c + t_B}{2} = \frac{25 + 20,5}{2} = 22,75 \text{ }^{\circ}\text{C}, \quad (5.33)$$

де середня температура теплоносія

$$t_B = \frac{t'_B + t''_B}{2} = \frac{18 + 23}{2} = 20,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \quad (5.34)$$

При температурі 25 $^{\circ}\text{C}$: $\mu = 902 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$

При температурі 22,75 $^{\circ}\text{C}$: $\mu = 946 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с}$

$$\begin{aligned} Nu_1 &= 0,76 \cdot (1,02 \cdot 10^6)^{0,67} \cdot 6,22^{0,33} \cdot \left(\frac{902 \cdot 10^{-6}}{946 \cdot 10^{-6}}\right)^{0,14} \cdot \left(\frac{1,91}{3}\right)^{-0,13} \cdot \left(\frac{1,21}{3}\right)^{0,56} \\ &= 9345,2 \end{aligned}$$

Коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_1 = \frac{Nu_1 \cdot \lambda_c}{D} = \frac{9345,2 \cdot 60,85 \cdot 10^{-2}}{1,2} = 4738,8 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К} \quad (5.35)$$

Розрахунок тепловіддачі від стінки апарату до охолоджуючої води

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В сорочці з прямою спіраллю теплоносії рухається по спіральному каналі, який утворений двома циліндричними поверхнями: внутрішнім діаметром, зовнішнім та витками прямої спіралі. Тобто $D_{\text{свн}}$ – внутрішній діаметр сорочки; $D_{\text{зовн}}$ – зовнішній діаметр апарату; b – ширина спірального каналу; t_c – крок спіралі; h – висота каналу для теплоносія.

Визначення еквівалентного діаметру (визначального розміру):

$$h = 0,1 \cdot D = 0,1 \cdot 1,2 = 0,12 \text{ м} \quad (5.36)$$

де $b = 0,05 \text{ м}$.

Площа перетину каналу:

$$f = h \cdot b = 0,12 \cdot 0,05 = 0,006 \text{ м}^2 \quad (5.37)$$

Змочений периметр:

$$\Pi = 2(h + b) = 2(0,12 + 0,05) = 0,34 \text{ м} \quad (5.38)$$

Еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{4 \cdot f}{\Pi} = \frac{4 \cdot 0,006}{0,34} = 0,0706 \text{ м} \quad (5.39)$$

Витрати охолоджуючої води:

$$G_B = \frac{Q}{c_B \cdot (t_B'' - t_B')} = \frac{1901,2}{4190 \cdot (23 - 18)} = 0,091 \text{ кг/с} \quad (5.40)$$

де $c_B = 4190 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність охолоджуючої води при середній температурі t_B ($20,5^\circ\text{C}$).

Швидкість течії води у каналі:

$$w_B = \frac{G_B}{f \cdot \rho_B} = \frac{0,091}{0,006 \cdot 998} = 0,015 \text{ м/с} \quad (5.41)$$

Критерій Рейнольдса для води:

$$Re_2 = \frac{0,015 \cdot 0,0706}{1 \cdot 10^{-6}} = 0,11 \cdot 10^4 \quad (5.42)$$

Критерій Нуссельта:

$$Nu_2 = 0,021 \cdot Re_2^{0,8} \cdot Pr_B^{0,4} \cdot \left(\frac{Pr_B}{Pr_{\text{ст}}} \right)^{0,25} \cdot X \quad (5.43)$$

X – коефіцієнт, що враховує кривизну спіралі:

$$X = 1 + 3,54 \cdot \left(\frac{d_{\text{екв}}}{D} \right) = 1 + 3,54 \cdot \left(\frac{0,0706}{1,2} \right) = 1,21 \quad (5.44)$$

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

$$Pr_B = 6,94, Pr_{CT} = 6,58$$

$$Nu_2 = 0,021 \cdot (0,11 \cdot 10^4)^{0,8} \cdot 6,94^{0,4} \cdot \left(\frac{6,94}{6,58}\right)^{0,25} \cdot 1,21 = 15,151$$

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки апарату до охолоджуючої води:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_B}{d_{екв}} = \frac{15,151 \cdot 60 \cdot 10^{-2}}{0,0706} = 128,76 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К} \quad (5.45)$$

Розрахунок коефіцієнту теплопередачі:

$$K_0 = \frac{1}{\frac{1}{4738,8} + \frac{0,008}{45} + \frac{1}{128,76}} = 122,62 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К} \quad (5.46)$$

$$\delta_{CT} = 8 \text{ мм} = 0,008 \text{ м}$$

$$\lambda_{CT} = 45 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$$

Коефіцієнт теплопередачі з урахуванням забруднення поверхні:

$$K = K_0 \cdot \varphi_z = K_0 \cdot 0,9 = 122,62 \cdot 0,9 = 110,36 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К} \quad (5.47)$$

Поверхня охолодження:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{cp}} = \frac{1901,2}{110,36 \cdot 4} = 3,24 \text{ м}^2 \quad (5.48)$$

При цьому стандартна площа поверхні теплообміну сорочки для інокулятора об'ємом 1 м³ становить 3,4 м².

Отже, розрахована площа теплообміну, є меншою ніж стандартна, тому вона забезпечує необхідну температуру у інокуляторі протягом його роботи.

Висота розміщення сорочки:

$$H_p = \frac{F}{\pi \cdot D} = \frac{3,24}{\pi \cdot 1,2} = 0,9 \text{ м} \quad (5.49)$$

Розрахунок газорозподільчого пристрою

Мета розрахунку барботера полягає у визначенні його конструктивних розмірів.

Об'ємні витрати повітря у інокуляторі:

$$V_r = w_r \cdot \frac{\pi D^2}{4} = 0,04 \cdot \frac{\pi 1,2^2}{4} = 0,045 \quad (5.50)$$

де w_r – приведена швидкість повітря в апараті, $w_r = 0,04 \text{ м/с}$

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

Внутрішній діаметр труби барботера $d_{б.в}$ розраховується за швидкістю газу у ній $w_{\text{б}} = 20$ м/с:

$$d_{б.в} = \sqrt{4 \cdot \frac{V_r}{\pi \cdot w_{\text{б}}}} = \sqrt{4 \cdot \frac{0,045}{20\pi}} = 0,054 \text{ м} \quad (5.51)$$

Приймаємо для барботеру трубу діаметром $d_{б.з} \times s = 60 \times 3$ мм.

Середній діаметр барботера:

$$D_{cp} = 6d_{б.з} = 6 \cdot 0,06 = 0,36 \text{ м} \quad (5.52)$$

Висота розміщення барботера під мішалкою

$$h_{\text{б}} = 0,25d_m = 0,25 \cdot 0,63 = 0,16 \text{ м} \quad (5.53)$$

Швидкість газу у отворах барботеру

$$w_0 = 3,4 \sqrt{\frac{d_{б.в} \rho_p}{\rho_r}} = 3,4 \sqrt{\frac{0,054 \cdot 997}{1,185}} = 22,92 \text{ м/с} \quad (5.54)$$

Кількість отворів у барботері:

$$z_0 = \frac{4 \cdot V_r}{\pi d_0^2 w_0} = \frac{4 \cdot 0,045}{\pi \cdot 0,005^2 \cdot 22,92} \approx 100 \quad (5.55)$$

Якщо отвори розмістити по колу діаметром D_{cp} , то крок їх розміщення буде:

$$t = \frac{\pi D_{cp}}{z_0} = \frac{\pi \cdot 0,36}{100} = 0,011 \text{ м} \quad (5.56)$$

Крок виходить більше 10 мм, тому розміщуємо в 1 ряд.

Розрахунок глибини воронки

Висота параметра завантаження апарата:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 \quad (5.57)$$

$$\gamma = 8 \cdot \frac{0,76}{1,2} + 1 = 6,06$$

Параметр гідравлічного опору мішалки E :

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_m R_{\text{ец}}^{0,25}} \quad (5.58)$$

$$E = \frac{6,06}{8,4 \cdot 1 \cdot (1,12 \cdot 10^{12})^{0,25}} = 0,000701$$

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

де ξ_M – коефіцієнт гідравлічного опору мішалки (для турбінної відкритої 8,4 м); z_M – кількість мішалок на одному валу.

$$R_{\text{ец}} = \frac{nd_M^2}{v_p^2} = \frac{2,33 \cdot 0,63^2}{(0,91 \cdot 10^{-6})^2} = 1,12 \cdot 10^{12} \quad (5.59)$$

За значенням параметру E встановлюємо параметр розподілення швидкості $\psi_1 = -2$.

Глибина воронки:

$$h_B = \frac{Bn^2d_M^2}{2} = \frac{24 \cdot 2,33^2 \cdot 0,63^2}{2} = 25,86 \text{ м} \quad (5.60)$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{gp} = H_p - h = 0,76 - 0,112 = 0,648 \quad (5.61)$$

де h – висота встановлення мішалки над днищем.

Оскільки $h_B > h_{gp}$, то в апараті встановлюються перегородки.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Жоден виробничий процес не може бути реалізований без виконання низки допоміжних операцій, що вимагають використання відповідного технічного оснащення. Від правильного вибору такого обладнання значною мірою залежить загальна ефективність виробництва .

До складу допоміжного обладнання належать змішувачі для приготування поживних середовищ, ємності для зберігання рідин, мірні ємності, дозувальні пристрої, а також насосне устаткування. Насоси відіграють ключову роль у транспортуванні рідких середовищ, необхідних для забезпечення процесу культивування [51].

Насоси призначені для створення безперервного потоку рідини і класифікуються на три основні типи: лопатеві, роторні та поршневі. Вибір конкретного типу насоса обумовлений характером перекачуваної речовини та вимогами до процесу. У випадках, коли витрати рідини є відносно невеликими, а висота подачі — помірна, доцільно застосовувати відцентрові насоси [51].

Однією з важливих вимог до насосного обладнання є забезпечення герметичності, що виключає можливість контамінації культуральної рідини та її потрапляння у навколишнє середовище. З огляду на це, оптимальним варіантом є використання герметичних відцентрових насосів типу ХГВ. Їх конструктивна особливість полягає у відсутності ущільнювальних елементів — сальників або торцевих ущільнень, що мінімізує ризик забруднення під час подачі або відведення рідини. Додатковою перевагою таких насосів є система змащування підшипників самою перекачуваною рідиною, що дозволяє уникнути потрапляння сторонніх речовин до робочого середовища [51].

Розрахунок напору насоса

$$H = \frac{P_2 - P_1}{\rho \cdot g} + H_r + h_v = \frac{1,087 \cdot 10^5 - 1,01 \cdot 10^5}{997 \cdot 9,81} + 0,76 = 1,547 \text{ м} \quad (5.62)$$

де P_1 – тиск в апараті, з якого перекачується рідина ($1,01 \cdot 10^5$ Па); P_2 – тиск в апараті, у який подається рідина ($1,087 \cdot 10^5$ Па), H_r – висота, на яку піднімається рідина у апараті (0,76 м).

Розрахунок потужності насоса:

Корисна потужність на переміщення середовища:

$$N_1 = \frac{\rho \cdot g \cdot H_1 \cdot Q}{1000} = \frac{997 \cdot 9,81 \cdot 1,856 \cdot 0,0024}{1000} = 0,044 \text{ кВт} \quad (5.63)$$

H – напір насосу:

$$H_1 = 1,2H = 1,2 \cdot 1,547 = 1,856 \text{ м} \quad (5.64)$$

Q – подача (витрата) рідини, що приблизно становить $0,0024 \text{ м}^3/\text{с}$.

Потужність двигуна на вихідному валу при установленому режимі роботи:

$$N = \frac{N_1}{\eta_H \cdot \eta_n} = \frac{0,044}{0,4} = 0,11 \text{ кВт} \quad (5.65)$$

де η_H, η_n – коефіцієнти корисної дії відповідно насосу (0,4, для відцентрового насосу за малої і середньої подачі) та передачі від електродвигуна до насосу (1, оскільки електродвигун безпосередньо з'єднаний з валом насоса).

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

Потужність двигуна від мережі:

$$N_{дв} = \frac{N}{\eta_{дв}} = \frac{0,11}{0,8} = 0,14 \text{ кВт} \quad (5.66)$$

де $\eta_{дв}$ – коефіцієнт корисної дії електродвигуна.

Розраховуємо потужність насоса для врахування можливих перенавантажень:

$$N_{уст} = \beta \cdot N_{дв} = 1,5 \cdot 0,14 = 0,21 \text{ кВт} \quad (5.67)$$

де β – коефіцієнт запасу потужності в залежності від величини $N_{дв}$.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Охорона праці на мікробіологічному підприємстві є комплексом правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів, спрямованих на забезпечення безпеки, збереження життя, здоров'я та працездатності працівників у процесі трудової діяльності [57].

На мікробіологічних підприємствах, де мають справу з живими мікроорганізмами, біологічно активними речовинами, а також хімічними реагентами, питання охорони праці особливо актуальні. Працівники можуть піддаватися дії шкідливих факторів біологічного, хімічного та фізичного походження.

Підприємства біотехнологічної галузі належать до об'єктів мікробіологічного та хімічного напрямків, де активно використовуються кислоти, луги, солі та різноманітні мікроорганізми. Ці чинники можуть становити загрозу для здоров'я персоналу, викликаючи алергічні реакції або професійні захворювання. Крім того, частина речовин, що застосовуються у виробничому процесі, мають пожежо- чи вибухонебезпечні властивості, що вимагає посиленого контролю за дотриманням вимог охорони праці. На мікробіологічних підприємствах до основних шкідливих та небезпечних виробничих факторів належать:

- біологічні: мікроорганізми, їх токсини, спори;

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- хімічні: дезінфекційні засоби, хімічні реагенти, пари кислот і лугів;
- фізичні: підвищений рівень шуму, вібрації, температура, ультрафіолетове випромінювання, тиск;
- психофізіологічні: монотонність праці, відповідальність за точність процесів [58].

Планування кожного робочого місця повинно враховувати обсяг викидів шкідливих речовин, пилу, газів, рівень шуму та вібрацій, а також характеристики використовуваного обладнання і організацію робочого простору, зокрема проходів. Усі ці параметри мають відповідати вимогам чинних нормативно-технічних документів.

На підприємстві передбачено зберігання легкозаймистих та горючих рідин, зокрема етанолу. Для забезпечення їх безпечного зберігання в резервуарах і цистернах встановлюють дихальні клапани та системи протипожежного захисту. Особлива увага приділяється умовам зберігання хімічно активних речовин, таких як кислоти та луги [60].

Виробниче обладнання повинно відповідати нормам безпеки праці при експлуатації відповідно до технічної документації та технологічного регламенту. Щоб запобігти утворенню іскор, елементи обладнання, зокрема приводи мішалок, шестерні та підшипники валів, виготовляють з матеріалів, які не створюють іскру — наприклад, з алюмінію, міді або пластику. Загальні вимоги до безпеки обладнання регламентуються стандартом ГОСТ 12.2.003-91.

Дотримання технологічного регламенту є ключовою умовою безпечного ведення виробничих операцій. Повітря, що виводиться з інокулятора та виробничих реакторів, містить велику кількість мікроорганізмів і побічних продуктів, тому потребує обов'язкової фільтрації. З цієї причини приміщення, де працює відповідне обладнання, мають бути герметичними. У процесі сушіння та подрібнення кінцевого продукту утворюються дрібнодисперсні частинки, які можуть формувати вибухонебезпечні аерозольні суміші. Отже, дробильні установки також

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

повинні бути герметизованими та обладнаними системами механізації для зниження ризиків.

На мікробіологічних підприємствах проводять заходи охорони праці. До них відносять організаційні та технічні заходи. Організаційними заходами можуть бути інструктажі з охорони праці (вступний, первинний, періодичний, позаплановий); регулярне навчання та перевірка знань з охорони праці; ведення документації та інструкцій відповідно до характеру виконуваних робіт. Технічними заходами можуть бути герметизація апаратури та систем транспортування біоматеріалів; використання витяжних шаф, ламінарних боксів, стерилізаційного обладнання; автоматизація та дистанційне керування небезпечними процесами; контроль параметрів повітря, температури та вологості. Кожний працівник повинен мати засоби індивідуального захисту, до яких відносять одяг (халати, комбінезони, біозахисні костюми), респіратори, маски, окуляри, захисні рукавички, бахіли, головні убори [58].

На мікробіологічних підприємствах можуть виникати надзвичайні ситуації. До потенційних надзвичайних ситуацій відносять витік біологічно небезпечних агентів, аварії з викидом токсичних речовин, пожежі в лабораторіях або виробничих зонах. У разі надзвичайних ситуацій потрібно негайно повідомити керівника зміни або відповідальну особу, провести евакуацію персоналу відповідно до плану евакуації, ізолювати зону зараження або витоку, використовувати аварійний комплект засобів індивідуального захисту, надати першу допомогу постраждалим, та повідомити відповідні органи (ДСНС, медичні служби, санітарно-епідеміологічні служби) [59].

Промислові мікробіологічні підприємства є потенційно небезпечними об'єктами для довкілля через використання біологічних агентів, хімічних реагентів, а також утворення значних обсягів рідких, твердих та газоподібних відходів. У зв'язку з цим на таких виробництвах встановлюються суворі вимоги до захисту навколишнього природного середовища, які

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

регламентуються Законами України «Про охорону навколишнього природного середовища», «Про управління відходами», «Про охорону атмосферного повітря», а також санітарними нормами та галузевими стандартами [61-63].

Очищення повітряних викидів, що утворюються під час технологічних процесів, є однією з найскладніших і найбільш трудомістких задач екологічної безпеки. Такі викиди формуються на етапах сушіння, біосинтезу та в процесі вентиляції виробничих приміщень. Для їх ефективної обробки передбачено багатоступеневу систему очищення [51].

Основним засобом запобігання забрудненню атмосферного повітря є герметизація обладнання. Додатково застосовують різноманітні апарати — окремі та каскадні циклони, гідроциклони, пилоосаджувальні камери, тканинні та електрофільтри, а також скрубери [56]. Особливої уваги потребують викиди з ферментерів, оскільки вони можуть містити живі мікроорганізми. Для їх очищення використовують спеціальні фільтри з попереднім охолодженням газової фази, зменшенням вологості на вологовловлювачах, а потім — повторним підігрівом повітря з метою запобігання зволоженню фільтраційного матеріалу. Повітря, що видаляється вентиляційними системами, очищується за допомогою фільтрів на основі волокнистих матеріалів. Також активно використовуються абсорбери й адсорбери, які забезпечують додаткове очищення повітря перед його викидом через розсіювальні труби [51,56].

У виробничому процесі отримання цільового продукту споживається значна кількість води. Внаслідок цього утворюються стічні води, які містять залишки мінеральних солей, мікроорганізмів, органічних речовин та інших домішок. Перед скиданням у каналізацію такі стоки підлягають обов'язковій нейтралізації та подальшому очищенню на локальних очисних спорудах [63].

Рівень забруднення стічних вод визначають, зокрема, за показниками хімічного споживання кисню (ХСК) та біологічного споживання кисню (БСК). Для забезпечення ефективного очищення в промисловості

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

застосовуюють комплексний підхід, що включає механічні, хімічні, фізико-хімічні та біологічні методи очищення [62].

Креслення загального виду апарату

Креслення загального виду інокулятора представлено на аркуші формату А1 у графічній частині дипломного проєкту.

Апаратурна схема технологічного процесу

Апаратурна схема технологічного процесу виробництва посівного зернового міцелію представлена на 1 аркуші формату А1 у графічній частині дипломного проєкту.

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. У проєкті виробництва посівного зернового міцелію було обрано продуцент *Cyclocybe aegerita* 2231 із біологічною ефективністю 60 %.

2. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Cyclocybe aegerita* 2231 обрано склад поживного середовища для вирощування інокуляту продуцента, що включає дріжджовий екстракт, пептон і глюкозу, та для його виробничого культивування на основі зернового субстрату. Було визначено такі параметри культивування: температура 25 °С, перемішування при 140 об/хв, тривалість 48 год, аерація 1 м³/м³·хв, рН 6,0 - 6,5. тиск 0,03-0,05 МПа.

3. Було зроблено аналіз методів селекції промислових продуцентів серед базидієвих грибів та запропоновано схему отримання *Cyclocybe aegerita* 2231.

4. Відповідно до визначених властивостей продукту, було запропоновано технологічну схему виробництва посівного зернового міцелію. Для реалізації даного технологічного процесу визначене відповідне апаратурне оснащення.

5. Розраховано матеріальний баланс для однієї серії продукту, що виготовляється за один виробничий цикл. Показано, що з 0,728 м³ інокуляту та 7280 кг зернового субстрату, враховуючи продуктивність штаму і втрати, можна отримати 7207,728 кг посівного зернового міцелію запакованого в поліетиленові пакети по 0,5 кг у кількості 14414 штук.

6. Обґрунтовано вибір конструкції інокулятора об'ємом 1 м³ для виробничого культивування, який обладнаний барботером та турбінною мішалкою. Надійність та працездатність інокулятора підтверджують технологічний та конструктивний розрахунки.

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Голосова І.В.			ВИСНОВКИ		
Конс.							
Керівн.		Дзигун Л.П.					
					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
					Стадія	Арк.	Аркушів
					Д	81	89

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Cyclocybe aegerita: Systematics, Etymology, Habitat, Description. An Eco-sustainable World. URL: https://antropocene.it/en/2022/11/10/cyclocybe-aegerita-2/?utm_source=chatgpt.com (дата звернення: 10.05.2025).
2. Qualitative characteristics of the fungus Cyclocybe aegerita strains 2229, 2230, 2231 IBK under industrial cultivation conditions / I. Bandura et al. PLANT AND SOIL SCIENCE. 2021. Vol. 12, no. 3. URL: <https://doi.org/10.31548/agr2021.03.0085> (дата звернення: 26.04.2025).
3. Robert B. Beelman, Daniel J. Royse. Six Steps to Mushroom Farming. Mushroom Science and Technology. URL: <https://web.archive.org/web/20111002202509/http://mushroomspawn.cas.psu.edu/SixSteps.shtml> (дата звернення: 26.04.2025).
4. David M. Beyer. Basic Procedures for Agaricus Mushroom Growing. College of Agricultural Sciences, Agricultural Research and Cooperative Extension. URL: <https://web.archive.org/web/20070921154907/http://www.americanmushroom.org/agaricus.pdf> (дата звернення: 26.04.2025).
5. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник/ М.Д. Мельничук, О.Л.Кляченко, В.В.Бородай, Ю.В.Коломієць. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. - 252 с.
6. Аналіз ринку вирощування грибів в Україні. Інвестиції в Україні. URL: <https://inventure.com.ua/uk/analytics/investments/analiz-rinku-viroshuvannya-gribiv-v-ukrayini> (дата звернення: 26.04.2025).
7. Тарасюк Л., Тарасюк В. Все про гриб глива (вешенка). Журнал Агросвіт України. URL: <https://auv.com.ua/27-sectionchief/hrybnytstvo/270-все-про-гриб-глива-вешенка> (дата звернення: 26.04.2025).

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Голосова І.В.				<i>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</i>		
Конс.							
Керівн.	Дзигун Л.П.						
						Стадія	Арк.
						Д	82
						Аркушів	
						89	
						КПІ ім. Ізгоря Сікорського	
						ФБТ	

8. Тарасюк Л. Гриби шіїтаке в Україні. Журнал Агросвіт України. URL: <https://auv.com.ua/27-sectionchief/hrybnytstvo/153-2012-01-15-15-35-55> (дата звернення: 26.04.2025).
9. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center Utrecht. Mycobank. URL: <https://www.mycobank.org> (дата звернення: 26.04.2025).
10. Коваленко О.Ф., Основи мікології та грибництва. Київ: Наукова думка, 2010.
11. Wasser S.P., Biology and biotechnology of edible mushrooms. 2011.
12. Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M., Introductory Mycology. 4th ed., Wiley, 1996.
13. Moore D., Robson G.D., Trinci A.P.J., 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press, 2011.
14. Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W., The Fungi. 2nd ed., Academic Press, 2001.
15. Cyclocybe aegerita. Світ грибів України. URL: <http://gribi.net.ua/uk/cyclocybe-aegerita/> (дата звернення: 26.04.2025).
16. Cyclocybe aegerita. URL: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6b/Agrocybe_aegerita._Galicia_\(Spain\).jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6b/Agrocybe_aegerita._Galicia_(Spain).jpg) (дата звернення: 26.04.2025).
17. Cyclocybe Aegerita. Poplar Fieldcap. URL: https://plantiary.com/mushroom/cyclocybe-aegerita_176.html (дата звернення: 26.04.2025).
18. Cyclocybe aegerita: basidia with spores attached. URL: <https://preview.redd.it/cyclocybe-aegerita-basidia-with-spores-attached-v0-jihofh7x41de1.jpeg?width=640&crop=smart&auto=webp&s=a5ba0794f23381401a2dfb5b20cf51050c801adc> (дата звернення: 26.04.2025).
19. Chang S.T., Miles P.G. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. CRC Press, 2004.

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		83

20. Eggert C., Temp U., Eriksson K.E.L. The ligninolytic system of white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995.
21. Osiewacz H.D., "Molecular biology of fungal development", CRC Press, 2002.
22. Hawksworth D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 1991.
23. Міцелій зерновий гриба Опеньок Тополевий (*Cyclocybe agerita*) 1 кг. купити у виробника. "Царство Грибів": екзотичні та лікарські гриби, свіжі, сушені, мелені. URL: https://fungolove.com.ua/ua/p992687617-mitselij-zernovoj-griba.html?srsltid=AfmBOosQEieq2R0d55Z0mLf31O0xWQQtoj961wC_4zPp4oTbLMnWbWV (дата звернення: 01.05.2025).
24. Г. І. Латюк, Л. М. Попова. Грибівництво : практикум для студентів вищих закладів освіти I–IV рівнів акредитації, які навчаються за освітньо-професійними програмами бакалавр і магістр спеціальностей «Агрономія» та «Садівництво і виноградарство». Одеса : Астропринт, 2021. 140 с.
25. Nutritional value, chemical composition, antioxidant activity and enrichment of cream cheese with chestnut mushroom *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing / J. Petrović et al. *Journal of Food Science and Technology*. 2015. Vol. 52, no. 10. P. 6711–6718. URL: <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1783-6> (дата звернення: 01.05.2025).
26. Бандура І. І. Наукові засади формування якості плодових тіл їстівних грибів родів *Pleurotus*, *Cyclocybe*, *Flammulina* та *Calocybe*. Таврійський державний агротехнологічний університет імені Дмитра Моторного. 2023. С. 29–31.
27. Нікітіна О. О. Основні ресурси хітину і хітозану грибного походження. – Київ : Світ Успіху, 2020. – С. 178-187.
28. Extraction, quantification, characterization, and application in food packaging of chitin and chitosan from mushrooms: A review / B. A. Alimi та ін. *International*

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		84

Journal of Biological Macromolecules. 2023. Т. 237. С. 124195. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124195> (дата звернення: 01.05.2025).

29. Cultivation of black poplar mushroom, *Cyclocybe aegerita*, on woody and non-woody lignocellulosic substrates with a high biological efficiency. Asian journal of Mycology. 2022. Т. 5, № 1. С. 31–39. URL: <https://doi.org/10.5943/ajom/5/1/3> (дата звернення: 02.05.2025).

30. Sánchez C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology. 2009. Т. 85, № 5. С. 1321–1337. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2343-7> (дата звернення: 02.05.2025).

31. Biochemistry, Citric Acid Cycle. National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541072/> (дата звернення: 02.05.2025).

32. Непорада К.С. Біоенергетика: загальні шляхи катаболізму вуглеводів, ліпідів, амінокислот. Цикл трикарбонових кислот. Біологічне окислення та окисне фосфорилування. Міністерство охорони здоров'я України Українська Медична Стоматологічна Академія. Кафедра біохімії. URL: <https://biohim.pdmu.edu.ua/storage/common/docs/3OIJavqHCSLTo2cxhYPF8oXsRtvRD8xcOIAFCkmN.pdf> (дата звернення: 02.05.2025).

33. Про затвердження Державних гігієнічних правил і норм «Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах» : Наказ МОЗ України від 13.05.2013 № 368 : станом на 9 лют. 2024 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0774-13#Text> (дата звернення: 02.05.2025).

34. "Лікарські засоби. Належна виробнича практика. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020" : Настанова Міністерства Охорони Здоров'я України. URL: https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/Настанова-СТ-Н-МОЗУ-42-4.0_2020.pdf (дата звернення: 02.05.2025).

35. Леонтьєв Д. В., Акулов О. Ю. Загальна мікологія: Підручник для вищих навчальних закладів. — Х.: Вид. група «Основа», 2007. — 228 с.: 375 іл.

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		85

36. Multilocus phylogeny- and fruiting feature-assisted delimitation of European *Cyclocybe aegerita* from a new Asian species complex and related species / R. A. Frings та ін. *Mycological Progress*. 2020. Т. 19, № 10. С. 1001–1016. URL: <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01599-z> (дата звернення: 04.05.2025).
37. The genome sequence of the commercially cultivated mushroom *Agrocybe aegerita* reveals a conserved repertoire of fruiting-related genes and a versatile suite of biopolymer-degrading enzymes / D. K. Gupta та ін. *BMC Genomics*. 2018. Т. 19, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4430-y> (дата звернення: 04.05.2025).
38. Proteomes *Cyclocybe aegerita* (Black poplar mushroom) (*Agrocybe aegerita*). UniProt. URL: <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000467700> (дата звернення: 04.05.2025).
39. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21764756/> (дата звернення: 04.05.2025).
40. Transcriptome of different fruiting stages in the cultivated mushroom *Cyclocybe aegerita* suggests a complex regulation of fruiting and reveals enzymes putatively involved in fungal oxylipin biosynthesis. PMC Home. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8097960/> (дата звернення: 04.05.2025).
41. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15944805/> (дата звернення: 04.05.2025).
42. Exploring molecular tools for transformation and gene expression in the cultivated edible mushroom *Agrocybe aegerita*. PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30778675/> (дата звернення: 04.05.2025).
43. Heterologous transformation of *Agrocybe aegerita* with a bacterial neomycin-resistance gene fused to a fungal promoter-like DNA sequence - Theoretical and Applied Genetics. SpringerLink. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00222916> (дата звернення: 04.05.2025).

44. Lessons on fruiting body morphogenesis from genomes and transcriptomes of Agaricomycetes. PMC Home. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10282164/> (дата звернення: 04.05.2025).
45. Вдовенко С.А. Вирощування їстівних грибів: Навч. посіб., 2010.- 120с
46. Evolutionary Morphogenesis of Sexual Fruiting Bodies in Basidiomycota: Toward a New Evo-Devo Synthesis / M. Virág та ін. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2022. Т. 86, № 1. URL: <https://doi.org/10.1128/membr.00019-21> (дата звернення: 04.05.2025).
47. Karrer D., Gand M., Rühl M. Engineering a lipoxygenase from cyclocybe aegerita towards long chain polyunsaturated fatty acids. AMB express. 2021. Т. 11, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01195-8> (дата звернення: 08.05.2025).
48. CHEN Wei-min, CHAI Hong-mei, YANG Wei-xian, MA Yuan-hao, ZHAO Yong-chang. Characterization of B Mating Loci Identification and Application in Cyclocybe aegerita and C. salicicola. Biotechnology Bulletin. 2021. С. 57–64.
49. Fruiting Body Production and Aroma Profile Analysis of Agrocybe aegerita Cultivated on Different Substrates / V. Kleofas та ін. Natural Resources. 2014. Т. 05, № 06. С. 233–240. URL: <https://doi.org/10.4236/nr.2014.56022> (дата звернення: 08.05.2025).
50. Головей О. П., Гуляев В. М. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 140 с.
51. Поводзинський В. М. Основи проектування біотехнологічних виробництв. Конспект лекцій для студентів спеціальності 6.092900 та 7.092901 «Промислова біотехнологія» напряму 0929 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання. – 2006.
52. Nan Tao, Bopu Cheng, Hongmei Chai. A Putative Guanosine Triphosphate Cyclohydrolase I Named CaGCH1 Is Involved in Hyphal Branching and Fruiting

					ДП БТ-1105. 00 ПЗ	Арк.
						87
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Development in *Cyclocybe aegerita*. Front. Microbiol. 2022. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.870658/full> (дата звернення: 23.05.2025).

53. Fission Yeast Media. PombeNet Forsburg Lab. URL: <https://dornsife.usc.edu/pombenet/media/#:~:text=You%20can%20also%20grind%20your,media%20can%20be%20filter%20sterilized> (дата звернення: 24.05.2025).

54. Quantification of Degradation Products Formed during Heat Sterilization of Glucose Solutions by LC-MS/MS: Impact of Autoclaving Temperature and Duration on Degradation / S. Leitzen та ін. Pharmaceuticals. 2021. Т. 14, № 11. С. 1121. URL: <https://doi.org/10.3390/ph14111121> (дата звернення: 24.05.2025).

55. Doesn't Play Well with Others- The Chemistry of the Autoclave. Bitesize Bio. URL: <https://bitesizebio.com/6128/doesnt-play-well-with-others-the-chemistry-of-the-autoclave/#:~:text=room%20temperature,types%20of%20compounds%20are%20formed> (дата звернення: 24.05.2025).

56. Ружинська Л.І. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв. Навч. посібник/ Укладачі: Л.І. Ружинська, І А Буртна, В.М.Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: НТУУ «КПІ», 2014 – 130 с.

57. Про охорону праці : Закон України від 14.10.1992 № 2694-XII : станом на 4 квіт. 2025 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12#Text> (дата звернення: 10.05.2025).

58. ДСТУ EN 12128:2019 Біотехнологія. Лабораторії, що проводять дослідження, розроблення та аналізування. Коефіцієнт заповнення мікробіологічних лабораторій, зони ризику, місце розташування та вимоги фізичної безпеки.

59. Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами" : Наказ МОЗ України від 24.01.2008 № 26 : станом на 8 квіт. 2025

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
						88
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0088-08#Text> (дата звернення: 10.05.2025).

60. Державні санітарні правила та норми ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001.

61. Про охорону атмосферного повітря : Закон України від 16.10.1992 № 2707-XII : станом на 15 листоп. 2024 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2707-12#Text> (дата звернення: 25.05.2025).

62. Про охорону навколишнього природного середовища : Закон України від 25.06.1991 № 1264-XII : станом на 15 листоп. 2024 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1264-12#Text> (дата звернення: 25.05.2025).

63. Про управління відходами : Закон України від 20.06.2022 № 2320-IX : станом на 15 листоп. 2024 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2320-20#Text> (дата звернення: 25.05.2025).

					<i>ДП БТ-1105. 00 ПЗ</i>	Арк.
						89
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		