

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва препарату гаупсин. Дільниця
біосинтезу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-61

Скляр Юлія Олександрівна

Керівник:

доц. каф. промислової біотехнології,

ст. н. співробітник, к.б.н. Клочко В.В.

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання
для проведення технологічного процесу:

доц. каф. біотехніки та інженерії,

к.т.н. Шибецький В.Ю.

Рецензент:

ас. каф. екобіотехнології та

біоенергетики, к.т.н. Левтун І.І.

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

Студент (-ка) _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 6118.00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.				Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.					1	1
Консульт.					КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61	
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

“ 27 ” лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Скляр Юлії Олександрівні

1. Тема проєкту: «Технологія виробництва препарату гаупсин. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Ключко Віталій Вікторович, доц. каф. промислової біотехнології, к.б.н., ст.н. співробітник, затверджено наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с.

2. Термін подання студентом проєкту « » 2020 р.

3. Вихідні дані до проєкту: штами *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306, титр в готовому препараті не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³, об'єм ферментеру 8 м³, робочий тиск в апараті 0,04-0,05 МПа, температура культивування 28±1°C, рН 6,8-7,0; рО₂=40±15%, аерація 3,8 л/хв, τ = 24 год, перемішування відкритою турбінною шестилопатевою мішалкою, n=180 об/хв, кінцевий продукт – рідка форма препарату Гаупсин у пляшках по 1 л та каністрах по 10 л для рослинництва.

4. Зміст пояснювальної записки: обґрунтувати вибір промислового продуценту для виробництва препарату Гаупсин; дати характеристику біологічного агента; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; описати методи отримання промислових

продуцентів; розробити принципову технологічну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки; розробити апаратурну схему виробництва та креслення апарату.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 2 арк. А1.

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю., доц. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н.		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Терміни виконання етапів проекту	Примітка
1	Вступ. Характеристика біологічного агента. Біохімічні основи виробництва.	15.04.20	
2	Методи отримання промислових продуцентів. Технологічна частина. Розрахунок обладнання.	30.04.20	
3	Креслення технологічної та апаратурної схем.	30.05.20	
4	Оформлення пояснювальної записки і схем.	08.06.20	

Студент

Юлія СКЛЯР

Керівник

Віталій КЛОЧКО

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва препарату гаупсин.
Дільниця біосинтезу»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект викладено на 103 сторінках друкованого тексту. Складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, переліку посилань, додатків, 13 рисунків, 5 таблиць, 63 посилань.

Метою дипломного проекту є розробка технології виробництва препарату гаупсин, до складу якого входять штами *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 та проектування стадії біосинтезу.

За результатами виконання дипломного проекту були зроблені наступні висновки:

1. Перевагою даної технології є отримання цільового продукту з відносно недорогої сировини, використання сучасної апаратури та майже повна автоматизація технологічного процесу.

2. Запропонований склад промислового поживного середовища забезпечує інтенсивніше накопичення біомаси продуцентами.

3. Розроблено технологічну, апаратурну схему та креслення апарату. Розраховано технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки ферментеру для культивування продуцентів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* штами УКМ В-111 і УКМ В-306.

ГАУПСИН, ПСЕВДОМОНАДИ, БІОПРЕПАРАТ, *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP.*AUREOFACIENS* УКМ В-111 ТА УКМ В-306
ФЕНАЗИН, ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ, АНТИБІОТИКИ,
ЕНТОМОЦИДНІ ВЛАСТИВОСТІ, ВИРОБНИЧЕ КУЛЬТИВУВАННЯ,
ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, ШТАМИ, ПРОДУЦЕНТ, БАКТЕРІЇ.

ABSTRACT

The diploma project is presented on 103 pages of printed text. It consists of an introduction, five sections, conclusions, a list of references, appendices, 13 figures, 5 tables, 63 references.

The aim of the diploma project is to develop a technology for the production of the biological product Gaupsin, which includes strains of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* UKM B-111 and UKM B-306 and design of the biosynthesis stage.

Based on the results of the diploma project, the following conclusions were made:

1. The advantage of this technology is to obtain the target product from relatively inexpensive raw materials, the use of modern equipment and almost complete automation of the technological process.

2. The proposed composition of the industrial nutrient medium provides more intensive accumulation of biomass by producers.

3. The technological, hardware scheme and drawings of the device are developed. Technological, constructive and thermal calculations of the fermenter for cultivation of producers of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* strains UKM B-111 and UKM B-306.

GAUPSIN, PSEUDOMONADS, BIOLOGICAL PRODUCT, PSEUDOMONAS
CHLORORAFIS SUBSP. AUREOFACIENS UKM B-111 AND UKM-306,
PHENAZINE, ANTIVIRAL ACTIVITY, ANTIBIOTICS, ENTOMOCIDAL
PROPERTIES, PRODUCTION CULTURE SUBSTANCES, NUTRIENT
MEDIUM, STRAINS, PRODUCER, BACTERIUM.

3MICT

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1. Штами-продуценти гаупсину.....	11
1.2. Морфолого-цитологічні ознаки бактерій.....	12
1.3. Культуральні ознаки.....	13
1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	14
1.5. Антагоністичні властивості штамів.....	17
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	19
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....	19
2.2. Оптимальні умови біосинтезу.....	19
2.3. Характеристика компонентного складу препарату гаупсин.....	21
2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	23
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	27
3.1. Генетична вивченість біологічного об’єкту.....	27
3.1.1. Генетичні карти продуцента.....	27
3.1.2. Механізми експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	31
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	35
3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.....	35
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу.....	37
3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин.....	39

Разробид					
Керівник					
Затверд					

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	41
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	43
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	43
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	44
4.3. Опис технологічного процесу.....	47
4.4. Матеріальний баланс.....	61
4.5. Контроль виробництва.....	63
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	67
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	67
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	73
5.2.1. Конструктивний розрахунок ферментера.....	73
5.2.2. Розрахунок перемішуючого пристрою.....	74
5.2.3. Розрахунок воронки.....	76
5.2.4. Розрахунок барботера.....	77
5.2.5. Тепловий розрахунок.....	78
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	81
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	88
ВИСНОВКИ.....	91
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	93
ДОДАТКИ.....	100

ВСТУП

В Інституті мікробіології і вірусології НАН України на основі двох штамів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* був створений і в 2005 р. запатентований комплексний біопрепарат гаупсин, що гальмує зростання фітопатогенних бактерій і грибів. Препарат являє собою клітинну біомасу обох штамів в культуральному середовищі.

Гаупсин - це універсальний препарат широкого спектра дії, призначений для обробки садів, ягідників, виноградників, городів, полів, баштанних культур, а також для захисту кімнатних рослин від грибних хвороб та шкідників. Гаупсин має антимікробні, антифунгідальні, противірусні, ентомопатогенні та ростостимулюючі властивості.

Біопрепарат не токсичний для людини і тварин, не накопичується у рослинах та ґрунті, не впливає на смак вирощуваної продукції. Гаупсин відмінно зарекомендував себе в тепличних господарствах. Ефективність у боротьбі з грибними хворобами 90-92%, із шкідниками 92-94%.

За останній час в усьому світі, в тому числі і в Україні, збільшився інтерес до застосування мікробіології в сільському господарстві. Все більшого значення набуває заміна хімічних засобів захисту рослин на біологічні. Протягом останніх десятиліть досягнуто значного прогресу в їх використанні для біологічного захисту рослин від збудників захворювань. Сапрофітні бактерії *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* належать до одного з найбільш активних продуцентів антибіотичних речовин серед різних видів псевдомонад. Препарати, що містять штами названого виду, широко використовуються у світі для боротьби з грибними захворюваннями рослин. Варто згадати виділений у Швеції в 1991 р. штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* МА 342, запропонований для захисту злакових культур від грибних захворювань. Біопрепарат на основі цього штаму був запатентований шведською компанією BioAgri АВ під торговою назвою Cedomon, зареєстрований і застосовується в багатьох європейських країнах.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

На сьогоднішній день препарат гаупсин випускається низкою підприємств України відповідно до ліцензійних договорів на випуск і продаж препарату, укладеними з розробником препарату - ІМВ НАН України. Такими підприємствами, як ДП «Ензим», ТОВ «Науково-виробничий центр Черкасибіозахист», ТОВ «Компанія «БіоНік», ТОВ «Аграрні біотехнології» налагоджено виробництво та постачання препарату гаупсин, основними споживачами якого є дрібні та середні фермерські господарства, а також приватні особи.

Метою роботи є проектування стадії біосинтезу гаупсину, до складу якого входять штами *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Штами-продуценти гаупсину

Препарат гаупсин створений на основі двох штамів *Pseudomonas chlororaphis* subsp.*aureofaciens* УКМ В-111 та УКМ В-306, які належать до роду *Pseudomonas*. Дані штами синтезують антибіотичні речовини - похідні феназину та фенілпіролу. У штамів гаупсину виявлені ентомоцидні властивості по відношенню до широкого спектра комах-шкідників. На моделі вірусу табачної мозаїки встановлена антивірусна активність гаупсину, пов'язана з утворенням термостабільних екзополімерів, що містять нейтральні моносахариди. Високоактивними противірусними агентами виявлялися також ліпополісахариди штамів В-111 та В-306. Встановлено будову їх О-специфічних полісахаридів. Останні за структурою гетерогенні, представлені лінійними три- і тетра-сахаридними повторюваними ланцюгами, які мають унікальну будову [1, 2]. Дані особливості штамів-продуцентів використовуються для отримання цільового продукту – гаупсину.

У бактеріальній суспензії *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* виявлені речовини фітогормональної (індол-3-оцтова кислота) і антибіотичної (феназин-1-карбонова кислота, 2-гідроксифеназин-1-карбонова кислота, 2-гідроксифеназин) природи. Дані сполуки в культуральній рідині в умовах відсутності живих клітин забезпечують позитивний ефект на розвиток насіння рослин та чинять інгібуючу дію на зростання фітопатогенів [7].

Систематичне положення мікроорганізмів-продуцентів, які використовуються для отримання цільового продукту (царство, тип, клас, порядок, сімейство, рід, вид, штам) наведено у Таблиці 1.1 [3].

Дані штами *Pseudomonas chlororaphis* subsp.*aureofaciens* знаходяться в УКМ (Українська Колекція Мікроорганізмів) і мають номери В-111 і В-306.

					ДП 6118.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Скляр Ю.О.				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Консульт.							
Керівник	Клочко В.В.						
Затверд.							
						Стадія	Аркуш
							11
							103
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	

Літера «В» означає приналежність до бактерій. Колекція УКМ розміщена в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного.

Таблиця 1.1. Систематичне положення продуцентів

Царство	Бактерії (<i>Bacteria</i>)	
Тип	Протеобактерії (<i>Proteobacteria</i>)	
Клас	Гаммапротеобактерії (<i>Gamma Proteobacteria</i>)	
Порядок	<i>Pseudomonadales</i>	
Сімейство	<i>Pseudomonadaceae</i>	
Рід	<i>Pseudomonas</i>	
Вид	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>	
Штам	УКМ В-111	УКМ В-306

1.2. Морфолого-цитологічні ознаки бактерій

Представники роду *Pseudomonas* – прямі або злегка вигнуті, але не спіральні, палички, розміром 0,5-1,0 х 1,5-5,0 мкм. Чохлів не утворюють. Грамнегативні. Рухливі за рахунок одного або кількох полярних джгутиків, в окремих випадках нерухливі. У деяких видів також можливе утворення латеральних джгутиків з більш короткою довжиною хвилі. Широко розповсюджені в природі. Деякі види патогенні для людини, тварин чи рослин [4,5].

Pseudomonas chlororaphis subsp.*aureofaciens* – невеликі аеробні рухливі грамнегативні прямі або злегка вигнуті полярно-джгутикові паличкоподібні бактерії (рис. 1.1). Спор та чохлів не утворюють [6].

					ДП 6118.00.000 ПЗ	ДК.
						12
РК.	докум.	пис	Дата			

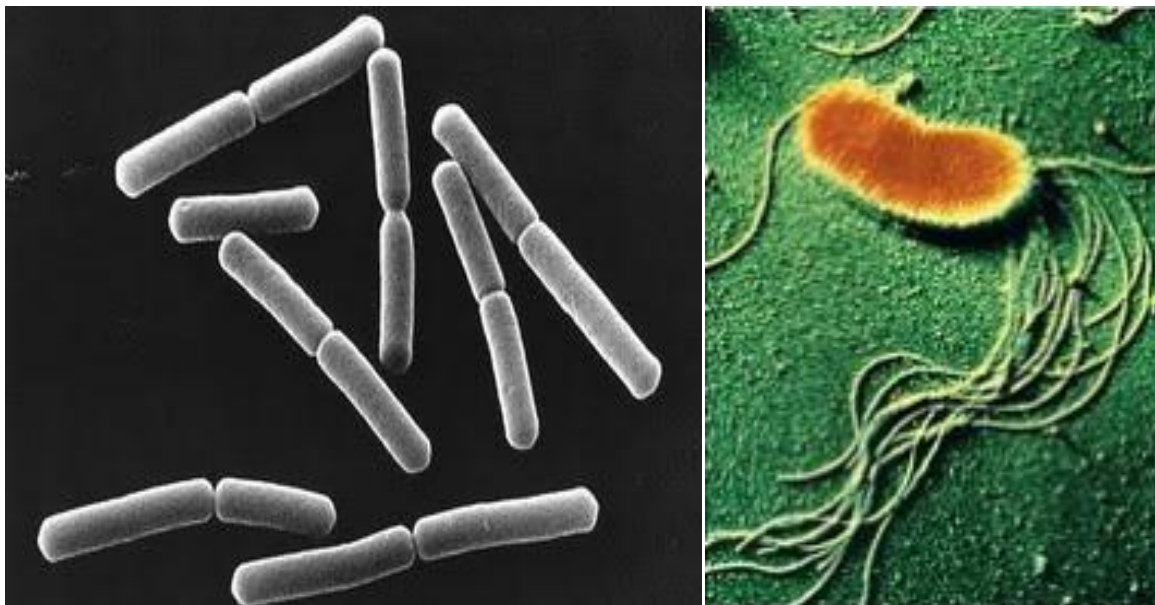


Рис.1.1. Електронна мікроскопія *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*

1.3. Культуральні ознаки

На МПА представники роду *Pseudomonas* утворюють гладкі або шершаві колонії, іноді з коричневим більш опуклим центром, які відрізняються за консистенцією, наявністю зон гемолізу та пігментоутворенням [3]. Пігмент зелений флуоресцентний або темно-жовтий. На МПА з гліцерином - дисоціація на два колоніальних типи жовтувато-сірих, слабо опуклих, до центру злегка матових і білуватих, блискучих, більш опуклих і слизьких колоній.

На середовищі Клюйвер спостерігається дисоціація на кілька колоніальних типів: коричневі, прозорі, майже плоскі; коричнево-жовті, матові, опуклі; темно-коричневі, вкриті дрібними дочірніми колоніями; чорні, щільні з металевим блиском і карликові темні. У колоніально-морфологічних варіантів пігментація на середовищах різна: золотисто-жовта, коричнева, рожево-помаранчева, червона.

На середовищі Кінга А - колонії однорідні, коричнево-рожеві, слабо опуклі. Пігмент коричнево-жовтий. На середовищі Кінга Б - білуваті, опуклі, круглі колонії. Пігмент інтенсивний, зелений, флуоресцентний, згодом рожевіє.

При культивуванні на скошеному агарі - штрих сірий, масляний, блискучий, слабо опуклий. Пігмент зелений, флуоресцентний у добових

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

культур, потім стає золотисто-жовтим або коричнево-рожевим. Картопляний агар (косяки) – штрих темно-коричневий, маслянистий, опуклий. Пігмент коричневий.

На м'ясопептонному бульйоні (МПБ) утворюється сильна каламуть, осад, через добу зростання пігмент зелений, флуоресцентний, що переходить на 3-5 добу в жовто-оранжевий [8].

На МПА *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* утворює круглі, напівпрозорі, слизькі, гладкі колонії з жовтуватим, рожевим або іноді коричневим відтінком, розмір колоній після закінчення процесу культивування - 5-6 мм (рис. 1.2).

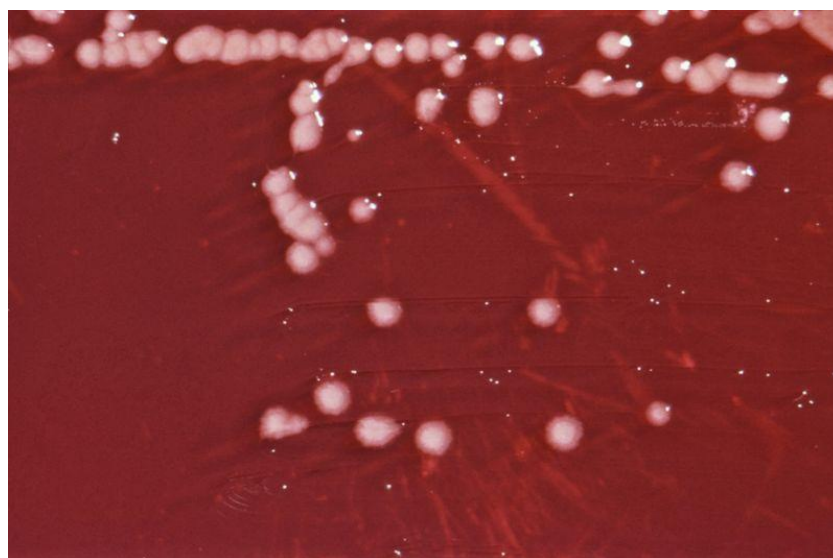


Рис.1.2. Круглі гладкі колонії *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*.

Чисельність мікроорганізмів після закінчення процесу культивування складає $3 \cdot 10^{10}$ КУО/мл [9].

1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

У багатьох видів *Pseudomonas* накопичується як запасне джерело карбону полі-β-гідроксибутират, який помітний як включення після фарбування суданом. Бактерії відносяться до аеробів, метаболізм виключно дихального типу з використанням кисню в якості кінцевого акцептора електронів, у деяких випадках альтернативним акцептором електронів може бути нітрат, що

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

забезпечує анаеробний ріст. Більшість видів не потребують органічних факторів росту. Каталазопозитивні, хемоорганотрофи, деякі види – факультативні автотрофи, які здатні використовувати в якості джерела енергії H_2 або CO [4].

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aureofaciens* - облігатний аероб, температурний оптимум росту 28-30 °С, не росте при 41 °С; росте в межах рН середовища від 5,2 до 8,0. Культура додаткових факторів росту не потребує (прототроф). Полі-β-оксибутират всередині клітини не накопичується, на відміну від інших представників виду *Pseudomonas*. Метаболізм глюкози окислювальний. Спостерігається швидке розрідження желатину. Пошарове розрідження починається через 24 год, повне спостерігається на третю добу культивування (при 28 °С). Молоко пептонізує, утворює жовто-зелений пігмент. Молекулярний азот не фіксує. Крохмаль не гідролізує. Клітковину не розкладає. Пектиназна активність відсутня. Продукує каталазу, утворює аргініндигідролазу. Гідролізує лецитин [8,11].

Даний продуцент засвоює з утворенням кислоти глюкозу, фруктозу, трегалозу, маніт, гліцерин. Не засвоює арабінозу, ксилозу, рамнозу, галактозу, мальтозу, лактозу, сорбіт, дульцит. З органічних кислот засвоює мурашину, оцтову, молочну, бурштинову, фумарову, піровиноградну, яблучну, бензойну. Не засвоює винну, лимонну, щавлеву, глюконову кислоти [10].

Використовує аміачні та нітратні солі азоту в якості єдиного джерела азоту. Добре засвоює $(NH_4)_2SO_4$, пептони, аланін, глікокол, аргінін, слабо засвоює - KNO_3 , аспарагін, тирозин, сечовину [9].

Вид *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - сапрофіт, не проявляє фітопатогенну активність, про що свідчить відсутність мацерації на скибочках картоплі при нанесенні на них уколом живих клітин штаму.

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aureofaciens* проявляє стійкість до наступних антибіотиків: стрептоміцину (200 мкг/ мл), ампіциліну (200 мкг/ мл), новобіоцину (100 мкг/мл) і карбініциліну (1000 мкг/мл), тетрацикліну (30 мкг/мл), цефтазидиму (20 мкг / мл), цефепиму (20 мкг / мл). Культура чутлива

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.А
Зм.Зм.	Арк.А	№ докум.№	ПідписПід	Дата		15

до канаміцину (100 мкг / мл), гентаміцину (20 мкг / мл), хлорамфеніколу (100 мкг/ мл), меропенему (20 мкг/ мл). Продуцент має вихідний рівень хромосомної стійкості до цинку та міді. Максимальна толерантна концентрація (МТК) цинку - 2.0 мМ, міді - 1.5 мМ. Продуцент також стійкий до миш'яку у високих концентраціях 100-1000 мг/л [8].

Для культивування бактерій *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* потрібні багаті за складом поживні середовища з дріжджовим екстрактом, глюкозою, пептоном. З метою зниження собівартості кінцевого продукту можливе використання дешевших субстратів, наприклад, відходів харчового виробництва – післяспиртова барда, бурякова меляса, молочна сироватка. Однак нестандартна сировина має незбалансований склад мінеральних речовин, підвищену кислотність. Даний вид не росте в кислому середовищі (рН=4,5). Тому при використанні нестандартної сировини в якості основи для поживного середовища необхідно оптимізувати склад ПС і умови культивування мікроорганізмів [11].

Досить поширене поживне середовище LB, що є одним з основних для культивування бактерій роду *Pseudomonas*, складається, г / л:

Пептон – 10,0

Дріжджовий екстракт – 5,0

Натрій хлористий – 10,0

Вода водопровідна - до 1 л.

Недоліком цього поживного середовища є висока вартість, пов'язана з наявністю в його складі такого дорогого інгредієнта, як пептон.

Інше поживне середовище, яке використовується для культивування обраного продуцента - середовище Кінг В. До складу ПС входять пептони, гліцерин, різні мінеральні солі, г / л:

Пептон – 20,0

Гліцерин – 10,0

KH₂PO₄ – 1,5

MgSO₄·7H₂O - 1,5

Вода дистильована - до 1 л.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У процесі культивування мікроорганізмів роду *Pseudomonas* на середовищі Кінг В кількість м/о складає 2×10^9 КУО / мл [12].

1.5. Антагоністичні властивості штамів

Бактерії роду *Pseudomonas* є типовими представниками ґрунтового біоценозу, здатні швидко і успішно колонізувати ризосферу рослини-господаря. Представники цієї групи мікроорганізмів є не тільки антагоністами ґрунтових патогенів, але і можуть стимулювати розвиток рослин завдяки синтезу регуляторів росту і поліпшення фосфорного живлення рослин [13].

Часто біологічний контроль фітопатогенів псевдомонадами є комплексним впливом різних механізмів, що включають як синтез сидерофорів, антибіотиків та інших вторинних метаболітів, так і просту конкуренцію ризобактерій, які сприяють зростанню рослин і фітопатогенів за джерела азотного і вуглецевого живлення [14].

Для *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* вивчений такий тип міжпопуляційних взаємовідносин як антагонізм. Відомо, що синтез вторинних метаболітів здійснюється після припинення росту, тобто в стаціонарну фазу, тому антагоністичну активність визначають на 2-5 добу культивування. Обрані продуценти виявляють антагоністичну активність щодо цвілевих грибів і бактеріальних культур; найбільш чутливими є мікроміцети роду *Cladosporium* та бактерії роду *Bacillus*. Дія антагоніста відносно фітопатогенних грибів родів *Fusarium* і *Cladosporium* проявляється в пригніченні проростання спор, завдяки чому уповільнюється утворення росткових трубок та гіф, що викликає структурні зміни міцелію, які призводять до порушення нормального циклу розвитку цвілевих грибів. Таким чином, можна стверджувати, що *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* виявляє як антибактеріальну, так і антифунгальну активність одночасно [6].

Не менш важливою, ніж антибактеріальна та антифунгальна, є ентомопатогенна активність штамів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 та В-306. Десять підтримуваних в УКМ (Української

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		17

Колекції Мікроорганізмів) штамів досліджуваних мікроорганізмів обмежували чисельність гусениць яблуневої плодожерки 5-го віку (смертність 26-85%) і личинок колорадського жука 4-го віку (смертність 25-60%). При цьому комахи гинули від септицемії та дії ентомопатогенних токсинів. До гаупсину також чутливі багато інших комах – шкідників [15].

У 2010 р. було розпочато дослідження протівірусної активності гаупсину та сполук, які за неї відповідають. Було встановлено, що гаупсин протягом трьох вегетаційних сезонів гальмував на 80 - 97% розвиток вірусу тютюнової мозаїки в дослідах *in vivo* на рослинах дурману *Datura stramonium* і тютюну *Nicotiana tabacum*. Активними були культуральні рідини, отримані як при спільному (гаупсин), так і при роздільному культивуванні штамів В-111 і В-306 на виробничому поживному середовищі, а також на середовищі Кінг А [16]. Результати подальших досліджень *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* підтверджують високий ефект штамів В-111 та В-306 і по відношенню до вірусів теплокровних - грипу, герпесу і гепатиту С [17].

Варто додати, що штами *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 і В-306 є симбіонтами стосовно один одного, адже препарат гаупсин одержують шляхом сумісного культивування обох продуцентів.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Існує декілька форм біопрепарату гаупсин: рідка, порошкоподібна та на носіях (торф, перліт і вермикуліт) на основі клітин *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*. В даній роботі розглядається рідка форма препарату.

Кінцевий продукт (рідка форма гаупсину) містить два штами ризосферних бактерій роду *Pseudomonas*, а саме *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 з титром не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ разом із середовищем культивування, біологічно-активні речовини (БАР): кислоти із роду феназин-карбонових та комплекс активних пігментів, які є діючими факторами в препараті [18].

Гаупсин - це препарат широкого спектра дії, призначений для обробки садів, ягідників, виноградників, городів, полів, баштанних культур, а також для захисту кімнатних рослин від грибних хвороб та шкідників. Гаупсин має антибактеріальні, антифунгіцидні, противірусні, ентомопатогенні та ростостимулюючі властивості. Проявляє антагоністичну активність по відношенню до родів *Erwinia*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botritis*, *Pythium*, *Verticillium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Ascohyta* [19].

Біопрепарат не токсичний для людини і тварин, не накопичується у рослинах та ґрунті, не впливає на смак вирощуваної продукції. Ефективність у боротьбі з грибними та бактеріальними хворобами 90-92%, із шкідниками 92-94% [15].

2.2. Оптимальні умови біосинтезу

Відомо, що бактерії роду *Pseudomonas*, зокрема продуцент цільового продукту *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, здатні використовувати як нітратну, так і амонійну форми азоту. Для оптимізації процесів

					ДП 6118.00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА				
Розробив	Скляр Ю.О.								
Консульт.									
Керівник	Клочко В.В.								
Затверд.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ				
					Стадія	Аркуш	Аркушів		
						19	103		

промислового культивування в розчин меляси рекомендують додавати NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ або NH_4NO_3 в концентрації 1, 2 і 3 г/л відповідно. Як джерело фосфорного живлення вносять KH_2PO_4 із вмістом від 1 до 2,5 г/л [13].

Підготування посівного матеріалу на виробництві проводять в інокуляторі із термостатом при режимі роботи мішалки 150 об/хв і температурі 29°C протягом 24 годин. Інокулят вирощують на рідкому поживному середовищі Кінга. Початковий рН середовища 6.8 - 7.0 [20].

Для створення умов, наближених до промислових, культивування здійснюють в біореакторі при різних режимах роботи мішалки (150, 180, 200 об/хв). При режимі роботи мішалки 180 хв^{-1} рівень біомаси на 8,0 і 14,6% вище, ніж у варіантах з 150 і 200 хв^{-1} відповідно [22].

Концентрація біомаси при культивуванні мікроорганізмів залежить від ряду причин, однією з яких є доступність субстрату і його оптимальна кількість. Існує пряма залежність приросту біомаси від збільшення концентрації меляси в середовищі. Максимальний рівень біомаси відзначається після 23 годин культивування у варіантах з концентрацією субстрату 40, 50, 60 г/л і складає в середньому $10,1 \pm 0,3$ г/л, що більш ніж в 1,5 рази вище вмісту біомаси при концентрації меляси в середовищі 10 і 20 г/л.

На сьогоднішній день при підборі джерел азоту для культивування продуцентів у промислових умовах з економічної точки зору доцільніше використовувати середовище із концентрацією меляси 40 г/л [12, 21].

Досліди щодо оптимізації складу мелясного середовища (концентрація 40 г / л) для культивування *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* показують, що на тлі високої концентрації цукрів необхідно додаткове внесення 2 г / л NaNO_3 і 2,5 г / л KH_2PO_4 до поживного середовища. Даний склад поживного середовища забезпечує максимальний вихід біомаси і титру активних клітин. У процесі культивування в біореакторі оптимальні результати приросту біомаси досягається при режимі роботи мішалки 180 хв^{-1} [22].

Мінімальний приріст біомаси відзначений при кислих значеннях рН і складає в середньому $5,1 \pm 0,9$ г / л, що на 43% менше максимально отриманого

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

результату. При нейтральному значенні рН рівень біомаси в 9 разів перевищує початковий рівень і складає $10,8 \pm 0,4$ г / л. Контролювання динаміки зміни рН середовища дозволили зробити висновок, що розвиток культури відбувається при слабко-кислому значенні рН - 5,8, однак нейтральне значення рН є найбільш сприятливим для роботи ферментних систем і розвитку бактерій *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* [20].

Таким чином, максимальний розвиток досліджуваного штаму відбувається на поживному середовищі, що містить джерела вуглецю - глюкозу і сахарозу, джерела азоту – пептони та дріжджовий екстракт. Склад поживного середовища для промислового культивування продуцента: меляса – 40 г/л; NaNO_3 – 2 г/л; KH_2PO_4 – 2,5 г/л, пептон - 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л). Оптимальною температурою для росту при глибинному культивуванні є 28°C, при поверхневому культивуванні - 30 °C. При нейтральному початковому значенні рН середовища продуцент утворює максимальну кількість біомаси. Бактерії *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* добре гідролізують желатину, не використовують крохмаль в якості єдиного джерела вуглецю, можуть рости на середовищі при концентрації NaCl до 3%.

У промислових умовах процес культивування продуцента проводиться у ферментері обраного об'єму при дотриманні наступних умов:

- температура культивування $28 \pm 1^\circ \text{C}$;
- безперервна робота мішалки при швидкості обертання 180-600 об / хв залежно від показника pO_2 (не нижче 20%);
- тиск повітря в ферментері 0,04-0,05 МПа;
- питома витрата повітря за хвилину 1,0-1,5 л / л середовища [22].

2.3. Характеристика компонентного складу препарату гаупсин

Компонентний склад препарату гаупсин: бактерії *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, штами УКМ В-111 і УКМ В-306 з титром не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ разом із середовищем культивування (культуральна рідина), біологічно-активні речовини (БАР): кислоти із роду феназин-карбонових та комплекс активних пігментів, які є діючими факторами в

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

препараті [18]. Препарат не повинен містити сторонню мікрофлору та хімічні домішки.

До сполук, які відіграють важливу роль в обмеженні чисельності патогенів, належать сидерофори – речовини, які здійснюють транспорт заліза, а також псевдобактин – жовто-зелений флуоресцентний пігмент бактерій роду *Pseudomonas*. Штами В-111 і В-306, які входять до складу гаупсину, активно синтезують псевдобактин, про що свідчить жовто-зелена флуоресценція при їх вирощуванні як на загально використовуваних, так і на спеціальних поживних середовищах [23].

Важливу групу сполук із антимікробною активністю, які утворюють бактерії *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, становлять антибіотики групи феназину. Із штамів-компонентів біопрепарату гаупсин було виділено три феназинових пігменти: жовта феназин-1-карбонова кислота та оранжеві 2-оксифеназин-1-карбонова кислота і 2-оксифеназин [7].

Феназинові антибіотики являють собою низькомолекулярні гетероциклічні азотовмісні сполуки, синтезовані в ході реакцій ароматичного шляху. Основу всіх з'єднань даного ряду становить феназин-1- карбоксилат, 2-оксифеназин-1-карбоксилат, піоціанін, оксихлорографін, геміпіоціанін - його похідні (рис. 2.1).

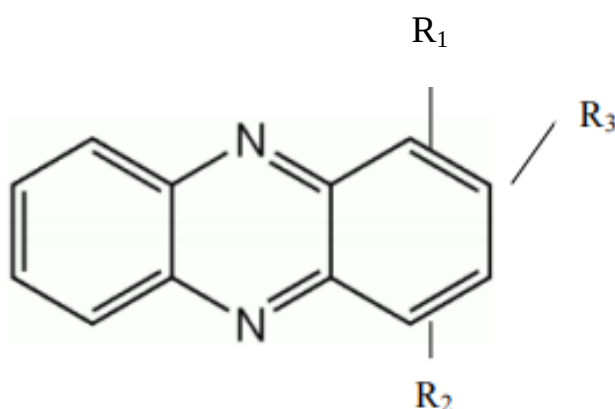


Рис.2.1. Будова феназинових антибіотиків: $R_1, R_2, R_3 = 0$ - феназин; R_1 : COOH - феназин-1-карбоксилат; OH - геміпіоціанін; CONH_2 - оксихлорографін. $R_1 = \text{O}^-$, $R_2 = \text{CH}_3$ - піоціанін. $R_1 = \text{COOH}$, $R_3 = \text{OH}$ – 2-оксифеназин-1-карбоксилат; $R_1 = \text{COOH}$, $R_2 = \text{CH}_3$ - 5-метилфеназин-1-карбоксилат.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						22
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

Хромато-мас-спектрометричні дослідження підтвердили присутність феназинових похідних як безпосередньо в гаупсині (при культивуванні продуцентів на виробничому поживному середовищі), так і при вирощуванні бактерій на середовищі Кінг А, яке є оптимальним для біосинтезу пігментів цієї групи. При цьому високою феназинсинтезуючою активністю володіє штам В-111, в культуральній рідині якого міститься 520 – 600 мг/л феназин-1-карбонової кислоти, 90 – 128 мг/л 2-оксифеназин-1-карбонової кислоти і 20 – 35 мг 2-оксифеназину. В культуральній рідині штаму В-306 присутні такі ж сполуки, але в дещо менших кількостях (350 – 380, 60 – 75 і 15 – 20 мг/л відповідно) [5, 27].

До складу гаупсину також входить речовина, яка забезпечує антифунгальну дію препарату - піролнітрин, активний антифунгальний агент групи фенілпіролів. Цей антибіотик був виявлений в культуральній рідині штаму В-306 [24].

Противірусні речовини гаупсину не інактивуються нагріванням до 100°C протягом 10 хв, і, скоріш за все, не містять білкових компонентів. Результати досліджень свідчать про те, що вони являються екзополімерами, які містять нейтральні моносахариди (фруктозу, манозу, галактозу і глюкозу). Їх хімічна структура поки що не встановлена [16]. Високоактивними противірусними агентами є ліпополісахариди (ЛПС), які були виділені із клітин штамів В-111 та В-306 [15].

Таким чином, можна стверджувати, що антифітовірусна дія препарату гаупсин обумовлена наявністю екзополісахаридів, ліпополісахаридів, а також олігосахаридів кора у складі культуральної рідини після культивування *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* [25, 26].

Широкий спектр біологічної активності препарату, обумовлений наявністю у складі БАР, вигідно відрізняє гаупсин від багатьох препаратів, направлених проти одного (чи однієї групи) шкідників або патогенів рослин.

2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Препарат гаупсин не чинить прямого впливу на біохімічні процеси організму людини, однак, завдяки своїй біологічній активності бере участь у

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		23

функціонуванні природних середовищ, зокрема у ризосфері рослин та впливу на фітопатогенні мікроорганізми. Біопрепарат не токсичний для людини і тварин, не накопичується у рослинах та ґрунті, не впливає на смак вирощуваної продукції [13].

Гаупсин має антимікробні, антифунгідальні, протівірусні, ентомопатогенні та ростостимулюючі властивості. Ефективність у боротьбі з грибними та бактеріальними хворобами 90-92%, із шкідниками 92-94% [9].

До сполук, які відіграють важливу роль в обмеженні чисельності патогенів, належать сидерофори - речовини, які здійснюють транспорт заліза, і перш за все псевдобактин - жовто-зелений флуоресцентний пігмент бактерій роду *Pseudomonas*. Останній є інструментом конкуренції бактерій за залізо із сидерофорами фітопатогенних грибів, що володіють більш низькою константою зв'язування заліза. Таким чином, антифунгальна дія псевдобактину пов'язана зі створенням дефіциту заліза для грибів-патогенів рослин [23].

У табл.2.1 представлені результати вивчення антифунгальної активності феназинових пігментів, синтезованих штамами В-111 і В-306.

Таблиця 2.1. Антифунгальна активність феназинових пігментів, синтезованих штамами *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*

Фітопатогенні гриби	Мінімальна концентрація препарату, за якої інгібується ріст грибів, мкг / мл		
	Феназин-1-карбонова кислота	2-оксифеназин-1-карбонова кислота	2-оксифеназин
<i>Fusarium avenaceum</i>	200	200	400
<i>Fusarium oxysporum</i>	200	200	—
<i>Mucor plumbeus</i>	200	100	200
<i>Drechslera graminea</i>	50	20	50
<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	100	—
<i>Rhizoctonia solani</i>	200	200	—
<i>Monilia fructigena</i>	200	100	200
<i>Alternaria sp.</i>	100	50	—
<i>Botrytis cynerea</i>	50	20	100

Усі похідні феназину гальмують ріст фітопатогенних грибів (найбільш активне серед них – 2-оксифеназин-1-карбонова кислота). Ці речовини пригнічують ріст бактерій-збудників захворювань рослин: *Clavibacter michiganense*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas malvacearum*. Феназин-1-карбонова кислота діє на них в концентраціях 200-100 мкг / мл; 2-оксифеназин-1-карбонова кислота в концентраціях 5-50 мкг / мл, 2-оксифеназин при 50-20 мкг / мл відповідно [15].

Висока антимікробна активність феназинових антибіотиків зумовлена механізмом їх дії. Вони мають здатність легко вступати в окисно-відновні реакції, приєднувати електрони і перетворюватися у відносно стабільні аніони. Феназини викликають генерацію активних форм кисню ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ і H_2O_2), які володіють високою реакційною здатністю та індукують окислювальний стрес, який супроводжується загибеллю мікроорганізмів (рис. 2.2).

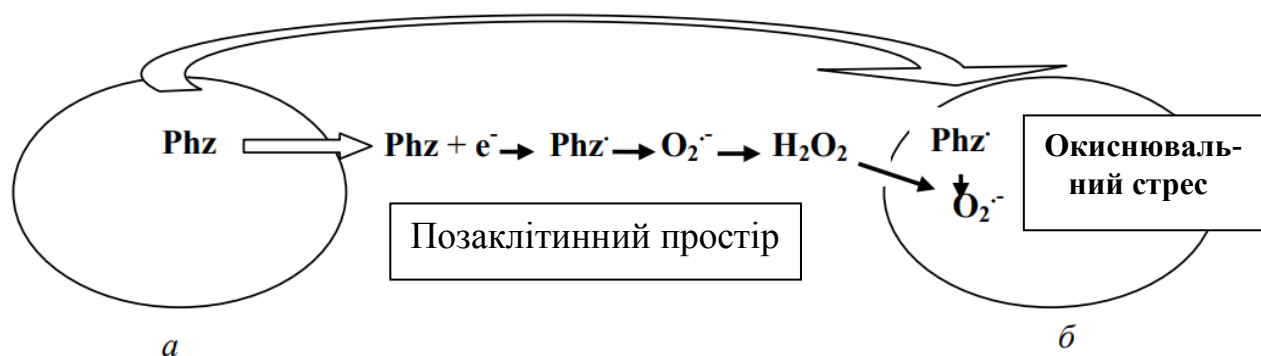


Рисунок 2.2. Механізм антагоністичної активності бактерій-продуцентів феназинових антибіотиків. Phz - феназинові антибіотики; *а* - клітина-продуцент, *б* - клітина-мішень.

У свою чергу, клітини-продуценти проявляють стійкість до власних феназинів, однак механізм цього явища в даний час детально ще не вивчений. Було зроблено припущення, що цей феномен у штамів-продуцентів феназинів пов'язаний із наявністю потужної антиоксидантної системи, яка здатна індукуватися в присутності активних форм кисню, ефективно пригнічувати розвиток окисного стресу і забезпечувати не тільки виживання бактерій-продуцентів у цих умовах, але також і синтез антибіотиків [5, 7].

Ще одна сполука, виявлена у гаупсину має назву піролнітрин – активний агент групи фенілпіролів. Цей антибіотик був виявлений в культуральній рідині штаму В-306. Він діє на багато видів паразитичних і сапрофітних грибів в концентрації від 0,19 до 10 мкг / мл, а також ефективний відносно грампозитивних і грамнегативних бактерій. Активність піролнітрина обумовлена порушенням роботи електрон-транспортного ланцюга внаслідок блоку передачі електронів на ділянці між дегідрогеназою і цитохромом С, що призводить до порушення клітинного дихання, і, як наслідок, пригнічення росту мікроорганізмів. В даний час піролнітрин визнаний одним з найефективніших антибіотиків за здатністю пригнічувати вегетативну і генеративну функції патогенних грибів [24, 27].

Високоактивними противірусними агентами виявилися ліпополісахариди (ЛПС), виділені з клітин штамів В-111 і В-306. Вони пригнічують інфекційність вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на моделі трьох видів рослин-індикаторів (дурману *Datura stramonium* L., тютюну *Nicotiana tabacum* L. і *Nicotiana sanderae* H.) в концентраціях від 0.001 до 10 мг / мл. О-специфічні бічні ланцюги ЛПС обох штамів не інгібують ВТМ, у той же час олігосахариди кора гальмують розвиток вірусної інфекції [25, 26]. Подальші дослідження ЛПС *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* доводять їх високу ефективність щодо вірусів теплокровних - грипу, герпесу і гепатиту С [17].

Таким чином, біопрепарат гаупсин, а також штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens*, що входять до його складу, володіють сукупністю корисних властивостей, що забезпечують ефективний захист сільськогосподарських рослин. Це, перш за все, синтез антифунгальних і антибактеріальних речовин, а також вторинних метаболітів, що пригнічують розвиток збудників захворювань рослин. На сьогоднішній день дані властивості штамів-продуцентів, та, безпосередньо, самого препарату активно вивчаються і широко використовуються у світовій практиці біологічного контролю та захисту рослин [28].

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1. Генетичні карти продуцента

Представники роду *Pseudomonas* відомі своєю метаболічною універсальністю. Вони здатні перетворювати ряд ксенобіотиків завдяки своїй здатності набувати нові гени та змінювати експресію існуючих. Розуміння відносного хромосомного положення відповідних генів, різноманіття мобільних генетичних елементів, що виявлені у представників цього роду, а також роль цих мобільних генетичних елементів у стабільності та метаболічній адаптації окремих ізолятів можуть бути корисними для регуляторних оцінок.

Види роду *Pseudomonas* містять велику різноманітність плазмід, послідовностей вставок та транспозонів.

Узагальнений геном *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* має приблизно 180-кратне покриття та ця послідовність становить 6,662,896 пар нуклеотидів, розміщена у двох контигах (6,646,309 та 16,587 пар нуклеотидів), кругова хромосома зображена на рис. 3.1. Серед досліджуваних представників роду *Pseudomonas*, вид *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* має найвище значення вмісту Гуанін + Цитозин Г/Ц (64,01%). Дані значення можуть дещо відрізнятися, в залежності від штаму, проте в межах виду відхилення незначні [29].

У базі даних *Pseudomonas* Genome DB міститься зображення геному (хромосоми) штаму *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 30-84 (рис.3.2). Довжина - 6 646 321 нуклеотидних пар, що не значно відрізняється від узагальненої моделі. Відсоток пар гуанін-цитозин (ГЦ) – 62,9 %.

					ДП 6118.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ			
Розробив	Скляр Ю.О.							
Консульт.								
Керівник	Клочко В.В.							
Затверд.								
						Стадія	Аркуш	Аркушів
							27	103
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

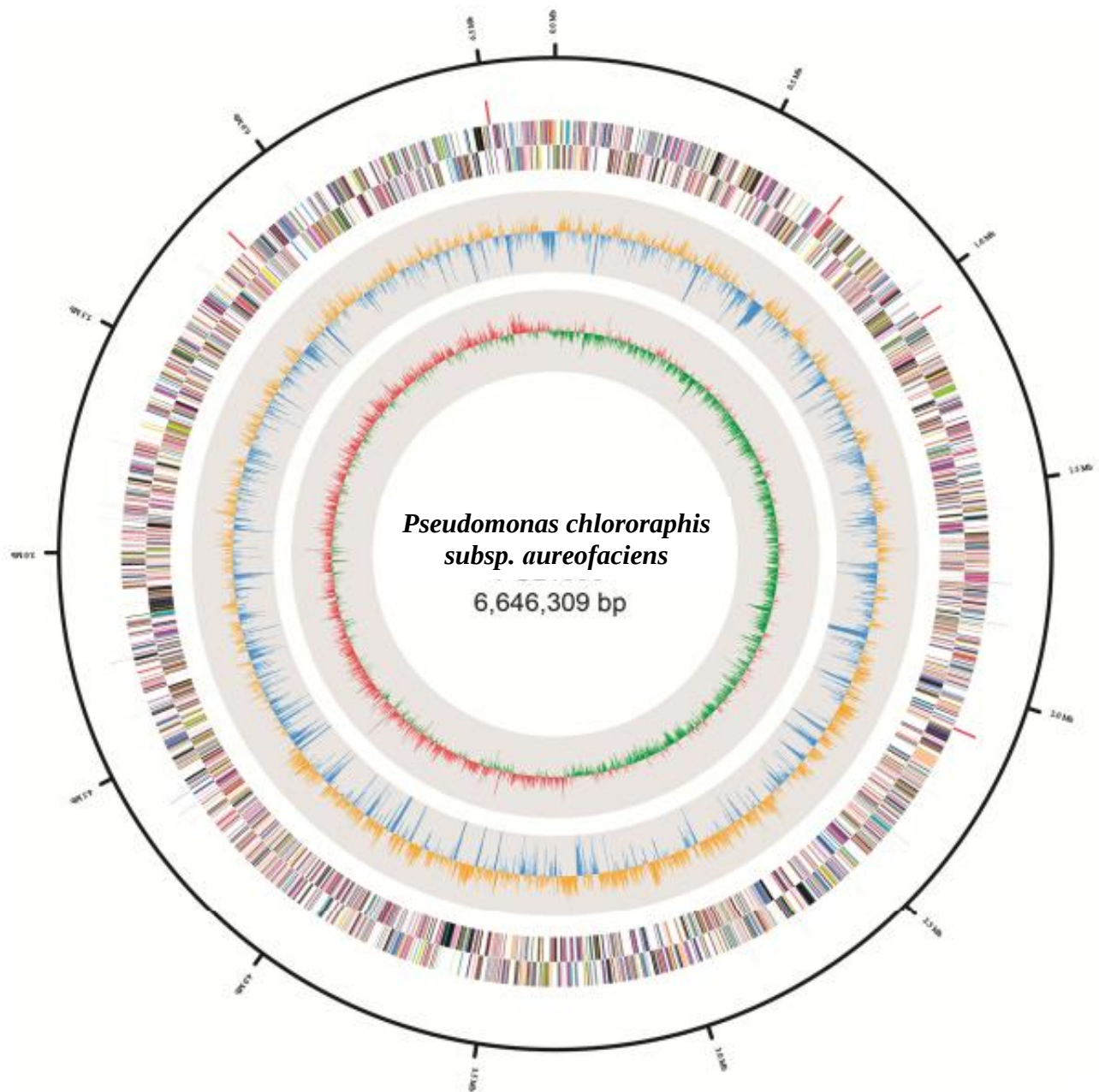


Рисунок 3.1. Кругова карта геному *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*. Контиг 6,65 Mbp об'єднали на 3'-кінці з 5'-кінцем контигу 16,6 Kbp, в результаті чого утворилася кільцева послідовність. Перший нуклеотид карти відповідає першому нуклеотиду контигу 6,65 Mbp. Кожне кільце кола має різну інформацію про геном: рРНК / тРНК, послідовність зворотного кодування (CDS), пряма кодуєча послідовність, перекошення ГЦ та коефіцієнт ГЦ від самого зовнішнього кільця, що рухається. Кожен колір відповідає різному кластеру ортологічної групи функціональної анотації.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

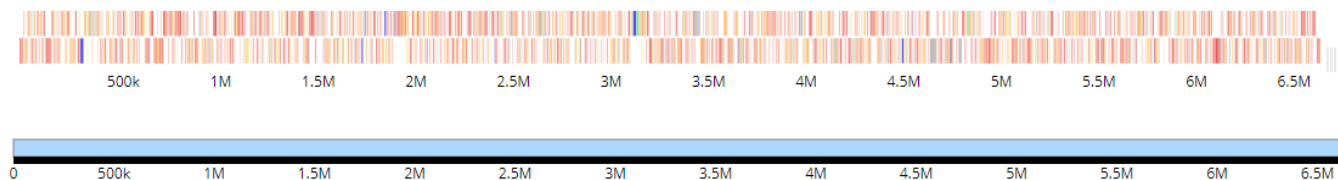


Рисунок 3.2. Послідовність пар нуклеотидів штаму *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 30-84.

Були анотовані наступні особливості даного штаму:

- гени - 5880;
- кодуючі послідовності (ділянки) – 5787;
- тРНК – 73;
- інтрони (некодуючі послідовності) - 46;
- рРНК – 19;
- ядерна РНК – 2.

Субклітинні локалізації генів:

- цитоплазма – 2559;
- цитоплазматична мембрана – 1391;
- невідомі – 1293;
- периплазматичні -190;
- зовнішня мембрана – 157;
- невідомі (такий білок може мати кілька сайтів локалізації) -134;
- позаклітинні (на поверхні клітини) – 61;
- джгутики – 17;
- фімбрії – 3 [30].

Загалом, особливості геному штамів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* дуже схожі. Середній розмір геному штаму, який було виділено з ризосфери рослини нижчий (в середньому 6,63 Mbp - мільйонів нуклеотидних послідовностей), ніж виділеного з ґрунту (в середньому 6,83 Mbp) і з філосфери (лише один репрезентативний штам 7,15 Mbp).

Актуальна класифікація псевдомонад заснована на гомологіях рРНК. Змінені та збережені області молекули РНК мають важливе значення для ідентифікації. Захищені участки служать мішенями для сайтів зв'язування

праймерів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та зондів універсальної гібридизації. Змінні участки є мішенями гібридизаційних зондів і праймерів, які залежать від таксону. Зонди та ПЛР-праймери, спрямовані на діагностичні послідовності рРНК, полегшили класифікацію псевдомонад на п'ять груп.

Молекули рРНК є потужними еволюційними годинниками для опису філогенетичних зв'язків між групами рРНК псевдомонад. Наразі, однак, вони не в змозі позиціонувати окремі штами на видові групи.

Філогенетичний зв'язок (рис. 3.3) *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* з іншими представниками роду *Pseudomonas* було досліджено, проаналізувавши штами з порівнянням набору генів, що кодують білки (groV, groD, gyrB, recA, ascA, aroE, mutL та guaA) [29].

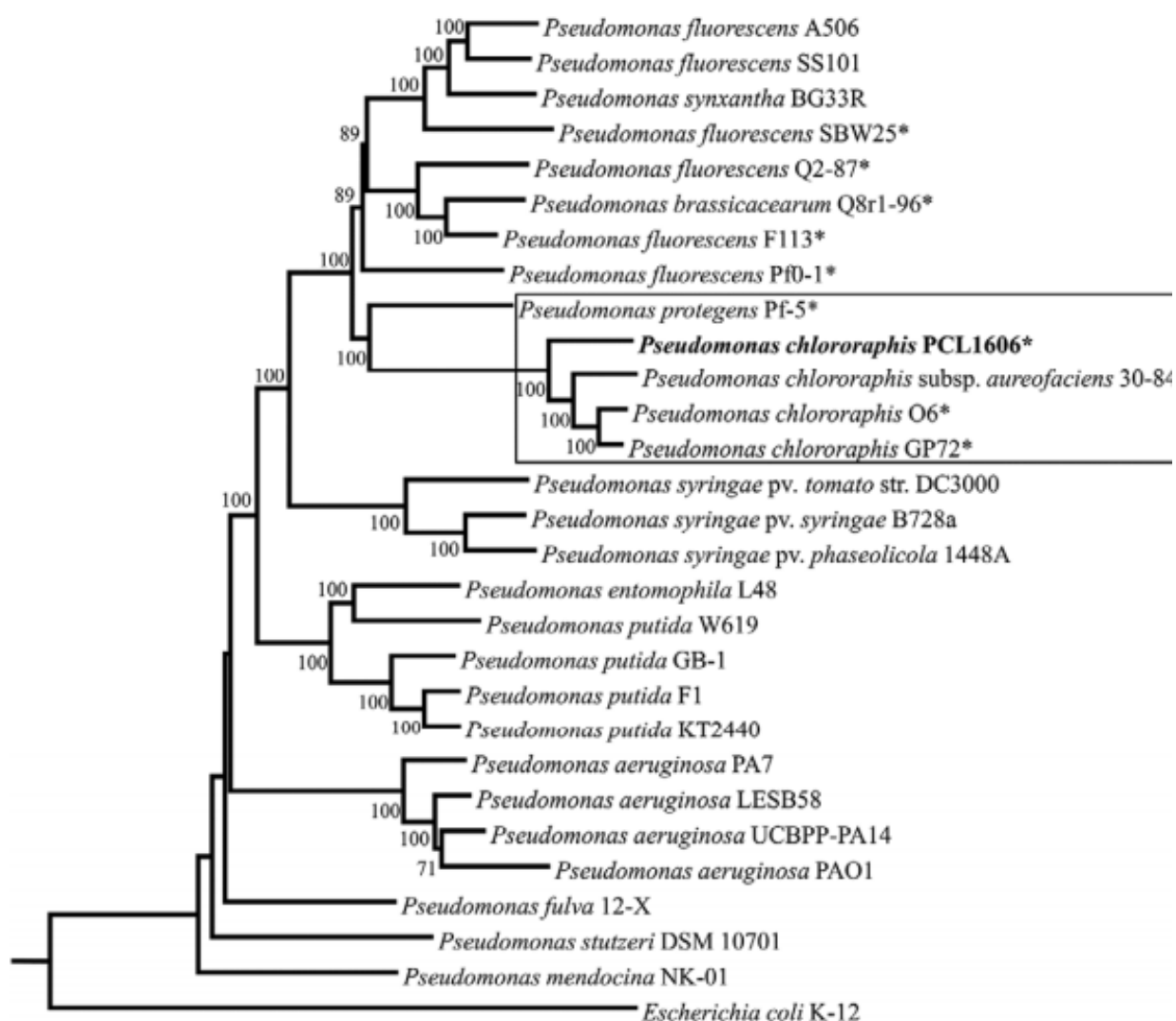


Рисунок 3.3. Філогенетичне дерево, що показує взаємозв'язок секвенованих штамів роду *Pseudomonas*.

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

Певні псевдомонади здатні інгібувати грибові захворювання за допомогою синтезу вторинних метаболітів шляхом процесу, відомого як біологічний контроль. Вченими було встановлено, що біоконтроль бактеріями *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* відбувається за допомогою прямих та непрямих механізмів. Пряме інгібування збудника є результатом впливу бактеріальних продуктів, що виділяються, включаючи антибіотики піролінтрин (PRN) та феназин (PHZ), а також HCN, хітинази, протеази, ліпази та сидерофори [31].

Складна регуляторна система регулює експресію антифунгальних речовин, що утворює *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*. На вершині ієрархії знаходиться двоскладова система перетворення сигналу GacS-GacA, яка є важливою для біоконтролю. Разом з Gac працює система Rsm, яка складається з RsmA-подібних трансляційних репресорних білків та малих регуляторних РНК. Додатковими регуляторами, що контролюють синтез метаболітів біоконтролю продуцента, є стаціонарна фаза сигма фактору RpoS, PsrA (*Pseudomonas* Sigma регулятор A), суворя відповідь (stringent response - SR), анаеробний регулятор ANR, а також новий регулятор типу LysR під назвою PtrA [32].

Варто додати, що синтезовані продуцентом речовини виражаються залежно від щільності популяції за допомогою зондування кворуму (quorum sensing - QS). Перша система QS, ідентифікована в *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, складається з регулятора транскрипції PhzR та AHL синтази PhzI. Гени, що кодують ці елементи, phzR та phzI, розташовані вище від біосинтетичного локусу phzABCDEFG. Аналіз мутанта phzR виявила відсутність інгібування грибів, що пояснювалося зниженням експресії генів PHZ, PRN та синтезом протеаз.

Друга система QS під назвою CsaRI (Cell Surface Alteration - зміна поверхні клітин) не бере участі в регуляції вторинних метаболітів або генів

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						31
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

біоконтролю, натомість контролює властивості клітинної поверхні та утворення біоплівки. Геном мікроорганізмів-продуцентів також містить гомологи третьої системи QS, AurRI, які також виявлені у штаму *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* PB-St2; однак дана система ще не була охарактеризована [33].

Основним напрямком дослідження вчених Nidhi Shah, April S. Gislason, Michael Becker та ін. було вивчення ділянки генів, що знаходяться під контролем системи QS у штаму *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* PA23 за допомогою секвенування РНК (RNA-seq). Аналіз показав, що QS регулює приблизно 13% геному продуцента, впливаючи на різні аспекти фізіології, починаючи від виділення екзопродуктів до центрального метаболізму. Функціональна характеристика диференційно експресованих генів у генетичних мутантів PA23phzR та PA23-6863 наведено на рис. 3.4.

Експресовані гени поділяються на функціональні категорії на основі кластеру ортологічних груп (COG). На рисунку позначені гени, важливі для синтезу та регуляції продуктів біоконтролю.

В обох мутантних штаммах з дефіцитом системи QS кількість генів, що беруть участь у синтезі вторинних метаболітів, значно знизилася. Наприклад, гени, необхідні для синтезу фенілгідазину (EY04_RS25715-45), ціаніду водню (EY04_RS11540-50) та екзопротеази (EY04_RS11085), показали зменшення експресії на $\geq 3,42 \log_2$ у порівнянні з диким типом. Аналогічно, експресія біосинтетичних генів піролінтрину (EY04_RS17650-35) зменшилась на 1,93- та 4,17- $\log_2$ відповідно у PA23phzR та PA23-6863.

Інші гени екзопродукту, які були диференційно експресовані в обох похідних QS, включають гени, що кодуєть хітиназу (EY04_RS16020, EY04_RS09705) та біосинтетичні гени сидерофору (EY04_RS15355-410). Коли вчені використовували аналіз кінцевих продуктів для підтвердження результатів, активність хітинази була повністю відсутня як у PA23phzR, так і в PA23-6863 порівняно з диким типом. Сукупно, результати RNAseq відповідають фенотиповим характеристикам штамів з дефіцитом системи QS [34].

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

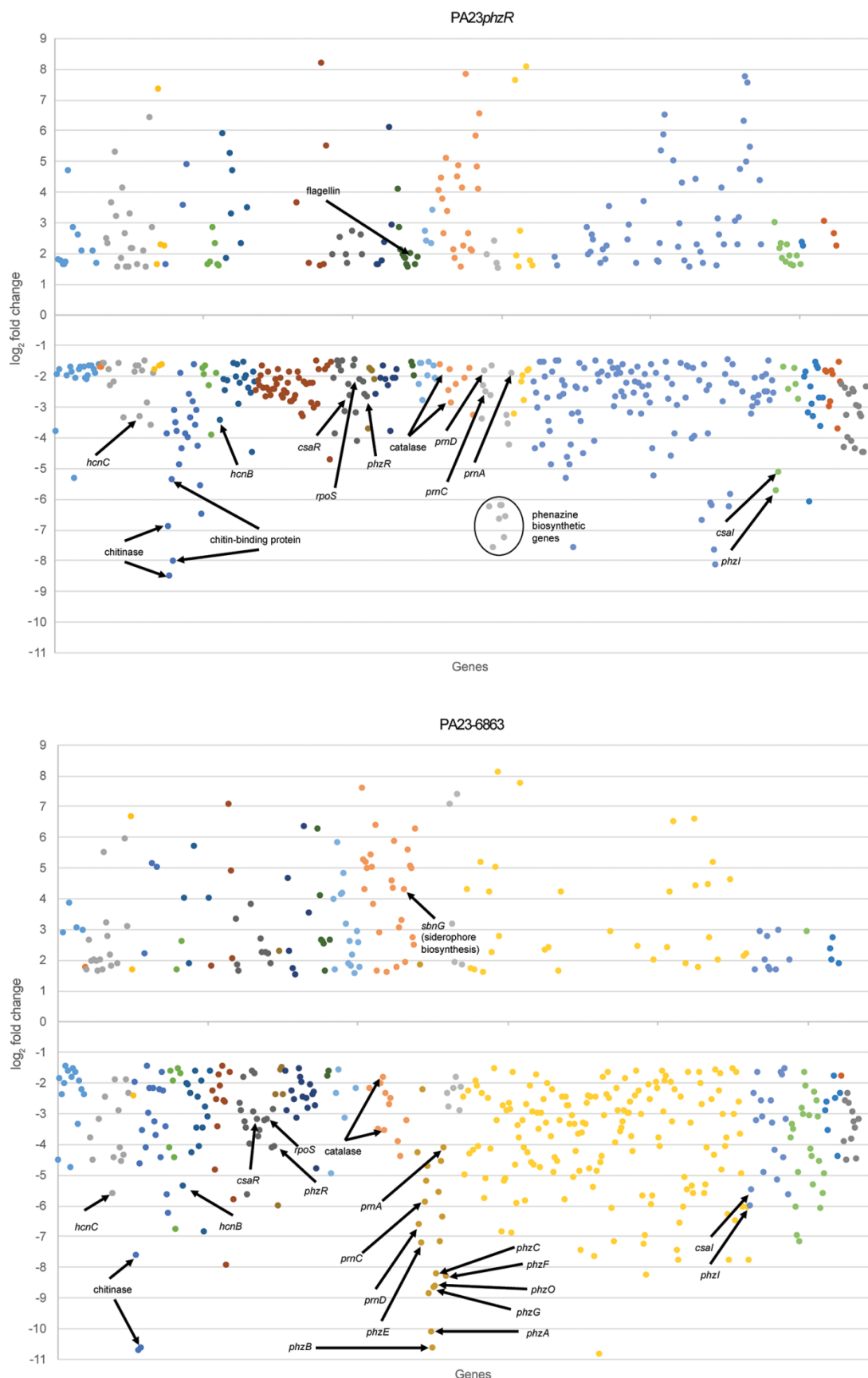


Рисунок 3.4. Диференційно експресовані гени (А) PA23phzR та (В) PA23-6863 порівняно з диким типом PA23.

Найбільший відсоток QS-регульованих транскриптів кодує білки із поки що не встановленою функцією.. Інші основні процеси, які піддаються регулюванню QS, включають ті, що пов'язані з клітинною енергією та метаболізмом, такі як утворення та перетворення енергії, транспорт амінокислот та метаболізм, транспорт вуглеводів і метаболізм, а також транспорт ліпідів та обмін речовин. Відповідно до цих висновків, гени, які пов'язані з біосинтезом та метаболізмом амінокислот, катаболізмом сполук вуглецю, енергетичним обміном та метаболізмом жирних кислот та фосфоліпідів, були диференційовано виражені за відсутності QS. Також було виявлено, що гени, які беруть участь у трансляції, рибосомальній структурі та біогенезі, знаходяться під контролем QS, включаючи велику кількість 50S та 30S рибосомних білків, а також 16S рРНК [33].

Всього 41 ген, що кодує регулятори транскрипції, показав диференційовану експресію в одному або обох штаммах, дефіцитних QS. Експресія 11 генів, що кодують регулятори, була змінена в обох штаммах, тоді як 18 та 12 генів демонстрували змінену експресію лише у PA23-6863 та PA23phzR відповідно. Ці результати підтверджують гіпотезу про те, що значна частина регламенту QS підлягає непрямому контролю [31].

Феназин та його похідні є оранжево-пігментованими гетероциклічними продуктами бактеріального вторинного метаболізму та відомі своїм широким спектром антифунгальної активності. Широке різноманіття похідних феназину, таких як феназин-1-карбонова кислота (PCA) та феназин-1-карбоксамід (PCN), синтезують різні грамнегативні та грампозитивні бактерії, включаючи роди *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* і *Streptomyces*. Основний біосинтетичний генний кластер феназину містить сім генів (phzABCDEFG) і присутній у кількох видів *Pseudomonas*, зокрема у *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* [35].

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aureofaciens* регулює синтез феназину через зондування кворуму, опосередкованого N-ацил-1-гомосерином (AHL). Два набори генів AHL-синтази та AHL-рецепторів, phzI / phzR та aurI / aurR, були ідентифіковані з неповного проекту геному StFRB508 (рис.3.5).

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

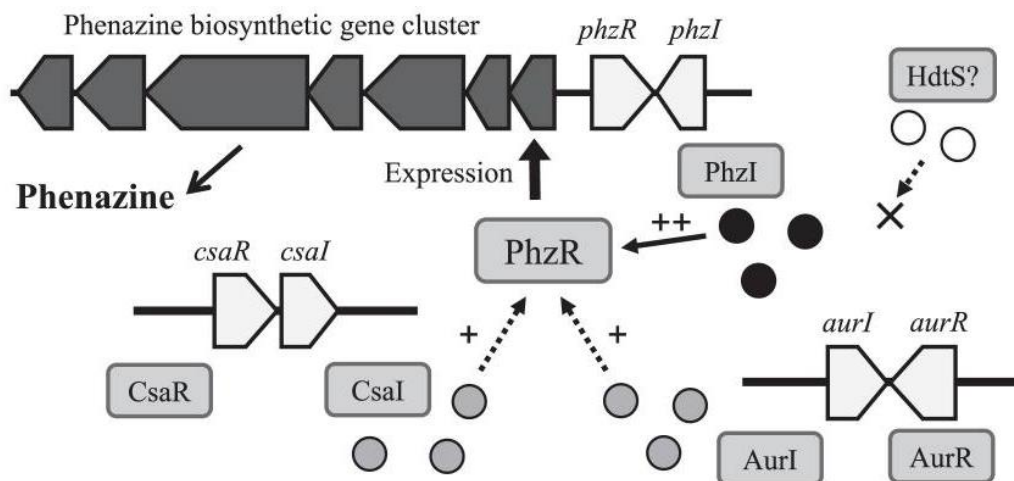


Рисунок 3.5. Схематичне зображення біосинтетичного кластеру генів феназину методом кворумного зондування в StFRB508. П'ятикутники показують орієнтацію та розмір генів. AHL, вироблені PhzI (чорні кола) або AurI / CsaI (сірі кола), сильно (++) або слабо (+) зв'язуються з відповідним білком рецептора PhzR. Комплекс PhzR-AHL зв'язується з промотором і індукує експресію біосинтетичного гена феназину. Імовірні продукти AHL HdtS (білі кола) не зв'язуються з рецептором PhzR.

Дослідження повної послідовності геному виявила наявність третього набору генів, що визначають кворум, позначених як *csaI* / *csaR*. PhzI в основному каталізує біосинтез 3-ОН-С₆-HSL, тоді як AurI та CsaI каталізували лактон- N-гексаноіл-1-гомосерин та N- (3-оксогексаноіл) -1-гомосерин відповідно. Мутація у *phzI* зменшує синтез феназину, тоді як у *aurI* або *csaI* цього не спостерігається [36].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Для отримання високопродуктивних промислових продуцентів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* застосовують штучний добір. При індивідуальному доборі здійснюється відбір не цілих груп, а конкретних

колоній з потрібною ознакою. Це дозволяє виключити вплив модифікаційної мінливості. Аналізуючи потомство кожної колонії мікроорганізмів, можна з більшою точністю визначити, є певна ознака результатом реалізації генотипу чи на її формування вплинули умови, не пов'язані із спадковістю. Індивідуальний добір застосовують для отримання чистих ліній організмів. Штучний добір також поділяють за способом відбору носіїв ознак. При негативному доборі усуваються особини з небажаними ознаками, при позитивному — виділяються особини з бажаними.

Селекція мікроорганізмів повинна враховувати такі їх особливості, як відсутність статевого процесу та гаплоїдність (прокаріоти), можливість швидкого розмноження та здатність до індукованого мутагенезу.

Оскільки у прокаріот немає статевого процесу, до них неможливо застосувати методи гібридизації. Як правило, наявність у генотипі генів, що визначають корисні ознаки, забезпечується шляхом індукованого мутагенезу. Суть методу полягає в тому, що за допомогою мутагенних чинників (рентгенівське проміння, хімічні речовини) викликають мутації і шляхом добору створюють високопродуктивні штами мікроорганізмів. Гаплоїдність більшості прокаріот дозволяє мутації проявитися відразу. Клітини, у генотипі яких є мутація, відбирають та розмножують, формуючи великі культури нащадків однієї клітини (клони) [37].

Клони клітин *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* з необхідними характеристиками висіваються і розмножуються на поживному середовищі. Зразки таких культур зберігаються у спеціальних колекціях (музеях) культур мікроорганізмів.

Відомий трансгенний штам бактерій *Pseudomonas* sp. для біоконтролю грибних хвороб рослин. Даний штам містить локус для біосинтезу феназин-1-карбонової кислоти, вбудований в геном і власні гени для синтезу антибіотика 2,4-діацетилфлороглюцину. Таким чином, штам здатний синтезувати два антибіотики - феназин-1-карбонову кислоту і 2,4-діацетилфлороглюцин. Штам пригнічує фітопатогенні гриби родів *Rhizoctonia*, *Gaeumannomyces graminis* і

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		36

Pythium. Недоліком штаму є те, що він отриманий в результаті генетичних маніпуляцій і є генетично модифікованим мікроорганізмом [38].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Серед хімічних мутагенів широке застосування в роботі з мікроорганізмами отримав алкілюючий агент N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин (нітрозогуанідин, НГ). Даний мутаген викликає різного типу зміни генетичного матеріалу. Перевагою нітрозогуанідину перед іншими хімічними сполуками є його висока мутагенна активність при низьких концентраціях. За допомогою НГ-мутагенезу і подальшої селекції на стійкість до токсичних аналогів метаболітів ароматичного шляху (азасерину, m-фтор-DL-фенілаланіну, 6 діазо-5-оксо-L-норлейцину та ін.) був отриманий мутантний штам *Pseudomonas aurantiaca* В-162 - продуцент антибіотиків феназинового ряду, рівень синтезу яких досяг 205 мг/л, що в 3 рази, вище, ніж у бактерій дикого типу. В ході подальшого мутагенезу було отримано штам В-162/255, стійкий до більш високих концентрацій m-фтор-DL-фенілаланіну, рівень синтезу феназинів у якого досяг 420-450 мг / л, що майже в 7 разів вище, ніж у бактерій дикого типу і майже в 17 разів - ніж у раніше описаних продуцентів *P. fluorescens* і *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* . Встановлено, що в основі надсинтезу феназинових антибіотиків у мутантних штамів лежить дерегуляція ДАГФ-синтази або надсинтез N-гексаноїл-гомосерин лактона (в 2 і 2,3 рази вище для мутантів В-162/298 і В-162/255, відповідно, ніж у вихідного штаму). Однією з можливих причин набуття нової властивості мутантом може бути інактивація гена *greA*, що кодує синтез сенсорної кінази, яка являється регулятором перемикання клітинного метаболізму на синтез вторинних метаболітів. Мутантні бактерії *P. aurantiaca*, які здатні до синтезу феназинових антибіотиків, в тому числі на мінімальних середовищах, можуть бути запропоновані для промислового отримання препаратів феназинових антибіотиків [39]. Слід зазначити, що в разі використання будь-якого мутагенного фактора можна збільшити частоту виходу мутантного потомства

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

шляхом підбору концентрації мутагену, а також використовуючи метод збагачення.

Суть методу збагачення зводиться до внесення антибіотика в бактеріальну культуру, яка культивується в поживному середовищі, що включає всі необхідні компоненти, котрі забезпечують ріст тільки тих клітин, які не містять додаткових мутацій в складі бактеріальної хромосоми. При цьому зростаючі клітини гинуть, тоді як бактерії, що містять додаткові порушення в хромосомі не можуть рости на селективному середовищі, яке використовується і, таким чином, не піддаються впливу антибактеріального фактора. Вибір антибіотика, що використовується для збагачення бактеріальної культури мутантними варіантами, залежить від чутливості вихідного штаму до антибактеріальних препаратів. Зокрема, для бактерій *Pseudomonas mendocina* було встановлено, що клітини чутливі до Ампіоксу (комплексний антибіотик, що складається з ампіциліну і оксациліну в співвідношенні 1: 1) в концентрації 500 мкг / мл, що дозволяє використовувати його в експериментах з індукованим мутагенезом як фактор збагачення для підвищення виходу мутантних бактерій.

Кожен новий штам мікроорганізмів є унікальною генетичною системою, що вимагає індивідуального підбору оптимальних умов для дії обраного мутагенного фактора. При обробці бактеріальної культури у вихідній концентрації 108 кл / мл протягом 30 хв нітрозогуанідом в концентрації 150, 120 і 100 мкг / мл відповідно виживання клітин становить 0,1-0,5%, при подальшому збагаченні мутагенізованої культури АМПІОКСом не було виявлено клонів клітин, що містять мутації. У ряді експериментів було встановлено, що зниження концентрації нітрозогуанідину до 75 або 50 мкг / мл призводить до падіння виживання бактерій до рівня ~ 1%, при цьому 0,2% клонів містять ауксотрофні мутації, частина з яких не виявляється стандартними методами. Даний результат може свідчити про численні порушення, що виникають в бактеріальній хромосомі. Подальше зниження концентрації нітрозогуанідину (до 20 мкг / мл) призводило до зростання виживання бактеріальної культури (10%), при якій частота одиночних мутацій зростала до 5%. У той же час зниження кінцевої концентрації нітрозогуанідину

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

до 10 мкг / мл не забезпечувало падіння виживання клітин після мутагенезу (90%), що не дозволило відібрати клони, які несуть ауксотрофні мутації. Зниження чи підвищення тривалості мутагенезу (20 і 40 хв) при збереженні інших умов (концентрації нітрозогуанідина та вихідної концентрації клітин) не призводило до змін ефективності мутагенезу і не забезпечувало виявлення ауксотрофних мутантів.

Кожна нова отримана мутація перевірялася на здатність відновлювати вихідний («дикий») фенотип. Для цього бактеріальну культуру, що знаходиться в стаціонарній фазі росту, згущували в 100 разів і висівали на мінімальне середовище без відповідної добавки. Для подальшого мутагенезу відбирали тільки ті мутантні бактерії, які не давали реверсій до «дикого» типу [40].

Варто зазначити, що використання даних методів індукованого мутагенезу можливе і для продуцента цільового продукту *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, адже даний вид має ті ж самі біохімічні властивості і являється продуцентом антибіотиків феназинового ряду, як і досліджувані штами.

3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

В результаті дослідження білоруських вчених була розроблена методика сайт-спрямованого інсерційного мутагенезу з використанням інтеграційного вектора pK18mob для бактерій роду *Pseudomonas*. У дослідженні показано, що оптимальне співвідношення клітин донора і реципієнта складає 50: 50. В той же час у бактерій *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, а також їх підвидів спостерігається зсув оптимального співвідношення в бік переважання клітин донора.

Сайт-спрямований інсерційний мутагенез відноситься до найбільш перспективних підходів вивчення функції генів та їх продуктів. Одним з інтеграційних суїцидальних (летальних) векторів, які використовуються для проведення сайт-спрямованого мутагенезу, є плазміда pK18mob. Даний вектор

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

має відносно невеликий розмір, що полегшує його перенесення в клітини реципієнта. У складі плазміни є гени стійкості до антибіотиків ампіциліну і канаміцину, що дозволяють проводити селективний відбір транскон'югантів.

У ділянку, де локалізований ген стійкості до ампіциліну, був поміщений полілінкер. В даний сайт здійснюється клонування ділянки гена, який збираються інактивувати. Це робиться з метою створення області гомології між плазмідною і хромосоною та забезпечує подальше вбудовування плазмід в ген за допомогою гомологічної рекомбінації. З обох сторін полілінкер оточений областями, гомологічними ділянкам генома ага M13, що дає можливість використовувати стандартні праймери для подальшого виявлення сайту, в який впроваджена генно-інженерна конструкція. Плазміда переноситься в клітини донора тільки шляхом кон'югації, що дозволяє використовувати її для спрямованої інактивації генів у тих бактерій, у яких трансформація неможлива або важкодоступна [41].

Використання даної методики дозволяє збільшити вихід транскон'югантів більш ніж в чотири рази, що істотно розширює можливості з пошуку і відбору штамів, які цікавлять дослідників. У проводилась перевірка на наявність гена *psrA*, який був обраний в якості мішені для інактивації, так як згідно з літературними даними він повинен бути присутнім в геномах більшості представників роду *Pseudomonas*. Для перевірки наявності даного гена в геномах колекційних штамів було проведено ПЛР-скринінг з використанням праймерів до даного гену.

Параметри циклів ампліфікації: первинна денатурація - 1 хв при 94 ° С; потім 10 циклів: денатурація - 94 ° С, 30 с; обпалювання - 59 ° С, 30 с; елонгація - 68 ° С, 1 хв; 20 циклів: денатурація - 94 ° С, 30 с; обпалювання - 53 ° С, 30 с; елонгація - 68 ° С, 1 хв; заключна добування - 70 ° С, 5 хв. Для ідентифікації генно-інженерної конструкції на основі плазміді pK18mob в області хромосомного *psrA*-гена проводили ПЛР-аналіз (ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція) з використанням суміші полімераз Taq і Rfu та праймерів до повнорозмірного гену. ПЛР-аналіз на наявність генно-інженерної конструкції в

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

складі бактеріальної хромосоми здійснювали за наступною програмою ампліфікації: первинна денатурація - 3 хв при 94 ° С; потім 30 циклів: денатурація - 94 ° С, 1 хв; обпалювання - 55 ° С, 30 с; елонгація - 68 ° С, 3 хв; заключна добудова - 68 ° С, 5 хв. Використовували ПЛР-ампліфікатор С1000 Touch™ ThermalCycler BIO RAD (Німеччина).

В результаті проведених досліджень вченими було встановлено, що оптимальне співвідношення клітин донора і реципієнта для більшої частини досліджених в цьому відношенні представників роду *Pseudomonas* досягає 50: 50. При цьому співвідношенні і близькому до нього співвідношенні 40 : 60 спостерігається найбільша кількість колоній транскон'югантів у п'яти з восьми досліджених штамів. У той же час цікавим виявився той факт, що для *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-1391 і спорідненого штаму *P. chlororaphis ssp. aurantiaca* B-162 оптимальне співвідношення «донор - реципієнт» було суттєво зміщено в бік переважання клітин донора.

Таким чином, в ході проведеного дослідження були підібрані оптимальні умови проведення сайт-спрямованого інсерційного мутагенезу з використанням суїцидального інтегративного вектора pK18mob для бактерій роду *Pseudomonas*. Дана методика дає можливість збільшити вихід транскон'югантів більш ніж в чотири рази. Це, в свою чергу, розширює можливості відбору штамів з найбільш цікавими фенотипічними проявами мутацій в цьому гені, що дозволяє точніше визначити його функціональне значення і роль PsrA-білка в регуляції вторинного метаболізму у представників роду *Pseudomonas*. Наявність даного гена в геномах досліджених штамів *Pseudomonas* додатково підтверджує його важливість для протікання біохімічних процесів в клітинах бактерій цього роду [42].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

На основі аналізу літературних даних щодо отримання промислових продуцентів роду *Pseudomonas* за допомогою індукованого мутагенезу, зокрема хімічного мутагенезу з використанням N-метил-N-нітро-N-

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						41
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

нітрозогуанідину (нітрозогуанідину) складена наступна схема отримання продуцента *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* [40]:



РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Характеристика кінцевої продукції виробництва:

1. Назва продукції. Біопрепарат гаупсин.
2. Категорія та номер діючого нормативно-технічного документу на продукцію та реєстраційний номер. Препарат відповідає ТУ У 24.2-31374036-001-2009. Свідоцтво про державну реєстрацію А №02155, патент №40089. Висновок санітарно-епідеміологічної служби №05.03.02-05/2938 від 22.01.2010 року (Додатки А-В).

3. Призначення продукції та можливі галузі використання. Гаупсин захищає рослини як фунгіцид від коренових і листових хвороб, як інсектицид від комах-шкідників; стимулює ріст кореневої системи і покращує живлення рослин; збільшує стійкість культур до заморозків і посухи; застосовується на всіх культурах (польові, садові, городні культури і декоративні рослини); не викликає резистентності патогенів; збільшує врожайність; не має періоду очікування до використання продукції, тому що препарат не токсичний для людини і тварин; знижує стресові дії хімічних препаратів; продовжує термін зберігання зерна, овочів, фруктів. Препарат має ростостимулюючу дію. При обробці насіння, замочування розсади підвищує польову схожість і проростання на 10-20%, сприяє посиленому розвитку кореневої системи. Використовується в сільськогосподарській галузі. Основними споживачами препарату є дрібні та середні фермерські господарства, а також приватні особи.

4. Стислий опис зовнішнього вигляду та фізико-хімічних характеристик продукції (Додаток Д).

- Опис: культуральна рідина штамів виду *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofeciens* та їх метаболіти.
- Зовнішній вигляд: рідина світло-жовтого кольору з опалесценцією.

					ДП 6118.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив	Скляр Ю.О.						43	103
Консульт.								
Керівник	Клочко В.В.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затверд.								

- Запах: незначний специфічний запах бактеріального концентрату.
- Водневий показник розчину препарату, од. рН: 6,3-7,3.
- Колір: суспензія від світло-жовтого до світло-бурого чи бурого кольору.
- Загальна кількість життєздатних клітин *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofeciens* (КУО): не менше 1×10^{10} .
- Загальна кількість сторонніх мікроорганізмів: не більше 1%.

5. Нормативні вимоги до упаковки, маркування, зберігання та терміну придатності продукції. Маркування згідно з ГОСТ 28471 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение». Дата виготовлення зазначається на етикетці. Пакування згідно з ГОСТ 28471 в ПЕТ-ємності (пляшки чи канистри) об'ємом 0,5, 1, 5, 10 л.

Препарат зберігається при $t^{\circ} +4 \dots +10^{\circ} \text{C}$ 6 місяців, при $t^{\circ} +20 \dots +50^{\circ} \text{C}$ 4 місяці. Зберігати в закритих приміщеннях, уникаючи попадання прямих сонячних променів. Препарат не можна заморожувати.

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

Показники, що регламентують вимоги до якості сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у даному виробництві наведено у таблиці 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. Основна сировина:			
1.1. Вода очищена	ДСТУ 7525:2014	Згідно вимогам	Компонент ПС
1.2. Двозаміщений фосфат калію	ГОСТ 2493-75	Масова доля не менше 99%	Компонент ПС
1.3. Екстракт пекарських дріжджів	ГОСТ 10444.1	Мікробіологічна чистота	Компонент ПС

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1.4. Культура <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofeciens</i> штами УКМ В-111 і У КМ В-306	ГОСТ 28495-90	Відсутність сторонньої мікрофлори	Продуцент
1.5. Меляса	ДСТУ 3696-98	Масова частка сухих речовин не менше 75%	Компонент ПС
1.6. Натрію гідроксид	ГОСТ 4328-77	Масова частка не менше 99%	Для регулювання рН
1.7. Натрію нітрат	ГОСТ 34098- 2017	Масова доля не менше 99%	Компонент ПС
1.8. Пептон	ГОСТ 13805-76	Масова частка істинного пептону не менше 70%	Компонент ПС
1.9. Соляна кислота	ГОСТ 3118-77	Масова частка не менше 35- 38%	Для регулювання рН
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Смак, запах, вміст мікробних частин, рН, жорсткість	Для ополіскування
2.2. Вода технічна	ГОСТ 17.1.1.04- 80	Відсутність механічних часток	Для подачі в сорочку ферментера
2.3. Етиловий спирт	ГОСТ 18300-87	Об'ємна доля не менш 96,2%	Для дезінфекції
2.4. Повітря очищене	ГОСТ Р ИСО 8573-1-2016	Кількість КУО, не більше ніж 10^{-6} кл/м ³	Для аерації
2.5. Миючий засіб “Біолот”	ТУ 18 РСФСР 718-77	Згідно вимог	Для миття обладнання, поверхонь, прання одягу
2.6. Хлорамін Б	ГОСТ 939214	Згідно вимог	Для дезінфекції

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		

3. Матеріали			
3.1. Губки	ГОСТ Р 50962-96	Зовнішній вигляд	Для мийки посуду, обладнання
3.2. Гумові рукавички	ГОСТ 20010-93	Зовнішній вигляд	Для персоналу
3.3. Гумовий фартух	ГОСТ 12.4.029-76	Зовнішній вигляд	Для персоналу
3.4. Електроди	ГОСТ 16287-77	Зовнішній вигляд	Для виміру рН
3.5. Етикетки	ТУ 9571-002-14350732-2006	Зовнішній вигляд	Для маркування
3.6. Колби	ГОСТ 1770-74	Згідно вимог	Для розмноження музейної культури
3.7. Каністри з кришками об'ємом 10 л	ГОСТ 33756-2016	Згідно вимог	Первинна упаковка
3.8. Коробки картонні	ГОСТ 9142-90	Згідно вимог	Для пакування
3.9. Мікробіологічні петлі	ГОСТ 29169-91	Згідно вимог	Для пересівання культури
3.10. Піпетки різних об'ємів	ГОСТ 29227-91	Згідно вимог	Лабораторний посуд
3.11. Пляшки з кришками об'ємом 1 л	ГОСТ 32686-2014	Згідно вимог	Первинна упаковка
3.12. Пробірки	ГОСТ 1770-74	Згідно вимог	Для культивування музейної культури
3.13. Пробки	ГОСТ 7851-74	Згідно вимог	Для закупорювання пробірок
3.14. Спецодяг	ГОСТ 12.4.280-2014	Зовнішній вигляд	Для персоналу
3.15. Чашки Петрі	ГОСТ 23932-90	Згідно вимог	Лабораторний посуд

4.3. Опис технологічного процесу

Вибір технологічних способів та прийомів реалізується на основі відомої (типової) технології, описаної головним чином в роботі Кликовой М.В. «Біологічне обґрунтування використання штаму *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3 як продуцента антимікробних препаратів».

Типова технологічна схема виробництва біопрепарату гаупсин складається із наступних послідовних операцій:

- приготування поживного середовища;
- отримання посівного матеріалу;
- глибинне культивування продуцента;
- відділення культуральної рідини;
- мікрофільтрація та випарювання фугату;
- висушування біомаси клітин (Рис.4.1).

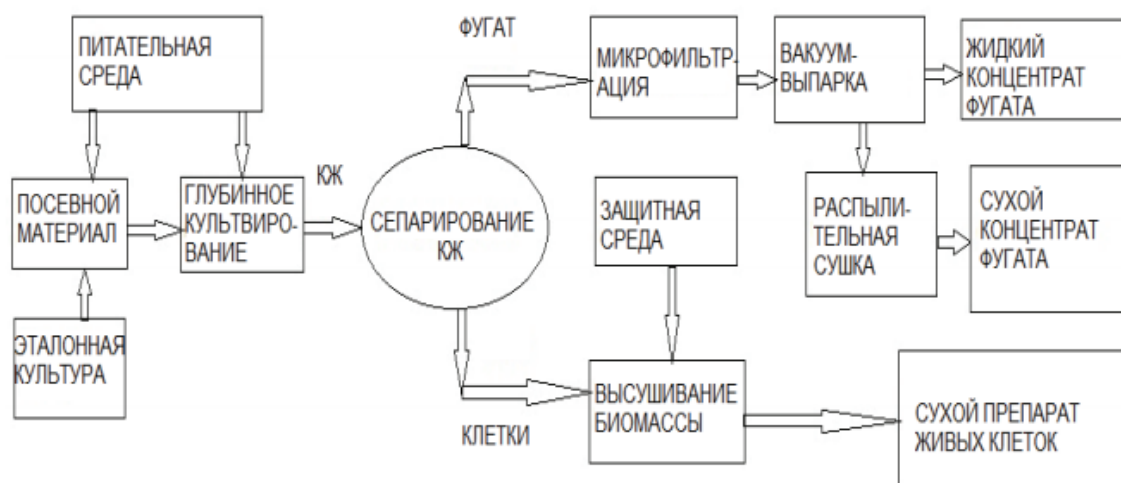


Рисунок 4.1. Схема процесу отримання зразків біопрепарату на основі біомаси штаму Vsk-26a3 і продуктів його метаболізму.

В даному дипломному проекті наведена типова технологічна схема виробництва препарату гаупсин в рідкій формі, а отже розлив препарату в тару відбувається безпосередньо після закінчення процесу культивування. Біопрепарат гаупсин містить клітини *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 з титром не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ разом із середовищем культивування, вторинні метаболіти - біологічно-активні

речовини (БАР): кислоти із роду феназин-карбонових та комплекс активних пігментів, які є діючими факторами в препараті.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Неякісне виконання санітарної підготовки впливає на багато факторів, такі як якість продукції, перевезення та зберігання, а також впливає на працівників і піддає ризику їх здоров'я.

ДР 1.1. Підготовка технологічної води та води питної

Груба очистка необхідна, щоб потім перейти до наступного етапу, більш тонкої очистки. Воду пропускають через фільтри грубої очистки для видалення грубих дисперсних частин, такі як пісок, іржа, глина, волокна та інші механічні домішки. Використовують сітчасті фільтри для затримки частинок розмірами від 20 до 300 мкм.

Воду питну отримують з води природних джерел шляхом очищення за допомогою методів, що полягають у коагуляції, осадженні й фільтрації нерозчинних домішок та видалення патогенних мікроорганізмів шляхом аерації, хлорування або кип'ятіння.

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Дезінфекцію проводять для знищення патогенних мікроорганізмів та виключення можливості контамінації продукту. Приготування миючих та дезінфікуючих речовин здійснюється строго за правилами техніки безпеки.

ДР 1.2.1. Приготування розчину миючого засобу

На біотехнологічних та хімічних виробництвах при обробці значних об'ємів, поверхонь обладнання та інвентарю, при обробці виробничих приміщень віддають перевагу економічно вигідним та достатньо ефективним дезінфікуючим речовинам. Найчастіше використовують "Біолот" та "Еколаб". Їх готують розведенням 2 і 3 г відповідно до 1 л води.

ДР 1.2.2. Приготування розчину Хлораміну Б

Хлорамін має бактерицидні, протівірусні та спороцидні властивості, особливо в кислому і нейтральному середовищі. Препарат виявляє антимікробну дію проти вегетативних форм в концентрації 0,25 - 0,5 % і температурі 30°C та високу ефективність проти спор при 50-60°C. Водний

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		48

розчин з масовою часткою хлораміну Б (моноклораміну Б) від 0,3 до 3% використовують для обробки поверхонь, прилеглих приміщень, виробничих приміщень, а в технологічних приміщеннях місць, куди потрапляють компоненти поживного середовища чи культуральна рідина.

Хлорамін Б – бензосульфохлорамід натрію – білий кристалічний порошок, який готують розведенням: 1 л хлораміну до 20 л води. Містить 25-29% активного хлору (ВТУ 27/24-79-65).

ДР 1.2.3. Приготування розчину етилового спирту 76%

Щоб приготувати 1 л спирту 76%, потрібно 800 мл етилового спирту 96% і 221 мл води очищеної. Після розведення в нержавіючій ємності обов'язково фільтрують.

ДР 1.3 Підготовка одягу

При визначенні способу очищення спецодягу слід враховувати особливості його експлуатації. Наприклад, утеплений одяг та одяг, оброблений спеціальними речовинами прати та прасувати заборонено.

ДР 1.4. Санітарна підготовка персоналу

Персонал повинен дотримуватися санітарних норм на виробництві. Працівники повинні одягати придатний для роботи одяг. Чітко контролюється вхід та вихід у виробничі приміщення.

Коли персонал допускається на виробництво, має пройти інструктаж з охорони праці, техніки безпеки, ознайомитися із правилами пожежної та електробезпеки. Необхідно регулярно проводити навчання персоналу силами кваліфікованих спеціалістів з відділу охорони праці. Потрібно вести протоколи інструктажів. Раз в рік проводяться повторні інструктажі.

ДР 1.5. Підготовка виробничих приміщень

Дезінфекцію та прибирання виробничих приміщень проводять в спеціально відведених гумових рукавичках, чоботах та гумовому фартусі, якщо треба ще використовують респіратор.

ДР 1.6. Підготовка обладнання та комунікацій

Перед роботою обладнання перевіряється на дефекти. Також перевіряється герметичність ферментера.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

ДР 1.6.1. Мийка та дезінфекція обладнання

Мийка інокулятора місткістю 1 м³ та ферментера місткістю 8 м³, з коефіцієнтом заповнення 0,7, перемішуючим пристроєм та барботером, здійснюється за допомогою подачі питної води з магістрального трубопроводу. Приготування миючих засобів та дезінфікуючих розчинів здійснюється шляхом розведення та змішування відповідних речовин зі складу. Перед початком роботи ферментер оглядають. Відпрацьована вода по трубопроводах прямує до ділянки знешкодження відходів. T=0,5 год, t=80°C, p=0,5-1 МПа. Контроль технологічний, контроль хімічний.

ДР 1.6.2. Ополіскування обладнання

Ополіскування проводиться за допомогою подачі питної води для видалення залишків розчину для мийки. Відпрацьована вода T1.2 по трубопроводах прямує до ділянки знешкодження відходів. T=1 год, t=80°C. Контроль технологічний.

ДР 1.6.3. Стерилізація обладнання

Стерилізація проводиться насиченою водяною парою при температурі 135°C протягом 1-2 год. Конденсат стікає в нижню частину і видаляється через нижній штуцер. По завершенні процесу стерилізації штуцер відведення конденсату перекривається і надходить стерильне повітря, що заповнює ущільнюючий пристрій. Протягом усього процесу культивування тиск повітря підтримується на рівні 0,15-0,2 МПа. Конденсат і вторинна пара прямують до ділянки переробки відходів.

ДР 2. Підготовка стерильного повітря

Як правило в біотехнології питання технологічного повітря асоціюються з його функціями при біосинтезі. Технологічне аераційне повітря є джерелом лімітуючого субстрату – кисню і є джерелом енергії при перемішуванні культуральної рідини.

ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери

Як правило забір повітря проводиться з атмосфери за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10 м. Висота труби – 10 м, діаметр труби 300 мм. Труба розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		

загазованістю. Очистка ведеться з початку при заборі повітря. Повітря проходить крізь решітку встановлену у повітропроводі для видалення крупних механічних часток – листя гілки та ін.

ДР 2.2 Попереднє очищення від механічних частинок

Перед подачею повітря до фільтру попередньої очистки, контролюється рівень відносної вологості за допомогою психрометра та рівень забруднення повітря біологічними контамінантами. Здійснюється відбір проби, після чого за показником різниці термометрів у психрометра визначають рівень відносної вологості, і, при необхідності, за таблицями визначають рівень абсолютної вологості. Це необхідно для подовження терміну роботи фільтру.

Вимірювання рівня біологічної контамінації здійснюють за допомогою імпактора «Флора-100». За допомогою імпактора здійснюється відбір проби, певного заданого об'єму, відбувається осадження мікроорганізмів на чашку Петрі зі щільним поживним середовищем. Після культивування мікроорганізмів, вимірюють кількісний вміст КУО на 1 м³.

Фільтр попередньої очистки від механічних часток складається з гофрованих, оброблених маслом сіток конструкції Рекка. Кількість гофрованих плетених сіток 12, отвори яких зменшуються у напрямку руху очищеного повітря. Видаляються частинки розміром більше 5 мкм.

ДР 2.3 Стиснення повітря на турбокомпресорі

Після виходу повітря з фільтру попередньої очистки, знову роблять відбір проби за допомогою імпактора «Флора-100», осаджують мікроорганізми в чашку Петрі, після підрозрахунку мікроорганізмів визначають кількісний вміст. Після фіксації показників на вході і виході з фільтру, визначають ефективність, порівнюють з заявленою.

Після фільтру повітря направляється на турбокомпресор, який забезпечує стискання повітря до тиску 0,2 МПа і при цьому повітря нагрівається до 200 °С на виході. Контролюють тиск за допомогою манометра.

За допомогою анемометра крилатого здійснюють вимір швидкості потоку повітря в системі. Даний вид анемометра забезпечує фіксацію найменшого рівня змін швидкості потоків.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						51
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2.4 Охолодження повітря

В теплообміннику повітря охолоджується до температури нижче 40°C, так як біологічний агент потребує температури 28°C. Для контролю параметрів встановлений датчик температур та манометр для контролю рівня тиску в апараті. Так як існує залежність температури повітря від вологості, то також здійснюється контроль цього параметру за допомогою психрометра.

ДР 2.5 Конденсація вологи

Для відділення вологи необхідно направити повітря в ресивер. Дана операція запобігає завчасному виходу з ладу головного та індивідуального фільтрів, у яких використовується тканина Петрянова.

ДР 2.6 Стабілізація термодинамічних показників повітря

Повітря направляється самотієм до теплообмінника, де відбувається стабілізація основних показників. Після відділення вологи температура повітря на виході з ресивера змінюється, саме тому перед подачею повітря до фільтрів, а потім і до технологічного процесу, здійснюється підігрів повітря до необхідної температури для культивування за допомогою термопари.

ДР 2.7 Очищення повітря в головному фільтрі

Перед головним фільтром встановлений пробовідбірник для вимірювання рівня відносної вологи повітря за допомогою психрометра. Контроль даного показника необхідний і є критичним, бо головні, а особливо індивідуальні, фільтри не витримують рівня вологи вище 60% і можуть призвести до псування та розриву фільтрувальної тканини.

Після виходу з фільтру встановлений анемометр крилатий для виміру рівня витрати повітря. За допомогою нього можна контролювати рівень подачі повітря в систему і визначати час, через який необхідно здійснювати заміну фільтрів в системі.

В електростатичних фільтрах Trion передбачено кілька ступенів фільтрації. Передфільтрація вловлює великі фрагменти забруднень з повітря. Далі в роботу включається стимер, суть його роботи в тому, щоб вловити і затримати дрібні фракції забруднень на різнозаряджених спеціальних пластинах з алюмінію. Даний підхід дозволяє забезпечити ефективність

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						52
Зм.	Арк.	№ док.м.	Підпис	Дата		

очищення повітряних мас до 95%, адже розмір вловлюваних фрагментів досягає 0,1 мікрона.

ДР 2.8 Стерилізація повітря в індивідуальному фільтрі

На останньому етапі повітря направляється до індивідуального фільтру. До та після фільтру встановлені пробовідбірники для мікробіологічного та технологічного контролю. До технологічного контролю відноситься контроль показників рівня відносної вологи повітря за допомогою психрометра, температури за допомогою термопари, рівень витрати повітря за допомогою анеометра крилатого. За допомогою вище перерахованих приладів здійснюється остаточний контроль показників повітря перед подачею його до виробництва.

Мікробіологічний контроль здійснюється на вході та виході повітря з індивідуального фільтру. Так як після цієї стадії повітря направляється до технологічного процесу, ця стадія є вирішальною для чистоти повітря, а отже, критичною стадією виробництва. За допомогою імпактора «Флора-100» здійснюють відбір проб, подальше осадження мікроорганізмів на чашку Петрі, підрощування мікроорганізмів та визначення їх кількісного вмісту в м³ повітря. Дані порівнюють і визначають відповідність ефективності фільтра заявлених.

ФТО-60 – індивідуальний фільтр ферментеру для стерилізації (тонкої очистки) аераційного (технологічного) повітря. Продуктивність 60 м³/ год. Площа поверхні фільтрування 1м². Ефективність очистки після індивідуального фільтру досягає 99,9999%.

ДР 3. Підготовка ємностей

Перед мийкою ємностей їх переглядають на наявність дефектів. Каністри та пляшки миють з миючими засобами при температурі 60°C. Ополіскують спочатку теплою, потім холодною водою. Висушують при температурі 50 °C.

ДР 4. Підготовка лабораторного посуду

ДР 4.1. Миття лабораторного посуду

Миття посуду проводять вручну, використовуючи миючі засоби при температурі 40-60°C.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						53
Зм.	Арк.	№ док.ум.	Підпис	Дата		

ДР 4.2. Ополіскування лабораторного посуду

Ополіскування проводять водою очищеною при температурі 30-40°C.

ДР 4.3. Сушіння лабораторного посуду

Для сушіння використовують сушильні шафи, температура 60°C.

ДР 4.4. Стерилізація лабораторного посуду

Стерилізацію проводять в автоклаві, температура 120°C, 30-40 хвилин.

ДР 5. Приготування поживного середовища

Склад поживного середовища для промислового культивування продуцента: меляса – 40 г/л; NaNO_3 – 2 г/л; KH_2PO_4 – 2,5 г/л, пептон - 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л, вода – 1 л.

ДР 5.1 Зважування та внесення меляси

За допомогою дозатора вносять необхідну кількість меляси до ферментера. Концентрація меляси – 40 г/л.

ДР 5.2. Зважування та внесення пептону

За допомогою дозатора вносять необхідну кількість пептону. Концентрація – 10 г/л.

ДР 5.3. Гомогенізація та внесення додаткових компонентів

На цій стадії відбувається інтенсивне перемішування компонентів поживного середовища. До реактора, при постійному перемішуванні, вносять додатково нітрат натрію (2 г/л), двозаміщений фосфат калію (2,5 г/л) та екстракт хлібопекарських дріжджів (5 г/л). Реактор представляє собою апарат з пароводяною сорочкою, для збільшення поверхні теплообміну, турбінною мішалкою та нижнім спуском продукту.

У реактор, при постійному перемішуванні, додають необхідний об'єм води. Для перевірки рівня перемішування необхідно відібрати кілька проб з різних точок апарату і перевірити однорідність концентрації. При їх співпадінні переходять до наступної операції.

*ТП 6. Підготовка посівного матеріалу *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* штами УКМ В-111 та УКМ В-306*

ТП 6.1.Відновлення музейної культури

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						54
Зм.	Арк.	№ докum.	Підпис	Дата		

Музейною культурою засівають пробірку зі свіжоприготованим поживним середовищем (скошений агар). T=24 год, t=28°C.

Контроль технологічний забезпечується за допомогою термометра, що встановлений у термостаті, контроль мікробіологічний здійснюється шляхом прямого висіву на МПА у чашках Петрі.

ТП 6.2. Вирощування на чашках Петрі

Культуру з пробірки пересівають на чашки Петрі з середовищем Кінг В. T=24 год, t=28°C. Контроль технологічний забезпечується за допомогою термометра, що встановлений у термостаті, контроль мікробіологічний здійснюється шляхом прямого висіву на МПА у чашках Петрі.

ТП 6.3. Вирощування у колбі

Культуру з чашок Петрі пересівають в колбу Ерленмейера (750 мл) з 100 мл поживного середовища для культивування. T=24 год, t=28°C, n=120-240 об/хв. Оптична щільність культуральної рідини в колбах після завершення культивування 1×10^8 КУО / см³.

Контроль технологічний забезпечується за допомогою термометра, що встановлений у термостаті, контроль мікробіологічний здійснюється шляхом прямого висіву на МПА у чашках Петрі.

ТП 6.4. Вирощування посівного матеріалу у посівному ферментері

Посівний матеріал переносять з колби в посівний ферментер зі стерильним охолодженим середовищем Кінга, об'єм якого дозується за допомогою об'ємно – вагового дозатора. Дозатор об'ємно-ваговий, призначений для автоматичного дозування сипучих та рідких матеріалів в технологічних лініях. Кількість дозуючих компонентів до 4 шт. Посівний ферментер об'ємом 1 м³ з нижнім зливом, еліптичними кришкою та днищем, з суцільною сорочкою, коефіцієнт заповнення 0,7 від номінального об'єму. Перемішування комбіноване – механічною турбінною мішалкою та повітрям через барботер, потужність електродвигуна з редуктором 20кВт, частота обертання мішалки 150 об/хв. Пароводяна суцільна сорочка. Матеріал – неіржавіюча сталь. T=24 год, t=28°C.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

Через барботер подається стерильне повітря, яке проходить через індивідуальний фільтр стерилізації (тонкої очистки) повітря. Продуктивність 60 м³/год, швидкість руху повітря – 0,05 м/с, площа поверхні фільтрування 1,0 м², гідравлічний опір потоку повітря 600 Па, коефіцієнт проскоку – 0,001. Фільтруючий матеріал гофровані елементи з тканини Петрянова – ФПП-1,2-1,5. Матеріал – неірж. сталь. На місцевому трубопроводі встановлено витратомір для контролю витрат повітря. Фільтр встановлено для очистки відпрацьованого повітря, яке подається до магістрального трубопроводу.

Після закінчення процесу посівний матеріал подається до виробничого ферментеру за допомогою перистальтичного насосу [43, 44].

Дана стадія відноситься до критичних точок виробництва, тому параметри можуть бути критичними і знаходяться в діапазоні: $t=28\pm1^{\circ}\text{C}$, рН=6,8-7. Під час даної стадії виконується мікробіологічний та технологічний контроль, який забезпечується контрольно-вимірювальними приладами. Для перевірки мікробіологічної чистоти та відповідності нормам біохімічних властивостей продуцента було встановлено пробовідбірник. Морфологічні ознаки мікроорганізмів та відсутність контамінантів визначають методом прямого посіву на поживне середовище МПА в чашці Петрі. За необхідності використовують метод Коха (розведення в 10, 100, 1000 і т.д. разів). Чашки Петрі поміщають у термостат на 28°C на 24 години. Візуально перевіряють відсутність сторонньої мікрофлори та відповідність колоній продуцента наведеним вимогам. Також пробовідбірник встановлено на місцевому трубопроводі після фільтра тонкої очистки для перевірки ефективності стерилізації повітря, що подається через барботер.

ТП 7. Виробниче культивування

ТП 7.1. Перевірка на герметичність виробничого ферментера

Всі вентилі перевіряють гідравлічним пресуванням при тиску 0,3 МПа. Герметичність з'єднань перевіряють при надмірному тиску пари 0,15- 0,2 МПа. Т=0,5-1 год. Контроль технологічний.

ТП 7.2. Заповнення ферментера поживним середовищем

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ док.	Підпис	Дата		

Склад поживного середовища для промислового культивування продуцента: меляса – 40 г/л; NaNO_3 – 2 г/л; KH_2PO_4 – 2,5 г/л, пептон - 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л, вода – до 1 л [21].

Стерильне поживне середовище завантажується через штуцер в кришці ферментера. Об'єм ПС дозується за допомогою об'ємно – вагового дозатора. Дозатор об'ємно-ваговий, призначений для автоматичного дозування сипучих та рідких матеріалів в технологічних лініях. Поживне середовище доводять слабкими розчинами кислоти або лугу до значення рН 6,8-7,0. $K_3=0,7$, $T=2$ год, $t=70^\circ\text{C}$.

ТП 7.3. Стерилізація поживного середовища

Стерилізація періодична, проводяться безпосередньо в ферментері при температурі 135°C , враховуючи витримку при цій температурі протягом години та охолодження за допомогою подачі води в сорочку реактора до температури $35-38^\circ\text{C}$.

ТП 7.4. Внесення у ферментер посівного матеріалу

Посівний матеріал подається у виробничий ферментер із посівного ферментера за допомогою перистальтичного насоса. $T=0,5$ год, коефіцієнт заповнення – 10 % від об'єму поживного середовища.

ТП 7.5. Виробниче культивування

Виробниче культивування відбувається у виробничому ферментері Biostat В plus (Sartorius Stedim Biotech, Німеччина), об'єм якого становить 8 м^3 , внутрішній діаметр – 1600 мм [45], що оснащений механічним перемішуючим пристроєм і барботером, який забезпечує додаткову аерацію середовища, для гомогенізації культуральної рідини та інтенсифікації росту мікроорганізмів. Виробничий біосинтез проводиться методом рідкофазного глибинного культивування.

Культивування на всіх стадіях ведеться при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$, що контролюється за допомогою термометра. Посівний матеріал піддається мікробіологічному і біохімічному контролю. Посівний матеріал вважається активним, якщо він забезпечує нормальну тривалість культивування на виробничому середовищі і досягнення максимального накопичення продукту за

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						57
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

цей термін. Активна культура через 16-24 години знаходиться у фазі стаціонарного росту, спостерігається накопичення до $15 \pm 1,5$ г/л біомаси. Максимальний вміст біомаси і високий титр клітин спостерігається після 21 години культивування.

Через барботер подається стерильне повітря, яке проходить через індивідуальний фільтр стерилізації (тонкої очистки) повітря. Питома витрата повітря в хвилину 1,0-1,5 л / л середовища. Продуктивність індивідуального фільтра 60 м³/год, швидкість руху повітря – 0,05 м/с, площа поверхні фільтрування 1,0 м², гідравлічний опір потоку повітря 600 Па, коефіцієнт проскоку – 0,001. Фільтруючий матеріал гофровані елементи з тканини Петрянова – ФПП-1,2-1,5. Матеріал – неіржавіюча сталь. На місцевому трубопроводі встановлено витратомір для контролю витрат повітря [43].

Поява активних метаболітів продуцентів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 в культуральній рідині відзначається в період 6 - 8 годин від початку культивування. До 16 години після початку культивування кількість активних метаболітів досягає максимального значення. Припинення зростання біомаси відбувається до 16-20 години, імовірно під впливом накопичення вторинних метаболітів, що виявляють інгібуючі властивості.

Культивування проводять при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Температурний режим підтримується за рахунок подачі теплоагента, що подається у сорочку ферментера. В процесі біосинтезу постійно відбувається вимірювання і вирівнювання рН 6,7-7 культуральної рідини, за рахунок додавання гідроксиду натрію чи соляної кислоти. Для визначення показника рН передбачено монтаж приймального пристрою для вимірювання фізико-хімічного складу та якості культуральної рідини. Тиск повітря в ферментері 0,04-0,05 МПа, $n=180$ об/хв.

Закінчення процесу культивування супроводжується зниженням оптичної густини, підвищенням значення рН культуральної рідини, зменшенням споживання O₂, а також утворенням у культуральній рідині конгломератів у вигляді дрібних видимих оком крупинок.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докцм.	Підпис	Дата		58

Протягом всього процесу біосинтезу проводиться технічний, мікробіологічний і хімічний контроль для запобігання порушень умов культивування.

Для контролю температури в кожусі апарату передбачено монтаж термометру, який представляє собою пристрій для вимірювання температури, встановлений за місцем. Для контролю тиску в апараті передбачено монтаж приладу для вимірювання тиску. Для перевірки мікробіологічної чистоти та відповідності нормам біохімічних властивостей продуцента було встановлено пробовідбірник.

Морфологічні ознаки мікроорганізмів та відсутність контамінантів визначають методом прямого посіву на поживне середовище МПА в чашці Петрі. За необхідності використовують метод Коха (розведення в 10, 100, 1000 і т.д. разів). Чашки Петрі поміщають у термостат на 37°C на 24 години. Візуально перевіряють відсутність сторонньої мікрофлори та відповідність колоній продуцента наведеним вимогам.

Також пробовідбірник встановлено на місцевому трубопроводі після фільтра тонкої очистки для перевірки ефективності стерилізації повітря, що подається через барботер для гомогенізації культуральної рідини. Відсутність контамінації перевіряють методом прямого посіву на середовище МПА в чашках Петрі, які потім поміщають у термостат на 37°C на 24 години. Візуально перевіряють відсутність мікрофлори [44].

Після досягнення стаціонарної фази росту (16-20 год) визначають титр активних клітин, який повинен становити не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО / мл. Якщо показник відповідає вимозі, то культуральна рідина виводиться з нижньої частини ферментера і надходить в ємність для її збору за допомогою насоса. Насос відцентровий горизонтальний консольний одноступеневий з робочим колесом закритого типу. До насоса під'єднаний тахометр та манометр.

Всі відпрацьовані реагенти збираються в збірник конденсату, після чого зливається в трубопровід для стічних вод. Через іншу трубу відводиться відпрацьоване повітря та газу, що виділяються в процесі культивування.

ТП 8. Розлив у пляшки та каністри

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

Культуральна рідина *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 з титром не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ разом із середовищем культивування зі збірника надходить на лінію упаковки в ємності.

Розлив у пляшки та каністри відбувається автоматизовано в асептичних умовах. У пляшки розливають по 1л, в каністри по 10л. Потім ємності закривають пластмасовими кришками.

ТП 9. Контроль якості готової продукції

Під час контролю якості відбувається встановлення відповідності продукції по кількісним та якісним характеристикам, виявлення дефектної продукції на ранніх етапах та запобігання випуску недоброякісної продукції. Головна задача контролю якості – не допустити появу браку та дефектів до встановлених вимог.

ПМВ 10. Пакування та маркування ємностей

На ємності з препаратом наклеюють етикетки, на яких зазначають назву препарату, дату виготовлення, термін зберігання, умови зберігання та інструкцію до використання.

Упаковують по 9 пляшок у картонні коробки. Для каністр пакування у картонні коробки не передбачене.

Коробки відправляють на склад. Упакований препарат зберігається в сухому темному приміщенні при температурі 4 ± 2 ° С.

ЗВ 11. Знешкодження відходів

Знешкодження відходів — зменшення чи усунення небезпечності відходів шляхом механічного, фізико-хімічного чи біологічного оброблення.

Відпрацьоване повітря очищується в основному за допомогою скрубєрів Вентури, які є достатньо ефективними та економічно вигідними. Принцип роботи скрубєра заснований на аеродинамічній силі труби Вентури. Вона являє собою трубу, схожу на пісочний годинник. Труба включає в себе: дифузор, горловину, конфузор і штуцера підведення зрошувальної рідини з форсунками. Принцип роботи доволі простий. Через фланець вхідного газу в трубу Вентури потрапляє забруднений газ. У трубі газ розганяється до великих швидкостей відповідно до закону Бернуллі. Зверху, через форсунки надходить вода. За

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

рахунок утворення турбулентності, вода в трубі дробиться на більш дрібні краплі. За рахунок дроблення збільшується площа зіткнення води з газом, тобто площа фільтрації. Таким чином відбувається уловлювання забруднень водою або спеціальною рідиною. Потім вода з газом проходить по газоходу в відцентровий вловлювач крапель. У ньому вода з газом опускається вниз, а чисте повітря за допомогою вентилятора виходить назовні [33].

ПВ 12. Переробка відходів

На даній стадії здійснюються технологічні операції, що пов'язані зі зміною фізичних, хімічних чи біологічних властивостей відходів, з метою підготовки їх до екологічно безпечного зберігання, перевезення, утилізації чи видалення. Ці процеси забезпечують екологічну чистоту виробництва [32].

Для реагентів, які використовуються у технологічному процесі проводять регенерацію і знову використовують у виробництві.

Що стосується відходів після культивування, то залишки розводять водою та автоклавують при температурі 120°C, а далі подають до інших виробничих відходів.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс стадій виробничого культивування, розливу препарату гаупсин в пляшки та каністри, пакування та маркування ємностей наведено у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс стадій

Використано				Отримано				
Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість			Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість			
	кг	шт	л		кг	шт	л	
Стадія ТП 7. Виробниче культивування								
Вода питна			4700	Культуральна рідина <i>Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofeciens</i> УКМ В-111 і УКМ В-306			5570	
Меляса	224							
40% натрій гідроксид			6,8					
Екстракт дріжджів	28							
				ДП 6118.00.000 ПЗ				Арк.
								61
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис					Дата

Стерильне аераційне повітря			5000	Відпрацьоване повітря			5000
Пептон	56			Втрати			30
NaNO ₃	11,2						
Посівний матеріал			560				
KH ₂ PO ₄	14						
Всього	10600			Всього	10600		

Стадія ТП 8. Розлив у пляшки та каністри

Культуральна рідина <i>Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofeciens</i> УКМ В-111 і УКМ В-306			5570	Препарат у пляшках та каністрах			5400
				Втрати при розливі			170
Пляшки (1 л)		3600		Закриті пляшки з препаратом гаупсин		3600	
Каністри (10 л)		180		Закриті каністри з препаратом гаупсин		180	
Кришки для пляшок		3600		Кришки на пляшках		3600	
Кришки для каністр		180		Кришки на каністрах		180	
Всього:	13130			Всього:	13130		

Стадія ПМВ 10. Пакування та маркування ємностей

Пляшки з препаратом		3600		Промарковані пляшки		3600	
Етикетки малі		3600		Етикетки на пляшках		3600	
Картонні коробки		400		Коробки з пляшками (по 9 шт)		400	
Каністри з препаратом		180		Промарковані каністри		180	
Етикетки великі		180		Етикетки на каністрах		180	
Всього:	7960			Всього:	7960		

4.5. Контроль виробництва

Для забезпечення відповідності готової продукції вимогам НТД на підприємстві забезпечується постадійний контроль процесу.

У таблиці 4.3 наведено перелік контрольних точок (найважливіших місць та етапів виробництва), що забезпечують виконання технологічного режиму. Наведені контрольні точки відповідають виду контролю, що зазначається на технологічній схемі контрольно-вимірювальним приладом, вказаним на апаратурній схемі.

У процесі виробництва препарату гаупсин контролюють відповідність основної, допоміжної сировини та матеріалів вимогам НТД, санітарний стан цехів та робочих місць, виконання регламентованих технологічних операцій і виконання технологічних режимів роботи.

Таблиця 4.3. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.1. Підготовка води технологічної та води питної К _т 1.1.1	Органолептичні показники води питної	Фотоколориметрія	Кожну операцію	Відповідно до вимог
К _м 1.1.2	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Колі-індекс не більше 3
ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів К _т 1.2.1	Миючі властивості	Візуально, ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Відповідно до вимог
К _х 1.2.2	Концентрація етилового спирту	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	76%

ДР 1.3. Підготовка одягу К _Т 1.3.1	Чистота та цілісність одягу	Візуально	Кожну операцію	Відповідно до вимог
ДР 1.5. Підготовка виробничих приміщень К _Т 1.5.1	Чистота приміщень	Візуально	Кожну операцію	Відповідно до вимог
ДР 1.6. Підготовка обладнання та комунікацій К _Т 1.6.1	Температура, тривалість, тиск	Регулятор температури, годинник, манометр	Кожну операцію	80-135° С, 0,5-1 год, 0,5-1 МПа
К _М 1.6.2	Мікробіологі чна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Не більше 3,5·10 ⁶ КУО
ДР 2. Підготовка стерильного повітря К _Т 2.1	Вміст часток	Пробовідбірник	Кожну операцію	Не більше 3,5 млн/м ³
К _Т 2.2	Вологість	Психрометр	Кожну добу	75%
К _Т 2.3	Температура	Термометр	Кожну операцію	30°С
К _М 2.4	Мікробіологі чна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінанті в
ДР 3. Підготовка ємностей К _Т 3.1	Пляшки та каністри	Візуально	Кожну операцію	Відсутність дефектів
К _Т 3.2	Температура, тривалість мийки	Термометр, годинник	Кожну операцію	60°С, 1 год
ДР 4. Підготовка лабораторного посуду К _Т 4.1	Лабораторни й посуд	Візуально	Кожну операцію	Відсутність дефектів

К _Т 4.2	Температура, тривалість стерилізації	Термометр, годинник	Кожну операцію	120°C, 30-40 хв
ДР 5. Приготування поживного середовища К _х 5.1	Склад середовища	Ваги, мірний посуд	Кожну операцію	Відповідно до НТД
К _М 5.2	Мікробіологі чна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність контамінанті в
К _Т 5.3	Рівень рН	рН-метр	Кожну операцію	6,8-7
К _Т 5.4	Режим стерилізації, температура, тиск, тривалість	Термометр, манометр, годинник	Кожну операцію	135 °С, тиск умовний 0,2МПа, 45 хв
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу <i>Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofeciens</i> УКМ В-111 та УКМ В-306 К _М 6.1	Мікробіологі чна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
К _Т 6.2	Тривалість, температура	Годинник, термометр	Кожну операцію	24 год, 28°C
К _Т 6.3	Витрати повітря	Витратомір	Під час процесу	pO ₂ =40±15%
ТП 7. Виробниче культивування К _М 7.1	Мікробіологі чна чистота, Морфологія клітин	Висів на чашки Петрі, мікроскопіюван ня	Під час процесу	Відсутність сторонньої мікрофлори
К _Т 7.2	рН	рН-метр	Під час процесу	6,8-7

K _Т 7.3	Температура	Термометр	Під час процесу	28±1°C
K _Т 7.4	Тривалість	Годинник	Кожну операцію	20-24 год
K _Т 7.5	Тиск	Манометр	Під час процесу	0,04-0,05 МПа
K _Т 7.6	Витрати повітря	Витратомір	Кожну операцію	1-1,5 л/л ПС
K _М 7.7	Оптична щільність	Спектрофотометр	Після досягнення стаціонарної фази росту	1·10 ¹⁰ КУО / мл
ТП 8. Розлив у пляшки та каністри K _Т 8.1	Наповнення	Візуально	Кожну операцію	K _з =0,9
ТП 9. Контроль якості готової продукції. K _М 9.1	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Контамінація не більше 1 %
K _Т 9.2	Колір та зовнішній вигляд	Візуально	Кожну операцію	Суспензія від світло-жовтого до бурого кольору
K _Т 9.3	pH	pH-метр	Кожну операцію	6,3-7,3
ПМВ 10. Пакування та маркування ємностей K _Т 10.1	Зовнішній вигляд, правильність маркування	Візуально	Кожну операцію	Відповідно до вимог

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

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

Для даного дипломного проекту було обрано розробку ферментера для стадії культивування виробництва препарату гаупсин, продуцент *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* штами УКМ В-111 і УКМ В-306.

Відомо декілька класифікацій ферментерів, що враховують різні конструктивні, експлуатаційні та технологічні особливості апаратів. Найвідомішою класифікацією біореакторів є класифікація за способом підведення енергії на перемішування:

- ферментери з підведенням енергії з газовою фазою (барботажні, аерліфтні, тарільчасті, пульсаційні),
- ферментери з підведенням енергії з рідкою фазою (ферментери з самовсмоктувальними мішалками, з променевим аератором, ежекційні, струменеві),
- ферментери з підведенням енергії з газовою та рідкою фазою (ферментери з перемішувальними пристроями і барботерами).

При виборі конструкції ферментера треба враховувати наступні аспекти:

- гідродинамічна обстановка в ферментері повинна забезпечити одночасну реалізацію масопереносу в двох- (поживне середовище — клітини біологічного агента) і трьохфазних (газ — поживне середовище — клітини біологічного агента) системах;
- необхідність підтримання асептики в процесі культивування;
- технологічне рішення стадії біосинтезу – періодичний процес, напівперіодичний або безперервний;
- необхідні об'єми ферментера для забезпечення цільової

					ДП 6118.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Скляр Ю.О.				РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш	Архув
Консульт.							67	103
Керівник	Клочко В.В.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затверд.								

продуктивності процесу;

- режим аерації та джерело кисню;
- необхідність підтримання температурного режиму культивування на встановленому рівні, що здійснюється за допомогою сорочки та допоміжних теплообмінних елементів (змійовики);
- властивості середовища (густина, в'язкість, вміст твердих речовин);
- економічність виготовлення апарату та простота у експлуатації.

Конструкцію реактора визначає ряд факторів: агрегатний стан реагуючих речовин, продуктів і консистенція середовища, інтенсивність перемішування, аерація, температура процесу культивування і тиск, тепловий ефект та інтенсивність теплообміну, хімічні властивості компонентів, задана продуктивність апарату, безперервність або періодичність процесу, зручність монтажу і ремонту апарата, простоту його виготовлення і т. д. [48].

За обраною технологією виробниче культивування проводять у ферментері BIORUS-SJA циліндричної форми зі сферичними днищем і кришкою, робочий об'єм якого становить 8 м^3 , внутрішній діаметр – 1600 мм [45]. Біореактор оснащений механічним перемішуючим пристроєм і барботером, який забезпечує додаткову аерацію середовища, для гомогенізації культуральної рідини та інтенсифікації росту мікроорганізмів. Апарат забезпечений люками для обслуговування і ремонту, оглядовим вікном, освітлювачем, усіма необхідними датчиками контролю параметрів культивування, системою піногасіння, відбору проб, регулятором швидкості обертання мішалки.

Культивування штамів *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 та В-306 - екзотермічний процес, питоме тепловиділення невелике. Щоб підтримувати задану температуру культивування ($28 \pm 1^\circ\text{C}$), культуральну рідину підігрівають через рубашку ферментера. Під час бродіння в неї подають гарячу воду, яка не викликає сильного нагріву теплообмінної поверхні. Ферментер забезпечений барботером для подачі повітря для аерації.

Призначення барботерів - створення міжфазної поверхні шляхом диспергування газу через дрібні отвори. Існує два види барботерів: напірні і

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		68

безнапірні. До напірних належать трубчасті конструкції із пористих матеріалів, до безнапірних - жолобчасті, тарілки, решітки та дифузори [49].

У промислових ферментерах застосовуються в основному трубчасті барботери, що являють собою перфоровані труби різної геометричної форми: променевої, прямокутної, кільцевої (рис. 5.1). Діаметр отворів зазвичай від 1 до 7 мм.

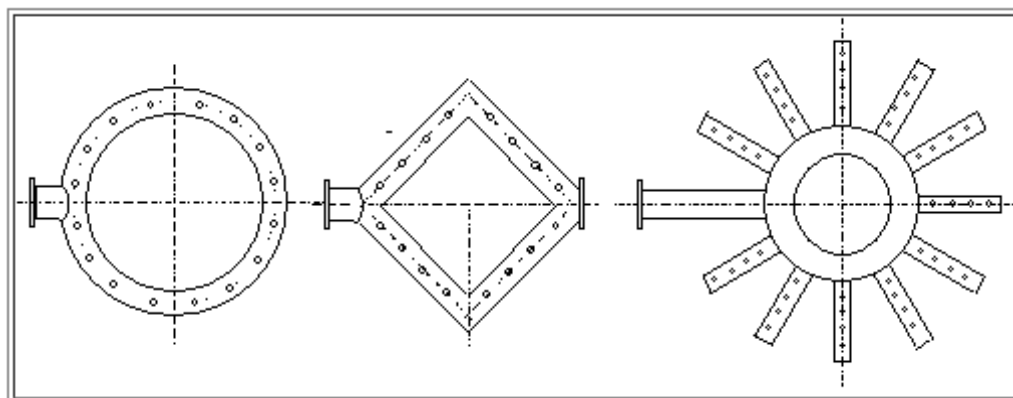


Рисунок 5.1. Основні типи барботерів: кільцевий, прямокутний, променевий.

Для продування повітря через культуральну рідину апарат обладнується повітророзподільною системою, яка складається з однієї або декількох опущених всередину апарату вертикальних труб для підведення повітря, званих стояками. Стояк в нижній частині апарату з'єднується з барботером.

Повітророзподільні трубки барботера мають на своїй поверхні ряд дрібних отворів для проходження повітря. Причому, чим менші бульбашки повітря розподіляються в культуральній рідині, тим ефективніше йде його використання. Тому при розрахунку барботерів прагнуть зменшити діаметр отворів. В основному, барботери складаються з тонкостінних (1-2 мм) металевих трубок діаметром 20-30 мм, на верхній поверхні яких є отвори діаметром 0,3-2 мм з кроком 5-7 мм із загальним числом отворів до 1000 на 1 м поперечної площі ферментера. При такій конструкції барботера на кожен метр стовпа рідини апарату необхідно мати тиск повітря в системі не менше 0,013 МПа [50].

При подачі повітря в апарат через барботер відбувається розпорошення потоку через отвори трубки барботера, в результаті чого відбувається утворення бульбашок повітря на виході з барботера, їх подальший відрив від

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

поверхні трубки і спливання в шарі культуральної рідини. При цьому в залежності від параметрів системи (щільність, в'язкість та ін.), а також витрати повітря в повітророзподільній системі, відбувається проходження повітря через шар рідини у вигляді окремих бульбашок або у вигляді суцільного потоку бульбашок - відповідно бульбашковий режим барботування та пінний.

Істотним недоліком барботажних ферментерів є нерівномірність концентрацій мікроорганізмів по висоті апарата. Тому в нижніх шарах ферментаційного середовища, де концентрація мікроорганізмів найменша, є надлишок розчиненого кисню, а у верхніх його нестача. Відсутність в апараті пристроїв рівномірного розподілу популяції мікроорганізмів по всьому об'єму середовища і пристроїв, які запобігають утворенню агломератів, обмежує застосування ферментерів з барботажною системою розподілення повітря [51]. Для компенсації цього недоліку в апарат встановлюється механічний перемішуючий пристрій.

Апарати з механічним перемішуванням – найпоширеніша конструкція в сучасній мікробіологічній промисловості. Механічне перемішування виконується за допомогою перемішуючого пристрою, основним елементом якого є мішалка – рухомий робочий орган, який безпосередньо діє на рідке поживне середовище. Мішалка складається із центрального вала й лопаток різної форми. В систему перемішування входять також відбивні перегородки – вузькі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок реактора. Ці перегородки запобігають виникненню виру навколо обертової мішалки, переводячи круговий рух рідини у вихровий, рівномірно розподілений по всьому об'єму [48].

Конструктивним елементом, безпосередньо призначеним для приведення рідини в рух, є мішалка. Як показує практика, більшість завдань перемішування може бути успішно вирішено шляхом використання обмеженого числа конструкцій мішалок. При цьому існують найбільш характерні області застосування й діапазони геометричних співвідношень окремих типів мішалок [52].

Перемішування рідини в реакторах може бути здійснено лопатевими, якірними, рамними, турбінними або трьохлопатевими мішалками. За швидкістю обертання мішалки умовно поділяють на тихохідні (якірні, та ін., у яких колова швидкість кінців лопатей зазвичай не перевищує 1 м/с) і швидкохідні (гвинтові, турбіни та інші, у яких вказана швидкість найчастіше не менше 10 м/с) [53].

Вибирають мішалку залежно від цільового призначення перемішуваної рідкої системи і фізико-механічних характеристик та властивостей її компонентів. В основному на вибір мішалки впливають об'єм системи, її в'язкість і густина, наявність дисперсної фази й концентрація останньої в системі. На рисунку 5.2 показані рекомендовані межі в'язкості рідин для найбільш розповсюджених типів мішалок. Для перемішування рідин з низькою і середньою в'язкістю використовують турбінні мішалки з прямими лопатками або пропелерні мішалки [52].

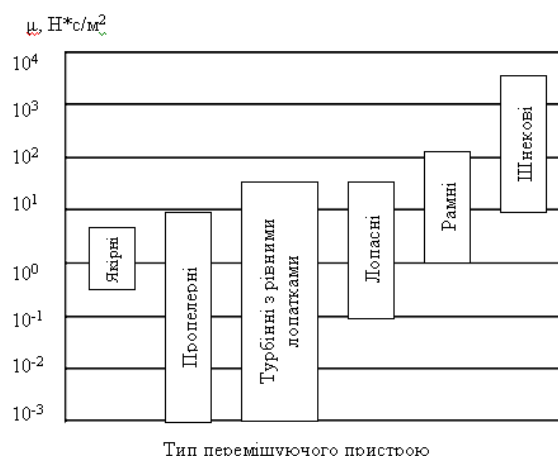


Рисунок 5.2. Рекомендовані межі в'язкості рідин для найбільш розповсюджених типів мішалок.

Для приготування поживного середовища, а саме для забезпечення якісного та ретельного перемішування компонентів поживного середовища, а також для забезпечення належних умов культивування ($n=180$ об/хв) було обрано реактор із механічним перемішувачем – відкритою турбінною мішалкою.

Турбінні мішалки використовують у всіх випадках, коли необхідно інтенсивне перемішування, особливо рідин, що значно розрізняються по

в'язкості, а також при диспергуванні газу в рідині. Також їх використовують при розчиненні твердих кристалічних часток, емульгуванні рідин з великою різницею густин. Найбільш простою й вискоефективною серед відкритих турбінних мішалок є мішалка з прямими лопатками, які розміщені радіально. Турбінні мішалки працюють при 100-350 об/хв та забезпечують інтенсивне перемішування в усьому об'ємі апарату [54].

Переваги турбінних мішалок: швидкість перемішування та розчинення, ефективне перемішування в'язких рідин, придатність для неперервних процесів.

Для приведення в рух (обертання) турбінної мішалки в реакторі слугують приводи, де в якості рухомої сили використовуються головним чином електроенергія. Існує багато різних конструкцій приводів, які використовують стандартні багато обертаючі електродвигуни та типові механічні редуктори, які встановлюються на кришці в апараті.

Матеріали, з яких виготовляють конструктивні елементи реакторів повинні забезпечувати міцність і стійкість цих елементів. Матеріали елементів апарату, поверхні яких контактують з робочим середовищем (мішалка, вал, барботер, корпус, днище, кришка) повинні бути хімічно інертними, нетоксичними до робочого середовища та корозійностійкими, а також витримувати обробку дезінфікуючими засобами та стерилізацію. Для виготовлення конструктивних елементів реакторів використовують вуглецеві сталі, леговані сталі. Для забезпечення герметичності апаратів з механічними перемішувальними пристроями використовують ущільнення, головним чином, торцеві. Торцеві ущільнення дозволяють попередити втрату робочого середовища з апарату та не допускають потрапляння повітря в апарат [55].

Тобто, оптимальною конструкцією для реактора є турбінна мішалка, що забезпечує ефективне перемішування при мінімальних затратах енергії. Найбільш поширені еліптичні відбортовані днища та кришки. На кришку апарату встановлюємо виносний індивідуальний привод. Для аерації культуральної рідини апарат забезпечений кільцевим барботером із повітророзподільною системою та трубкою для підведення повітря в барботер.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Реактор має рубашку, в яку подається вода для нагрівання середовища і підтримання у реакторі постійної температури ($28 \pm 1^\circ\text{C}$).

У нижній частині ферментеру встановлені трубопроводи - для зливу культуральної рідини і каналізаційний. Ферментер повинен бути герметичним та стерилізуватись для забезпечення асептичних умов [52].

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

5.2.1. Конструктивний розрахунок ферментера

Розрахунок проводиться за методикою Ружинської Л.І. «Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв» [55].

Номінальний об'єм апарата:

$$V_n = \frac{V_p}{K_3} = \frac{5,6}{0,7} = 8 \text{ м}^3$$

За ГОСТ 20680-75 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Типы и основные параметры» було обрано номінальний об'єм 8 м^3 .

Обраний апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою.

$D_{\text{вн}} = 1600 \text{ мм}$ – внутрішній діаметр;

Висота корпусу $H = 4150 \text{ мм}$;

Площа внутрішньої поверхні за ГОСТ 9931-85 «Корпусы цилиндрические стальных сварных сосудов и аппаратов. Типы, основные параметры и размеры» $F = 22,4 \text{ м}^2$.

Розрахуємо днище апарату. Висоту еліптичної частини днища реактору визначимо за формулою:

$$h_{\text{ел.дн}} = D \cdot 0,25$$

$$h_{\text{ел.дн}} = 1600 \cdot 0,25 = 400 \text{ мм}$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов. Основные размеры» знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату:

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ док.	Підпис	Дата		

Висота основи еліптичного днища $h_{\text{осн}} = 60$ мм;

Товщина стінки еліптичного днища $s = 20$ мм;

Внутрішня поверхня еліптичного днища $F = 3,08$ м²;

Об'єм еліптичного днища $V_{\text{дн}} = 0,6543$ м³;

Маса еліптичного днища $m = 497,0$ кг.

Повна висота днища: $h_{\text{дн}} = h_{\text{осн}} + h_{\text{ел.дн}} = 60 + 400 = 460$ мм.

Об'єм циліндру конструкції:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{р}} - V_{\text{дн}}$$

$$V_{\text{ц}} = 5,6 - 0,6543 = 4,9457 \text{ м}^3$$

Висота циліндра:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{0,785 \cdot D^2}$$

$$H_{\text{ц}} = \frac{4,9457}{0,785 \cdot 1,6^2} = 2,46 \text{ м}$$

Висота рівня рідини в реакторі:

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D^2} + h_1 + h_{\text{в}};$$

$$H_{\text{р}} = \frac{4 \cdot 4,95}{3,14 \cdot 1,6^2} + 0,06 + 0,46 = 3 \text{ м}$$

Для даного апарату стандартна рубашка має площу теплообміну $F = 13,0$ м². Її висота складає, згідно ГОСТ 26-01-984-74 «Рубашки неразъемные с эллипсоидным днищем стальных сварных сосудов и аппаратов. Основные параметры и размеры»: $H_{\text{руб}} = 2,45$ м.

5.2.2. Розрахунок перемішуючого пристрою

Розрахунок проводиться за методикою Ружинська Л.І. «Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв» [55].

Для перемішування середовища обрано відкриту турбінну мішалку.

Діаметр даної мішалки визначаємо за формулою:

$$\frac{D}{d_m} = 3 \div 4$$

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

$$d_m = \frac{D}{3} \div \frac{D}{4} = \frac{1600}{3} \div \frac{1600}{4} = (533 \div 400) \text{ (мм)}$$

Вибираємо стандартну відкриту турбінну шестилопатеvu мішалку. Стандартне значення діаметра мішалки визначаємо за ГОСТ 20680-75 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Типы и основные параметры»:

$$d_m = 500 \text{ мм}$$

Розрахуємо геометричні розміри мішалки. Висота перемішуючого пристрою:

$$h_m = d_m \cdot 0,2 = 500 \cdot 0,2 = 100 \text{ (мм)}$$

Відстань до днища апарату:

$$h = d_m \cdot 0,4 \div d_m \cdot 1 = 500 \cdot 0,4 \div 500 \cdot 1 = (200 \div 500) \text{ (мм)}$$

Приймаємо $h = 500 \text{ мм}$.

Ширина лопасті:

$$l = d_m \cdot 0,25 = 500 \cdot 0,25 = 125 \text{ (мм)}$$

Ширина перегородки:

$$b = d_m \cdot 0,1 = 500 \cdot 0,1 = 50 \text{ (мм)}$$

Діаметр вала мішалки:

$$d_g = d_m \cdot C,$$

де C – коефіцієнт, що вибирається в залежності від конструкції мішалки (для турбінних мішалок $C = 0,117$).

$$d_g = 500 \cdot 0,117 = 58,5 \text{ (мм)}$$

Обираємо найближчий діаметр з АТК 24.201.17-90 «Мешалки типы, параметры, конструкция, основные размеры и технические требования»: $d_b = 60 \text{ мм}$.

Визначаємо критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d_m^2}{\mu} = \frac{1050 \cdot 3 \cdot 0,5^2}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 5,08 \cdot 10^5$$

В'язкість середовища: $\mu_c = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

Густина середовища: $\rho_c = 1050 \text{ кг/м}^3$

Для турбінної мішалки за графіком знаходимо $K_N = 6$.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ док.	Підпис	Дата		

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N_p = K_N \rho n^3 d_M^5 = 6 \cdot 1050 \cdot 3^3 \cdot 0,5^5 = 5315,6 \text{ Вт}$$

Для ущільнення валу мішалки обираємо торцьове ущільнення.

Потужність, що витрачається на тертя в ущільненні:

$$N_{ущ} = 6020 d_g^{1,3} = 6020 \cdot 0,0585^{1,3} = 150,27 \text{ Вт}$$

В ферментері встановлені гільзи для термопар: $K_1 = 1,1$

Коефіцієнт рівня рідини:

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{3}{1,6}} = 1,37$$

Коефіцієнт, що враховує наявність перегородок: $K_n = 1$.

$\eta = 0,85 \div 0,9$ — коефіцієнт корисної дії привода.

Приймаємо $\eta = 0,85$.

Потужність електродвигуна:

$$N_{ел} = \frac{K_n K_H \sum K_i N_p + N_{ущ}}{\eta} = \frac{1 \cdot 1,37 \cdot 1,1 \cdot 5315,6 + 150,27}{0,85} = 9600 \text{ Вт.}$$

Обираємо двигун з номінальною потужністю $N = 11$ кВт. Маркування АИР 132М4.

5.2.3. Розрахунок воронки

Параметр висоти завантаження апарата реактора:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \cdot \frac{3}{1,6} + 1 = 16.$$

Параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M Re^{0,25}} = \frac{16}{8,4 \cdot 1 \cdot (5,08 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,071, \quad \text{де}$$

$z_M = 1$ — кількість мішалок на одному валу;

$\xi_M = 8,4$ — коефіцієнт гідравлічного опору мішалки.

За графіком знаходимо $\psi_1 = 1,3$ та $B = 5$.

Глибина воронки:

$$h_g = \frac{B n^2 d_M^2}{2} = \frac{5 \cdot 3^2 \cdot 0,5^2}{2} = 5,625 \text{ м}$$

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{гр} = H_p - 0,5d = 3 - 0,5 \cdot 0,5 = 2,75 \text{ м}$$

$$h_г = 5,625 > h_{гр} = 2,75$$

Так як розрахована глибина воронки переважає гранично допустиму глибину воронки, в апараті потрібно встановлювати відбиваючі перегородки.

5.2.4. Розрахунок барботера

Розрахунок проводиться за методикою Соколов В.Н. «Машины и аппараты химических производств» [56].

Апарат об'ємом 8 м^3 , діаметром 1600 мм, висота рівня рідини 3 м, діаметр мішалки 500 мм.

Прийmemo приведену швидкість кисню в апараті $\omega_p = 0,04 \text{ м/с}$, отримаємо його витрату:

$$V_p = (3,14/8) \cdot 1,6^2 \cdot 0,04 = 0,04 \text{ м}^3/\text{с}$$

Діаметр труби барботера при швидкості газу в ній $\omega_6 = 25 \text{ м/с}$ буде:

$$d_6 = \sqrt{\frac{4V_p}{\pi \omega_6}} = \sqrt{\frac{0,04 \cdot 4}{3,14 \cdot 25}} = \sqrt{\frac{0,16}{78,5}} = 0,045 \text{ м}$$

Середній діаметр барботеру:

$$D_{cp} = 1,75 d_m = 1,75 \cdot 500 = 875 \text{ мм}$$

Густина повітря при температурі $t = 35^\circ \text{C}$ і абсолютному тиску

$$p = 0,1 + p_{наб} + H_{жс} \rho_{жс} g \cdot 10^{-6} = 0,1 + 0,05 + 1 \cdot 1000 \cdot 9,81 \cdot 10^{-6} = 0,161 \text{ МПа}$$

$$\text{буде } p_r = \rho_r T / (\rho T) = 1,29 \cdot (0,161 \cdot 273) / (0,1 \cdot 308) = 1,84 \text{ кг/м}^3$$

Швидкість газу в отворах барботеру

$$\omega_0 = 3,4 \sqrt{\frac{0,045 \cdot 1000}{1,84}} = 4,94 \text{ м/с}$$

Прийmemo діаметр отворів в барботері $d_0 = 5 \text{ мм}$, тоді їх загальна кількість буде:

$$z_0 = \frac{4V_p}{\pi d^2 \omega_0} = \frac{0,16}{3,14 \cdot 0,005^2 \cdot 4,94} = 412$$

Якщо всі отвори розмістити по колу діаметра D_{cp} в два ряди, то крок їх розташування буде:

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$t = \pi D_{cp} (2/z_0) = 3,14 \cdot 875 \cdot (2/412) = 13,33 \text{ мм}$$

Крок розміщення отворів в цьому ряду $t_2 = 3,14 \cdot 462 / 206 = 7 \text{ мм}$.

5.2.5. Тепловий розрахунок

В процесі нагрівання середовища в реакторі тепла енергія підводиться теплоносієм, що поступає в теплообмінний пристрій апарата (сорочку).

Теплота, що надходить до середовища в реакторі при нагріванні:

$$Q_c = m_c \cdot C_{cp1} \cdot (t_{K1} - t_{H1}),$$

де m_c – маса середовища; C_{cp1} – питома теплоємність середовища в апараті при середній температурі нагрівання; t_{K1} – кінцева температура в середовищі (тут: задана температура середовища в апараті $t_{c1} = 28 \text{ }^\circ\text{C}$), t_{H1} – початкова температура середовища (приймаємо кімнатну температуру 20°C).

Маємо масу середовища:

$$m_c = V \cdot \rho_c$$

$$m_c = 5,6 \cdot 1050 = 5880 \text{ (кг)}$$

Середня температура нагрівання:

$$t_{cp} = 28 - 20 = 8 \text{ (}^\circ\text{C)}$$

$$Q_c = 5880 \cdot 3,39 \cdot (28 - 20) = 159,5 \text{ (кДж)}$$

Теплота, що витрачається на нагрівання реактора:

$$Q_a = m_a \cdot C_a \cdot (t_{Ka} - t_{Ha}),$$

де m_a – маса реактора, 2500 кг; C_a – питома теплоємність матеріала, з якого виготовлений реактор (для вуглецевих сталей $C_a = 500 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{K}}$); t_{Ka} та t_{Ha} – початкова і кінцева температури реактора при нагріванні, $^\circ\text{C}$ (приймаємо початковою температуру середовища на початку процесу, тобто $t_{Ha} = 20^\circ\text{C}$); t_{Ka} – приймаємо за $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$Q_a = 2500 \cdot 500 \cdot (28 - 20) = 10000 \text{ кДж}$$

Теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішувачів пристроїв:

$$Q_{дис} = N \cdot \tau_{пер}$$

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$Q_{\text{дис}} = 9600 \cdot 20 = 192 \text{ кДж}$$

Втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$Q_{\text{втр}} = 0,03(Q_c + Q_a + Q_{\text{дис}})$$

$$Q_{\text{втр}} = 0,03(159,5 + 10000 + 192) = 310,5 \text{ кДж}$$

Рівняння теплового балансу:

$$Q_m = Q_a + Q_c + Q_{\text{втр}} + Q_{\text{дис}}$$

$$Q_T = 10000 + 159,5 + 310,5 + 192 = 10662 \text{ кДж}$$

Розрахунок проводиться за методикою Колосков С. П. «Оборудование ферментной промышленности» [57].

$t_1=32^\circ\text{C}$ – температура води при вході в сорочку; $t_2=28^\circ\text{C}$ – температура води при виході з сорочки.

Тепло, що підводиться водою:

$$Q_{\text{вод}} = Q_a - Q_{\text{втр}} = 10000 - 310,5 = 9689,5 \text{ кДж}$$

Розхід води для підводу тепла:

$$G_{\text{вод}} = \frac{Q_{\text{вод}}}{c(t_2 - t_1)} = \frac{9689,5}{4186(32 - 28)} = 0,57 \text{ кг/с}$$

$$\Delta t_6 = 32 - 30 = 2^\circ\text{C}$$

$$\Delta t_m = 30 - 28 = 2^\circ\text{C}$$

$$\Delta t_6 / \Delta t_m = 2/2 < 2$$

Для даного випадку середня різниця температур теплоносіїв:

$$\Delta t_{\text{ср}} = \frac{\Delta t_6 + \Delta t_m}{2} \cdot \frac{2+2}{2} = 2^\circ\text{C}$$

Для апаратів з сорочками з перемішуванням мішалкою коефіцієнт тепловіддачі від перемішуючої рідини до стінки визначають за рівнянням:

$$Nu = 0,36 \cdot Re^{0,67} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu_{\text{реч}}}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}$$

Критерій Нусельта: $Nu = \frac{\alpha_1 D_{\text{вн}}}{\lambda}$,

$$\frac{\alpha_1 D_{\text{вн}}}{\lambda} = 0,36 \left(\frac{\rho n d_m^2}{\mu_{\text{реч}}} \right)^{0,67} \left(\frac{c_p \mu_{\text{реч}}}{\lambda} \right)^{0,33} \left(\frac{\mu_{\text{реч}}}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}$$

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Звідси коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що перемішується, до стінки :

$$Nu = 0,36 \cdot \left(\frac{1050 \cdot 3 \cdot 0,5^2}{1,55 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,67} \cdot \left(\frac{4186 \cdot 1,55 \cdot 10^{-3}}{0,6} \right)^{0,33} \cdot \left(\frac{1,55 \cdot 10^{-3}}{1,086 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,14}$$

$$= 0,36 \cdot 6652,2 \cdot 2,19 \cdot 1,051 = 5512,06$$

$$\alpha_1 = \frac{Nu \cdot \lambda}{D_{\text{вн}}} = \frac{5512,06 \cdot 0,6}{1,6} = 2067 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

В'язкість середовища: $\mu = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

Густина середовища: $\rho_c = 1050 \text{ кг/м}^3$

Питома теплоємність середовища: $c_c = 4186 \text{ Дж/кг} \cdot \text{°C}$

Теплопровідність середовища: $\lambda = 0,6 \text{ Вт/м} \cdot \text{°C}$

Внутрішній діаметр ферментеру: $D_{\text{вн}} = 1,6 \text{ м}$

Діаметр мішалки: $d_m = 0,5 \text{ м}$

Число обертів мішалки: $n = 3$

Розрахуємо коефіцієнт тепловіддачі від води до стінки апарата.

Знайдемо середню температуру стінки апарата:

$$t_{cm} = \frac{t_{\text{печ}} + \Delta t_{\text{ср}}}{2} = \frac{20 + 2}{2} = 11 \text{ °C}$$

Тоді різниця температур:

$$\Delta t_2 = t_{cm} - \Delta t_{\text{ср}} = 9 \text{ °C},$$

де $\Delta t_{\text{ср}}$ - середня різниця температур теплоносія .

Тоді відповідно :

$$Gr \cdot Pr = H_p^3 \cdot \Delta t_2 \cdot B = 3^3 \cdot 9 \cdot 60 \cdot 10^9 = 14580 \cdot 10^9,$$

де $B = 60 \cdot 10^9$ - коефіцієнт, який відповідає значенню середньої температури води; $H_p = 3 \text{ м}$ – рівень рідини в апараті.

Критерій Нусельта:

$$Nu_2 = C(Gr \cdot Pr)^a = 0,36 \cdot (14580 \cdot 10^9)^{0,33} = 7949,54$$

де C, a – коефіцієнти при $Gr \cdot Pr > 10^9$, $C = 0,36$; $a = 0,33$.

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки апарата до води :

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_g}{H_{\text{руб}}} = \frac{7949,54 \cdot 0,6}{1,85} = 2578 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

де $\lambda_g = 0,6 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$ – теплопровідність води; $H_{\text{руб}} = 1,85 \text{ м}$ – висота рубашки.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розрахуємо термічний опір стінки апарата:

$$\frac{\delta}{\lambda_{cm}} = \frac{0,008}{58,15} = 0,13 \cdot 10^{-3} \frac{Bm}{m^2 \cdot K}$$

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda_{cm}} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{2067} + 0,13 \cdot 10^{-3} + \frac{1}{2578}} = 998,5 \frac{m^2 \cdot K}{Bm}$$

Товщина стінки ферментеру: $S = 0,008$ м, коефіцієнт тепловіддачі стінки ферментеру: $\lambda = 58,15$ Вт/м·°С.

Розрахуємо необхідну поверхню теплообміну реактора:

Час нагрівання $\tau = 10$ хв = 600 с., тоді площа поверхні теплообміну :

$$F = \frac{Q_m}{K \tau \Delta t_{cp}} = \frac{10662000}{998,5 \cdot 600 \cdot 2} = 8,89 \text{ м}^2.$$

$$8,89 \text{ м}^2 < 13 \text{ м}^2.$$

Для даного апарату стандартна рубашка має площу теплообміну $13,0 \text{ м}^2$ за ГОСТ 26-01-984-74 «Рубашки неразъемные с эллипсоидным днищем стальных сварных сосудов и аппаратов. Основные параметры и размеры». Розрахована площа теплообміну є меншою ніж стандартна, тобто рубашка забезпечує необхідну температуру у реакторі протягом його роботи без додаткових теплообмінників.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

При виробництві мікробіологічних продуктів, а в даному випадку біопрепарату гаупсин, необхідно здійснювати різноманітні операції. При цьому правильність вибору допоміжного обладнання суттєво впливає на ефективність всього виробництва. Сучасне мікробіологічне виробництво містить значну кількість допоміжного обладнання різноманітного призначення.

Часто в технології потрібно вирішити задачу – транспорт рідини з більш низького рівня на більш високий. Для цього використовують гідравлічні машини – насоси, в яких механічна енергія двигуна перетворюється в енергію транспортованої рідини в результаті підвищення її тиску.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						81
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Насосами називають машини, які призначені для створення і підтримання постійного потоку рідини [54].

Основними характеристиками роботи насосів являється: продуктивність, напір, корисна потужність, ККД, частота обертання ротору, допустима висота всмоктування [59].

Розрахунок насоса включає визначення напору і потужності електродвигуна при заданому параметрі витрати рідини і вибір насосу із каталогів, враховуючи особливості технологічної операції.

Обираємо відцентровий герметичний насос, для подачі компонентів поживного середовища в ферментер. Особливістю таких насосів є відсутність сальникових або торцевих ущільнень. Випускають відцентрові горизонтальні ЦНГ та вертикальні ХГВ.

Розрахунок здійснюється за методикою Иоффе И.Л. «Проектирование процессов и аппаратов химической технологии» [58].

Припустимо, що компоненти поживного середовища до реактора подаються за 2 год. Тоді об'ємна витрата рідини:

$$G_p = \frac{V}{7200} = \frac{5,6}{7200} = 0,0007 \frac{\text{м}^3}{\text{с}}$$

Розрахунок швидкості руху рідини:

$$W_p = \frac{G_p}{S} = \frac{0,0007}{0,00785} = 0,09 \frac{\text{м}}{\text{с}},$$

де S – площа поперечного перерізу трубопроводу ($S = 0,785 \cdot d^2 = 0,785 \cdot 0,1^2 = 0,00785 \text{ м}^2$, де d – діаметр трубопроводу, який вибирається з економічної і конструктивної точок зору).

Коефіцієнт тертя λ для турбулентного режиму:

$$Re_p = \frac{W_p \cdot d \cdot \rho_p}{\mu_p} = \frac{0,09 \cdot 0,1 \cdot 1050}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 6097,$$

де ρ_p – густина речовини при 30 °С.

$$\lambda_p = \frac{0,09}{Re^{0.25}} = \frac{0,09}{6097^{0.25}} = 0,01.$$

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Втрати напору:

$$h_n = \left(\lambda_p \cdot \frac{L}{d} + \sum \xi \right) \frac{W_p^2}{2g},$$

де L - довжина труб, $\sum \xi$ - сума коефіцієнтів місцевого опору потоку в трубному просторі. $\sum \xi = 2 \cdot \xi_{mp1} + 2 \cdot \xi_{mp3} + 2 \cdot \xi_{mp4} + 2 \cdot \xi_{mp2}$, де $\xi_{тр1} = 0,09$ - плавний відвід круглого перерізу; $\xi_{тр2} = 0,5$ - вхід в труби; $\xi_{тр3} = 1,0$ - вихід з труб; $\xi_{тр4} = 4,1$ - опір вентеля.

$$\sum \xi_{м.с.} = 2 \cdot 1,0 + 2 \cdot 0,5 + 2 \cdot 0,09 + 2 \cdot 4,1 = 11,28$$

$$h_n = \left(0,01 \cdot \frac{3,0}{0,1} + 11,28 \right) \frac{0,09^2}{2 \cdot 9,81} = 0,0047 \text{ м}$$

Отже, втрати напору в трубному просторі становлять 47,8 Па.

Напір визначається за формулою:

$$H = \frac{p_2 - p_1}{\rho g} + H_p + h_n = \frac{0,1 \cdot 10^6}{1050 \cdot 9,8} + 3,3 + 0,0047 = 13,02 \text{ м},$$

де p_1 - тиск в апараті з якого перекачується середовище, p_2 - тиск в реакторі, H_p - геометрична висота підйому рідини, h_n - втрати напору.

Корисна потужність насоса:

$$N_n = \rho g H G = 1050 \cdot 9,8 \cdot 13,02 \cdot 0,0007 = 94 \text{ Вт}$$

Потужність, яку має розвивати електронасос на вихідному валу при установленому режимі роботи:

$$N = \frac{N_n}{\eta_n \eta_n} = \frac{0,094}{0,75 \cdot 1} = 0,125 \text{ кВт}$$

де η_n - ккд насоса, приймаємо $\eta_n = 0,75$;

η_n - ккд передачі від електропривода до насоса, $\eta_n \approx 1$.

Потужність, яку споживає двигун від мережі при $\eta_{дв} = 0,7$:

$$N = \frac{N_{дв}}{\eta_{дв}} = \frac{0,125}{0,7} = 0,178 \text{ кВт}.$$

Враховуючи коефіцієнт запасу потужності $\beta = 2$, встановлюємо двигун потужністю:

$$N_{уст} = N \cdot \beta = 0,178 \cdot 2 = 0,35 \text{ кВт}$$

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						83
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Встановлюємо центробіжний насос марки Pedrollo CP /0.25-2.2 кВт з наступною характеристикою: продуктивність 0,0026 м³/с; напор до 56 м; номінальної потужності 0,25-2,2 кВт, частотою обертання валу n=48,3 об/с.

Для центробіжних насосів, запас напору, необхідний для виключення кавітації:

$$h_3 = 0,3 \cdot (G_p \cdot n^2)^{\frac{2}{3}} = 0,3 \cdot (0,0007 \cdot 48,3^2)^{\frac{2}{3}} = 0,41 \text{ м.}$$

Також для забезпечення аерації під час культивування продуцента *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofeciens* необхідна підготовка стерильного аераційного повітря. Для біотехнологічних виробництв традиційними методами підготовки повітря є метод фільтрування через перегородки з різних матеріалів. Вибір методу стерилізації повітря в загальному вигляді є вибором фільтруючого матеріалу і способу його фіксації в корпусі фільтра.

Виходячи з теорії стерилізації повітря, для видалення контамінантів використовують волокнисті фільтруючі матеріали з різних мінеральних або органічних речовин, пористі перегородки з кераміки або полімерних матеріалів. Атмосферне повітря завжди містить дрібні тверді або рідкі частинки, які несуть на собі різноманітні мікроорганізми [60].

Основною вимогою, що ставиться до аеруючого повітря, є його стерильність. Ефективність роботи системи очищення повітря оцінюють коефіцієнтом проскоку K_n , %

$$K_n = (X/X_0) \cdot 100\%$$

де X , X_0 – концентрація мікроорганізмів у повітрі відповідно після і до системи очищення повітря, кл/м³.

Для асептичних процесів біосинтезу K_n повинен становити 10^{-8} - 10^{-11} %, для промислових систем – 10^{-4} - 10^{-6} %.

Для стерилізації повітря з належними характеристиками використовують два методи: знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання, наприклад, за допомогою УФ-опромінювання, та вилучення її методом фільтрування.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						84
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Перший метод є більш надійним та ефективним, але для промислових масштабів є неприйнятним, оскільки у виробничих умовах витрачають занадто великі об'єми повітря, щоб можна було б говорити про економічну доцільність таких рішень. В промислових умовах використовують в основному метод фільтрування крізь шари насипного, пористого або волокнистого матеріалу.

Для попередньої стерилізації використовують глибинні (набивні) фільтри на основі волокнистих матеріалів. Для остаточної стерилізації перед входом у ферментер встановлюють індивідуальні фільтри з розгорнутою поверхнею або абсолютні, які діють як сита, патронного типу. Абсолютні сита створюють велику втрату тиску повітря й швидко забиваються, тому застосовують їх рідко.

Попри те, що волокна набивного фільтру розташовані між собою на відстанях на порядок більше діаметрів мікрочастинок, вони діють досить ефективно. При великих швидкостях частинки, проходячи шар волоконного фільтру, рано чи пізно зустрічають на своєму шляху волокно і затримуються ним (інерційний механізм осадження).

Набивні фільтри мають ряд недоліків:

а) Внаслідок відносно невеликої площі перерізу для проходження великих об'ємів повітря доводиться збільшувати швидкість фільтрування (1-3 м/с), що веде до утворення каналів і до так званих «краєвих» ефектів, завдяки яким повітря без фільтрування проходить вздовж стінки апарата.

б) Попадання крапель вологи також призводить до утворення каналів і проходженню повітря через них без фільтрування.

в) Набивні фільтри мають значний гідравлічний опір і важкі в експлуатації.

На сьогоднішній день такі фільтри застосовують лише на першому етапі стерилізаційного очищення. На рисунку 5.3 наведені конструкції набивних фільтрів Гіпромедпрому та КБ ВНДІФС.

В якості індивідуальних фільтрів широко застосовують рамочні або патронні фільтри з тканиною Петрянова на основі перхлорвінілового волокна.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						85
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		

Фільтр уявляє собою сталевий циліндр з кришкою і конічним дном. Усередині апарата встановлюють 73 циліндричних перфорованих трубок, обгорнутих тканиною Петрянова. Загальна площа фільтрування – 17,5 м². Після проходження крізь тканину повітря стерилізується. Продуктивність цього фільтра 1000 м³/год.

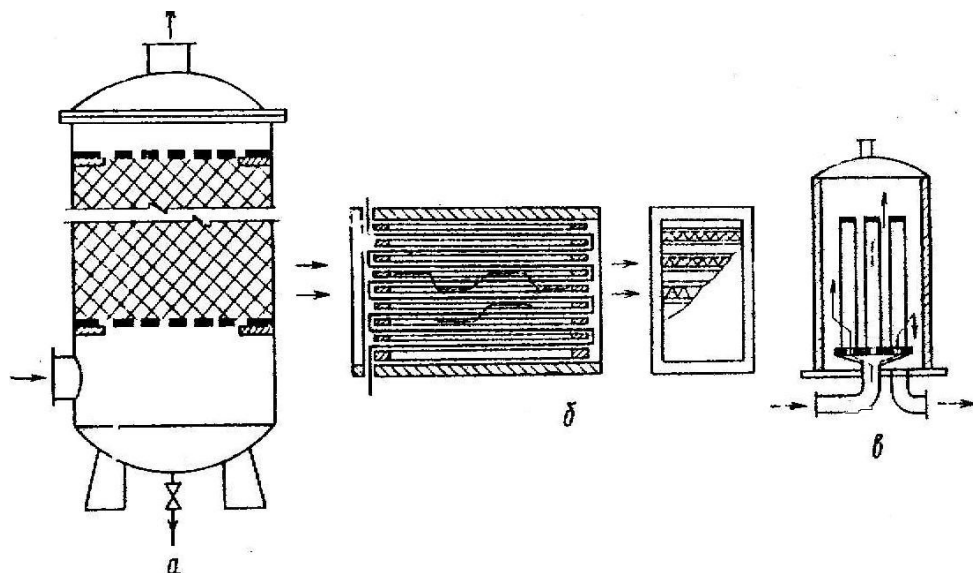


Рисунок 5.3. Основні типи фільтрів тонкої очистки і стерилізації, де *а* – набивний (глибинний); *б* – з розгорнутою поверхнею (рамковий); *в* - сітчастий (абсолютний) патронного типу [60].

До системи очищення повітря входять різні апарати (обладнання):

- фільтр для очистки повітря від пилу та інших механічних домішок (фільтр для вилучення механічних часток);
- система стабілізації термодинамічних показників повітря (кондиціонери);
- головний повітряний фільтр (груповий фільтр) для очищення всього повітря, що поступає із повітродувки;
- індивідуальний повітряний фільтр перед кожним ферментером і посівним апаратом.

Вибір фільтру попередньої очистки повітря орієнтований на ефективне видалення крупних фракцій контамінантів з повітря, які можуть пошкодити компресійне обладнання. Фільтр попередньої очистки повітря встановлюють перед повітродувкою, щоб у неї не потрапляли пил та механічні забруднення повітря. Перевага віддається фільтрам простої конструкції, які можна

регенерувати.

Після цього повітря потрапляє в головний повітряний фільтр, який використовують для підготовки повітря групи ферментерів. Фільтруючим матеріалом виступає багатошарова конструкція яка складається з шару активованого вугілля висотою 700 – 900мм, над та під яким укладають шар скляної вати (100–150мм) для усунення можливості провалу та виносу частинок вугілля. Діаметр волокна скловати дорівнює 21 мкм.

Для остаточного очищення повітря перед ферментером встановлюється індивідуальний повітряний фільтр. Фільтруючим матеріалом може бути тонка скляна вата, волокна якої мають діаметр не більше 1 – 2 мкм; часто використовують базальтове тонке та супертонке волокно (БСТВ). Діаметр волокна дорівнює 0,7-1,0 мкм.

Широке розповсюдження мають фільтри, в яких фільтруючі елементи виготовлені з тканини Петрянова (ацетилцелюлози). Саме такий тип фільтрів було обрано при проектуванні виробництва біопрепарату гаупсин.

Для запобігання псування фільтру та потрапляння механічних частинок і біологічних контамінантів до основного технологічного процесу, встановлюється декілька фільтрів у системі, щоб можна було своєчасно здійснити заміну фільтру та не знижувати показники якості аераційного повітря.

Фільтри в яких використовуються мінеральні волокна, керамічні або металокерамічні перегородки стерилізують гострою парою. Для фільтрів з полімерних волокон загальноновизнаним є метод стерилізації хімічними речовинами - аерозолем формаліну [61].

Існує цілий набір методів стерилізації повітря, але всі вони повинні гарантувати ефективність вилучення контамінантів. В біотехнологічній практиці застосовується типова багатоступенева система очистки, яка дозволяє послідовно вилучати механічні та мікробні частинки.

Згідно з типовою технологією пропонується використати стандартну очистку, яка складається з блоків:

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						87
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Попередня очистка повітря;
- Стерилізація повітря у головних фільтрах;
- Стерилізація повітря в індивідуальних фільтрах.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Проектування, будівництво і реконструкція підприємств згідно правил безпеки проводиться у відповідності із будівельними нормами і правилами (СНіП).

При організації будь-якого виробництва в мікробіологічній промисловості повинні враховуватися всі елементи праці на всіх виробничих операціях і залежно від того, як об'єктивно вони будуть враховані, будуть залежати умови праці робітників.

Охорона праці являє собою систему законодавчих актів і відповідних соціально-економічних, технічних, гігієнічних і організаційних заходів, що забезпечують безпеку, збереження здоров'я і працездатність людини в процесі праці [59].

Завод, на якому виробляють мікробіологічні продукти, має складне технологічне обладнання, засоби механізації та електрообладнання. На виробництві використовуються деякі шкідливі для здоров'я хімічні речовини. Наявні пожежно – та вибухонебезпечні ділянки.

Попередження небезпечних дій під час підготовки та виконання заміни вузлів, реорганізації, новому будівництві та технічному переобладнанні обґрунтовані та встановлені ГОСТ 12.3.038-85 «Система стандартів безпеки труда. Строительство. Работы по тепловой изоляции оборудования и трубопроводов». Проведення всіх робіт має відповідати вимогам “ССБТ. Процессы производственные. Общие требования безопасности”, ГОСТ 121004-91, “ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования”.

Мають бути приведені до норм наступні параметри:

- запиленість та загазованість повітря;

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						88
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- рівень шуму та вібрацій;
- рівень світла на робочому місці;
- фізичні показники: температура, вологість та швидкість потоку повітря навколо робочого місця;
- вміст шкідливих речовин, що має не перевищувати рівень ГДК, нормованих ГОСТ 12.1.005-88 “ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны”.

Велика увага на виробництві приділяється попередженню професійних захворювань. На виробництві повинен проводитись регулярний та суворий контроль на наявність в повітрі токсичних та хімічних речовин.

У приміщенні виробництва можуть виникати несприятливі умови через недотримання оптимальних параметрів вологості, температури, швидкості руху повітря, підвищеного тепловиділення, що спричинено поганою вентиляцією чи надмірним тепловим випромінюванням апарату. Ці фактори знижують працездатність та ефективність праці персоналу, підвищується втомлюваність та потовиділення, втрачається рідини та настає стан надмірної втоми.

Створення оптимальних параметрів досягається шляхом автоматизації процесу кондиціонування та вентиляції всіх відділень приміщення. Якщо не вдається виключити всі дестабілізуючі фактори роботи працюючих, необхідно застосовувати підсолону газовану воду, для підтримання працездатності працюючих.

Працювати мають право лише ті працівники, які пройшли інструктаж із техніки безпеки та мають досвід роботи з обладнанням.

Робота має проводитися лише на справному обладнанні, за наявності кожуха на вузлах, що обертаються та при заземленні обладнання.

Згідно з робочим регламентом періодично проводиться перевірка відповідності реальних показників встановленим нормам [62].

Вимоги безпеки до реакторів, в яких відбувається культивування продуцентів:

- апарати повинні бути герметичні по відношенню до зовнішнього середовища. Ступінь герметичності апаратів, а також методи і способи їх

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						89
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

випробування на герметичність, слід визначати за ГОСТ 26-11-14 «Сосуды и аппараты, работающие под давлением. Газовые и жидкостные методы контроля герметичности»;

- конструкція апаратів повинна забезпечувати повне звільнення від залишків поживного середовища та культуральної рідини перед їх розбиранням;
- апарати повинні бути забезпечені штуцерами для їх промивання і продування, для встановлення запобіжних пристроїв, контрольно-вимірювальних приладів та арматури. У необхідних випадках для проведення гідравлічних і пневматичних випробувань (як у вертикальному, так і в горизонтальному положенні) повинні бути передбачені штуцери для заповнення корпусу апарата й сорочки водою, випуску залишків повітря з верхньої частини корпусу апарату, а також отвір з пробкою і заглушкою для повного зливу води після випробувань;
- температура зовнішніх поверхонь апаратів або кожухів теплоізоляційних покриттів, доступних дотику з робочих місць обслуговуючого персоналу, не повинна перевищувати 45°C при установці апаратів усередині виробничих приміщень і 60°C при зовнішній установці.

Безпечність умов праці сильно залежить від строків проведення планово-технічних ремонтів, зовнішнього та внутрішнього огляду приміщення, огляду обладнання в час планових та капітальних ремонтів. Перенесення строків планово-технічних ремонтів є неприпустимим. Подібна халатність може призвести до аварій, які легше попередити, аніж ліквідувати.

Стічні води можуть спускатися у каналізацію тільки у відповідності до санітарних правил та норм. Перед тим, як викинути стічні води в каналізацію, їх треба спочатку очистити, щоб вилучити і регенерувати цінні продукти. Тверді відходи збирають, а потім відправляють на полігон побутових відходів. [63].

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. У проекті для виробництва препарату Гаупсин обрано продуцент *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* штами УКМ В-111 і УКМ В-306 із біосинтетичною активністю $15 \pm 1,5$ г/л культуральної рідини.

2. Проаналізовано загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту феназинових антибіотиків та запропоновано схему отримання продуценту за допомогою хімічного мутагенезу з використанням N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину (нітрозогуанідину) (20 мкг/мл, 30 хв.) та збагачення ПС із культурою ампіоксом (комплексний антибіотик, що складається з ампіциліну і оксациліну в співвідношенні 1: 1) з концентрацією 500 мкг/мл.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі меляси, а також визначені раціональні параметри культивування: температура $28 \pm 1^\circ\text{C}$, перемішування при 180 об/хв, тривалість 24 год, питома витрата повітря за хвилину 1,0-1,5 л / л середовища.

4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для культивування продуценту обрана і розрахована конструкція ферментера об'ємом 8 м^3 із рубашкою, еліптичною кришкою та днищем, турбінною відкритою шестилопатевою мішалкою та барботером, що дозволяє отримати культуральну рідину належної якості із титром активних клітин не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО / мл.

5. Запропоновано використання пептону та дріжджового екстракту в якості джерела азоту з додатковим внесенням NaNO_3 і KH_2PO_4 до поживного середовища, що забезпечує максимальний вихід біомаси і титру активних клітин.

					ДП 6118.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Скляр Ю.О.				ВИСНОВКИ		Стадія	Аркуш
Консульт.								91
								103
Керівник	Клочко В.В.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затверд.								

6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва препарату Гаупсин для рослинництва в рідкій формі у пляшках по 1 л та каністрах по 10 л.

7. Вивчені штами *Pseudomonas chlororaphis subsp.aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 є резистентними до сучасних хімічних засобів захисту рослин, що свідчить про можливість їх спільного застосування, що могло б призвести до сумарного корисного ефекту. Препарат Гаупсин є безпечною для людини та навколишнього середовища альтернативою хімічним препаратам. Внаслідок його використання стане можливим зниження впливу пестицидів і хімікатів на біоценози, а також отримання врожаю, вільного від шкідливих речовин.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92

ДОДАТКИ

Додаток А



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ
НАВКОЛИШНЬОГО ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА УКРАЇНИ

ПОСВІДЧЕННЯ

про державну реєстрацію

Серія А № 02155

Видане ТОВ «Захист-Агро» та ПП «Агро-Захист», Україна
(назва організації чи фірми)

про те, що відповідно до Закону України «Про пестициди та агрохімікати»

препарат Гуансин, р., біопрепарат
(назва та його препаративна форма)

діюча речовина бактерії Pseudomonas aureofaciens B-111 та B-306, типр життєздатних клітин 10×10^3 /мкг препарату
(назва та її зміст)

виробник препаративної форми ТОВ «Захист-Агро» та ПП «Агро-Захист», Україна

виробник діючої речовини ТОВ «Захист-Агро» та ПП «Агро-Захист», Україна

сфера та умови застосування Зернові, садові (яблуня), в т.ч. для роздрібного продажу населенню.
Тара: пляшки полімерні смістю від 0,25 до 3,0 л, каністри полімерні смістю від 5,0 до 25,0 л.
(культура чи об'єкт, тара, фасування та кількість, кг/л)

Зареєстрований в Україні терміном до «31» грудня 2020 р.

Запис у державному реєстрі за № 1638 від «27» серпня 2010 р.

Заступник Міністра
М.П.  А. Володін



					ДП 6118.00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум	Підпис	Дата	ДОДАТКИ	Стадія	Аркуш	Аркушів	
Розробив		Скляр Ю.О.							
Консульт.							100	103	
						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ			
Керівник		Клочко В.В.							
Затверд.									

УКРАЇНА UKRAINE



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 40089

БІОПРЕПАРАТ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ВРОЖАЮ РОСЛИН

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **25.03.2009.**

Голова Державного департаменту інтелектуальної власності



М.В. Паладій




Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6118.00.000 ПЗ

Арк.

101



**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА САНІТАРНО-ЕПІДЕМІОЛОГІЧНА СЛУЖБА**

Міністерство охорони здоров'я України

(назва установи)

01601 м.Київ, вул.Грушевського, 7

(місцезнаходження)

253-94-84, 559-29-88

ЗАТВЕРДЖУЮ



М.А.Ситенко

Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи

від 22.01 2010р.

№ 05.03.02-05/ 1938

Біопрепарат «Гуапсин», р. (бактерії *Pseudomonas aureofaciens* В-111 та В-306, титр життєздатних клітин 10×10^3 /мкг препарату)

(об'єкт експертизи)

код за ДКПН: 24.20.15

(код за ДКПН, код за УКТЗЕД артикул)

Сільське господарство, державна реєстрація, роздрібний продаж населенню

(сфера застосування та реалізації об'єкта експертизи)

ТОВ «Захист-Агро», 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 31374036; ПП «Агро-Захист» 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 33579239, Україна, -

(країна, виробник, адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, WWW)

ТОВ «Захист-Агро», 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 31374036; ПП «Агро-Захист» 67613, Одеська обл., Біляївський р-н, с. Василівка, вул. Гагаріна, 2; тел./факс: (04852) 4-14-58, код за ЄДРПОУ 33579239, Україна, -

(заявник експертизи, адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, WWW)

За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи погоджено включення об'єкта експертизи Біопрепарат «Гуапсин», р. (бактерії *Pseudomonas aureofaciens* В-111 та В-306, титр життєздатних клітин 10×10^3 /мкг препарату) до "Переліку пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні" зі статусом "постійна реєстрація", Використовується за призначенням в агропромисловому та приватному секторі для захисту зернових та садових культур (яблуні) з нормою витрати 4-6 л/га, двократно.

За параметрами токсикометрії відповідає IV класу небезпечності (малонебезпечні сполуки), згідно з ГОСТ 12.1.007-76; проявляє слабку подразнюючу дію на слизові оболонки очей, не подразнює шкіру, не володіє сенсibilізуючою дією.

Для контролю за безпечним застосуванням препарату необхідно дотримуватись гігієнічних нормативів: ГДК *Pseudomonas aureofaciens* у повітрі робочої зони - 1×10^2 КУО/м³ (лімітуючий показник – дисбіотична дія). Строки виходу на оброблені ділянки та строки очікування до збору урожаю не регламентуються.

Під час застосування, транспортування, зберігання необхідно дотримуватись вимог ДСП 8.8.1.2.001-98

"Транспортування, зберігання і застосування пестицидів в народному господарстві", ДСП 201-97 «Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами)», ГОСТ 28471-90 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение».

Висновок дійсний до: постійно

Відповідальність за дотримання вимог цього висновку несе заявник.

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ док.	Підпис	Дата		



ТОВ «НАУКОВЕ ВИРОБНИЧЕ ПІДПРИЄМСТВО» «ЛІСТ ФОРТЕ»

09500, Україна, Київська обл., м. Тараща, вул. Б. Хмельницького 1/2,

ПАТ «КРЕДОБАНК» МФО 325365 р/р 2600401664926

тел/факс: (04566) 4-25-57, email: office.lf@gmail.com

СЕРТИФІКАТ ЯКОСТІ

Виробник: ТОВ «НАУКОВО-ВИРОБНИЧЕ ПІДПРИЄМСТВО «ЛІСТ ФОРТЕ»

Назва продукції: УЛЬТРАФІТ

Партія:

Розмір:

Одержувач:

Дата виробництва:

Показники	Результат	Результати випробувань
Опис	Культуральна рідина штамів виду <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>Aureofeciens</i> та їх метаболітів	Відповідає
Зовнішній вигляд	Рідина світло-жовтого кольору з опалесценцією	Відповідає
Запах	Незначний специфічний запах бактеріального концентрату	Відповідає
Водневий показник розчину препарату, од. рН	6,3-7,3	7,0
Колір	Суспензія від світло-жовтого до світло-бурого чи бурого кольору	Відповідає
Загальна кількість життєздатних клітин <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofeciens</i> (КУО) не менше	3×10^8	Відповідає
Загальна кількість сторонніх мікроорганізмів, % не більше	1	Відповідає
Маркування	Маркування згідно з ГОСТ 28471. Дата виготовлення на етикетці	Відповідає
Пакування	Пакування згідно з ГОСТ 28471, каністри по 2-10 л	Відповідає

Умови зберігання: У сухому, темному приміщенні за температури від 5 до 20 °С. Не допускати потрапляння на упаковку прямого сонячного проміння.

Висновок. : Якісні та кількісні характеристики біопрепарату відповідають зазначеним вимогам

					ДП 6118.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		103