

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

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

«10» червня 2023 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва біопрепарату для захисту рослин на
основі гриба роду *Trichoderma*. Дільниця виробничого культивування»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-92

Корочева Анастасія Олексіївна _____

Керівник:

асистент кафедри промислової біотехнології та біофармації.

Сироїд Олена Олегівна _____

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

Доцент кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н., доц.

Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

доцент каф. біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н., доц.

Козар Марина Юріївна _____

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

Студент(-ка) _____

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 9212 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Корочева А.О.				1	143
Керівн.	Сироїд О.О.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-92	
Консульт.	Шибецький В.Ю.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Полішук В.Ю.					

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

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

«19» квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Корочевій Анастасії Олексіївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва біопрепарату для захисту рослин на основі гриба роду *Trichoderma*. Дільниця виробничого культивування», керівник проєкту Сироїд Олена Олегівна, ас., затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1889-с.

2. Термін подання студентом проєкту 05.06.2023 р.

3. Вихідні дані до проєкту: штам-продуцент *Trichoderma harzianum* MSB1211; середовище культивування – на основі меляси та кукурудзяного екстракту; ферментер для промислового культивування – об'єм 5 м³, параметри культивування: $t = 28-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, аерація, $\tau = 72-96$ год; кінцевий продукт – рідкий біопрепарат, що містить міцелій і спори *Trichoderma harzianum* MSB1211, у флаконах по 1 л для захисту рослин від патогенів грибкової та бактеріальної природи.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва біопрепарату для захисту рослин; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему

отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

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 – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

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

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	20.04.23-27.04.23 р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	27.04.23-1.05.23 р.	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	1.05.23-05.05.23 р.	
4.	Технологічна частина	06.05.23-14.05.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	14.05.23-19.05.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	19.05.23-23.05.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки	23.05.23-30.05.23 р.	
8.	Подання дипломного проєкту на рецензування	30.05.23-05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проєкту та рецензії до експертної комісії	до 10.06.23 р.	

Студент

Анастасія КОРОЧЕВА

Керівник

Олена СИРОЇД

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва біопрепарату для
захисту рослин на основі гриба роду *Trichoderma*.
Дільниця виробничого культивування»

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт містить 143 с., 29 рис., 6 табл., 148 посилань.

Проект присвячено розробці технології виробництва біопрепарату для захисту рослин на основі гриба роду *Trichoderma* та діляниці виробничого культивування.

У якості продуцента біопрепарату обрано штам *Trichoderma harzianum* MSB1211 та запропоновано схему його селекції шляхом штучного відбору із природного середовища існування за ознакою біологічної активності. Обрано поживне середовище для вирощування посівного матеріалу продуцента та для його виробничого культивування на основі меляси та кукурудзяного екстракту.

Для отримання рідкої форми біопрепарату, що являє собою культуральну рідину, яка містить біомасу та метаболіти продуцента, вибрано ефективне обладнання для виробничого культивування – ферментер із сорочкою, турбінною відкритою мішалкою та барботером, наведено його технологічний, конструктивний і тепловий розрахунки.

У проєкті обґрунтовані та наведені технологічна та апаратурна схеми виробництва біопрепарату для захисту рослин. Розроблена технологія відповідає санітарно-гігієнічним та екологічним нормам, вимогам техніки безпеки та охорони праці.

БІОПРЕПАРАТ, ЗАХИСТ РОСЛИН, *TRICHODERMA HARZIANUM* MSB1211, ШТУЧНИЙ ВІДБІР, БІОФУНГІЦИД, ФЕРМЕНТЕР, ТУРБІННА МІШАЛКА, БАРБОТЕР

ABSTRACT

The diploma project contains 143 pages, 29 figures, 6 tables, 148 references.

The project is devoted to the development of a technology for the production of a biological product for plant protection based on a fungus of the *Trichoderma* spp. and an area of industrial cultivation.

The strain *Trichoderma harzianum* MSB1211 is chosen as a producer of the biological product and a scheme of its selection by artificial selection from the natural habitat on the basis of biological activity is proposed. The nutrient medium for the cultivation of the producer's seed material and for its production cultivation based on molasses and corn extract is selected.

To obtain a liquid form of the biological product, which consists of a cultural liquid containing biomass and metabolites of the producer, an efficient equipment for production cultivation is selected - a fermenter with a jacket, a turbine open stirrer, and a gas bubbler, and its technological, structural, and thermal calculations are presented.

The project substantiates and presents technological and instrumentation schemes for the production of a biopreparation for plant protection. The developed technology meets sanitary, hygienic, and environmental standards, as well as health and safety requirements.

BIOPREPARATION, PLANT PROTECTION, *TRICHODERMA*
HARZIANUM MSB1211, ARTIFICIAL SELECTION, BIOFUNGICIDE,
FERMENTER, TURBINE STIRRER, BUBBLER

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1 Основні промислові продуценти.....	11
1.2 Систематичне положення.....	14
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	15
1.4 Культуральні ознаки.....	17
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	18
1.6 Поширення в природі.....	23
РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	26
2.1 Характеристика цільового продукту.....	26
2.2 Схема хімічних перетворень.....	33
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	39
2.4 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	40
РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	44
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	44
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуцента.....	56
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	60
РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	62
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	62
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	64
4.3 Опис технологічного процесу.....	70
4.4 Матеріальний баланс.....	80

					<i>ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Карачева А.О.</i>			<i>ЗМІСТ</i>		
<i>Конс.</i>		<i>Шидецький В.Ю.</i>					
<i>Керівн.</i>		<i>Сироїд О.О.</i>					
<i>Затв.</i>							
						<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>
						<i>Д</i>	<i>7</i>
						<i>Аркушів</i>	<i>143</i>
						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92</i>	

4.5 Контроль виробництва.....	82
РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	97
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	97
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	105
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання.....	118
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	121
ВИСНОВКИ.....	127
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	129

ВСТУП

Хвороби рослин є значною проблемою для ведення сільського господарства та забезпечення населення продукцією цієї галузі. Збудники хвороб рослин можуть мати різноманітну природу. Патогенну дію по відношенню до рослин мають кілька сотень видів бактерій, які належать до груп *Proteobacteria*, *Mollicutes* і *Actinomycetes* [1]. Бактеріальні хвороби рослин завдають руйнівної шкоди посівам, сукупно спричиняючи щорічні збитки ланцюга виробництва харчових продуктів у понад 1 мільярд доларів США [2]. Фітопатогенні гриби спричиняють епідемії, які викликають стійкі та стабільні щорічні втрати врожаю сільськогосподарських культур. Майже усі (більше 300 тисяч) види квіткових рослин, включаючи найважливіші сільськогосподарські овочеві та фруктові культури, здатні піддаватися дії фітопатогенних грибів [3].

Найпоширенішим методом боротьби зі шкідниками рослин у минулому столітті було застосування синтетичних пестицидів – дихлор-дифеніл-трихлоретану (ДДТ), органофосфатних і карбаматних пестицидів. Використання агрохімікатів допомогло підвищити продуктивність сільського господарства, однак воно також спричинило ряд нових проблем: виникнення резистентності у шкідників; генетичні зміни в рослинах; токсичні залишки пестицидів у воді, ґрунтах, повітрі, продуктах харчування та кормах; вторинні спалахи захворювань рослин. Саме тому важливим і перспективним напрямом є розвиток біопрепаратів для захисту рослин, які є ефективною альтернативою синтетичним засобами [4].

Ґрунтові аскоміцети роду *Trichoderma* є патогенами широкого ряду збудників хвороб рослин. Вони здатні забезпечувати різноманітні механізми захисту рослин шляхом синтезу ферментів та вторинних метаболітів (антибіотичних сполук, органічних кислот тощо), що зумовлюють їхню антагоністичну дію на патогени, а також володіють здатністю підвищувати

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП		
Розроб.		Корачева А.О.					
Конс.		Шидецький В.Ю.					
Керівн.		Сироїд О.О.					
Затв.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	9	143
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92		

стійкість рослин до хвороб [5, 6]. Сучасні біопрепарати на основі культур *Trichoderma* найчастіше містять у собі живі культури видів *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. virens*. *Trichoderma harzianum* вважається одним із найбільш вивчених представників даного роду, і штами цього виду є основою численних комерційних біопрепаратів [6].

У даному проєкті у якості продуцента біопрепарату для захисту рослин обрано штам *Trichoderma harzianum* MSB1211, ефективний проти шкідників родів *Pythium*, *Fusarium* і *Botrytis cinerea*, що має високу цінність застосування для біологічного контролю захворювань баштанних, фруктових, овочевих культур [7].

Метою даної роботи є розробка та опис технології виробництва препарату для захисту рослин на основі гриба роду *Trichoderma*.

Для реалізації мети роботи були поставлені наступні задачі:

- встановити особливості обраного продуцента біопрепарату, його морфологічні, фізіолого-біохімічні, культуральні ознаки, обґрунтувати вибір продуцента;
- на основі знань про фізіолого-біохімічні особливості обраного штаму обрати компонентний склад поживного середовища та умови для виробничого культивування;
- проаналізувати генетичну вивченість обраного об'єкту та методи отримання високоефективних промислових продуцентів, навести та обґрунтувати схему отримання продуцента;
- обґрунтувати вибір конструкції ферментеру для виробничого культивування, здійснити технологічний, конструктивний розрахунок для даного виду обладнання, обрати загальнозаводське обладнання;
- охарактеризувати готову продукцію виробництва, описати технологічний процес виробництва цільового продукту, навести його матеріальний баланс, постадійний контроль процесу та розробити технологічну й апаратурну схеми виробництва.

РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Отримання препаратів біологічного походження, які виконують функції добрив, регуляторів росту рослин, контролю чисельності шкідників тощо – актуальний напрям для біотехнологічних виробництв, спрямованих на вирішення потреб сільського господарства.

Біопрепарати для захисту рослин характеризуються значними перевагами відносно препаратів хімічного походження, серед яких особливої уваги варті екологічність виробництва та використання, значно менші витрати сировини та енергетичних ресурсів, а також селективна дія на фітопатогени, завдяки якій вражаються тільки цільові організми-шкідники або збудники хвороб, а шкода рослині-господарю не завдається.

Фунгіциди є препаратами, які використовуються для обробки сільськогосподарських рослин для захисту від грибкових хвороб. Вони мають хімічне або біологічне (біофунгіциди) походження [8]. Біофунгіциди являють собою препарати, діючою речовиною яких є зазвичай жива біомаса, що у контакті з ґрунтом або рослинами синтезує речовини, які мають антибіотичну дію на фітопатогени грибкової природи.

Як можливі продуценти біопрепаратів фунгіцидної дії для захисту рослин від грибкових інфекцій зазвичай відзначаються грибки або бактерії. Найбільше значення для біоконтролю популяцій фітопатогенів мають гриби-антагоністи роду *Trichoderma*, бактерії родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, актиноміцет *Streptomyces*. Штами цих мікроорганізмів мають природне походження – вони виділені з ґрунту або з поверхонь рослин. На основі цих організмів створено велике число препаратів, які успішно застосовуються в овочівництві та дозволені для використання в технологіях виробництва органічної овочевої продукції [9].

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Корочева А.О.				Д	11	143
Конс.		Шидецький В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92		
Керівн.		Сироїд О.О.						
Затв.								

Так, наприклад, одним із найпоширеніших бактеріальних агентів, що чинять фунгіцидну дію, є *Bacillus subtilis*. Представники роду *Bacillus* описані як ефективні агенти для боротьби з рядом захворювань рослин завдяки своїй здатності до синтезу численних антибіотиків широкого спектру дії та їх тривалому терміну зберігання в результаті їх здатності утворювати ендоспори [10]. Зокрема препарат «Фітоцид» містить живі клітини та спори природної *B. subtilis*. Іншим прикладом є препарат «Фітоспорин» на основі живих спорових бактеріальних культур *B. subtilis* штаму 26 Д, які мають здатність до продукування антибіотичних сполук, проявляють антагоністичну дію по відношенню до фітопатогенів грибкового походження, а також здатні проявляти стимулюючий ефект та підвищувати імунітет рослини [11, 12].

Існують також препарати на основі культур бактерій роду *Pseudomonas*. Наприклад, бактерії виду *Pseudomonas aureofaciens* є діючою речовиною у біопрепаратах «Псевдобактерин-2» (*P. aureofaciens*, штам BS 1393) та «АГАТ 25К» (*P. aureofaciens*, штам Н16), що володіють протигрибковою, антибактеріальною та стимулюючою дією [13, 14]. Іншим прикладом біопрепарату фунгіцидної дії на основі бактерій роду *Pseudomonas* є «Планриз» – препарат контактно-системної дії, основою якого є культура *Pseudomonas fluorescens* AP 33 [15].

Перспективними біологічними агентами для боротьби із фітопатогенними організмами також є бактерії типу актиноміцети. Так, стрептотрицинові антибіотики (стрептотрицини Д і С – фітобактеріоміцин) з яскраво вираженою протигрибковою та антибактеріальною дією отримуються з висушеного культурального середовища продуцентів *Streptomyces lavendulae* або *Streptomyces griseus* (препарат «Фітолавін») [16]. *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* є продуцентом комплексу антибіотичних речовин, які володіють фунгістатичною активністю, а також сполук з антимікробною та рістстимулюючою активністю, та лежить в основі новітнього препарату стрептофунгін [17].

Ґрунтові гриби роду *Trichoderma* – антагоністи широкого ряду фітопатогенів, є одними з найбільш вивчених організмів, які знайшли широке застосування у виробництві біопестицидів. Їхні переваги полягають у тому, що вони є поширеними повсюдно у ґрунтах різних типів і продукують активні антибіотичні сполуки, які мають протигрибкові та антибактеріальні властивості (глітоксин, віридин, триходермін, соцукацилін, аламецин, дермадин та ін.), а також здатні забезпечувати різноманітні механізми захисту рослин – мікопаразитизм по відношенню до патогенних форм мікроскопічних грибів-збудників захворювань рослин, синтез антибіотичних сполук, конкуренція за субстрати і середовище існування [18, 19]. До того ж, останні дослідження свідчать також про те, що різні види *Trichoderma* здатні також чинити, окрім захисної, пряму стимулюючу дію на ріст рослин шляхом продукування фітогормонів – ауксинів, етилену, цитокінінів [20].

Гриби роду *Trichoderma* застосовуються у світовій практиці для створення та розробки біологічних препаратів, виходячи із високого антагоністичного потенціалу, швидкості росту та можливості культивування у виробничих умовах. Окрім цього, численні мікроміцети *Trichoderma* є також активними продуцентами ферменту целюлази та здатні до глибокої деструкції як клітинних стінок рослин, так і окремих рослинних полісахаридів, що складно розщеплюються: целюлози, геміцелюлози, пектину до мономерів. Наразі активно досліджується фенолоксидазна активність у *Trichoderma* [21]. Таким чином, препарати, розроблені на основі грибів роду *Trichoderma*, мають потенціал не тільки фунгіцидної, але й комплексної дії.

До початку 2000-х років усі вітчизняні біопрепарати, виготовлені на основі грибів роду *Trichoderma*, носили загальну назву «триходермін». Препарат триходермін одержують на основі культивування гриба на різних природних субстратах: відходах, продуктах харчової або переробної промисловості (гідролізати деревини, м'яса, барда, пшеничні висівки), які збагачують мінеральними солями [19].

Основними продуцентами, що застосовуються для виробництва біопрепаратів фунгіцидної дії на основі грибів роду *Trichoderma*, є *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. atroviride* або *T. virens*. З них найбільш використовуваним та найбільш вивчених вважається *T. harzianum* – антагоніст із широким спектром активності, що пригнічує розвиток таких видів грибкових фітопатогенів: *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lini*, *Phoma betae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium debaryanum*, *Ascochyta pisi*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium* spp., *Bipolaris sorokiniana*, що викликають такі захворювання рослин, як гнилі, вілт, борошниста роса, чорна ніжка, фузаріоз, плямистість листя та бобів, фітофтороз, альтернаріоз, антракноз та ін. [22, 23]

Таким чином, використання грибів роду *Trichoderma* для виробництва біопрепаратів для захисту рослин від грибкових захворювань є доцільним та перспективним напрямом біотехнології сільськогосподарських виробництв.

Обраний продуцент для цієї мети – штам *Trichoderma harzianum* MSB1211. Штам описаний як продуцент, що володіє високою антибіотичною активністю і призначений до застосування для виробництва препаратів проти фітопатогенних грибів та бактерій. Штам володіє антагоністичною активністю проти грибів *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Pythium aphanidermatum* та інших збудників захворювань рослин, забезпечує різноманітні механізми боротьби з фітопатогенами, володіє високою швидкістю розмноження та придатний для культивування різними способами [7].

Зважаючи на властивість біомаси зазначеного штаму до продукування ряду антибіотичних речовин із фунгіцидною дією та антагоністичними властивостями його по відношенню до ряду патогенів культурних рослин, мікроорганізм *T. harzianum* MSB1211 було обрано для промислового культивування біопрепарату для захисту рослин від фітопатогенів.

1.2 Систематичне положення

Обраний мікроорганізм-продуцент *Trichoderma harzianum* має наступне систематичне положення у відповідності до сучасної таксономічної класифікації:

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Наддомен Клітинні організми
Домен Eukaryota (Еукаріоти)
Царство Fungi (Гриби)
Підцарство Dikarya (вищі гриби)
Відділ Ascomycota
Підвідділ Pezizomycotina (нитчасті аскоміцети)
Клас Sordariomycetes (Сордаріоміцети)
Підклас Hypocreomycetidae
Порядок Hypocreales (Гіпокреальні)
Сімейство Hypocreaceae
Рід *Trichoderma*
Вид *Trichoderma harzianum* Rifai, Mycol. Pap. 116: 38 (1969) [24, 25]

Штам *Trichoderma harzianum* MSB1211 [7]

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Міцелій *Trichoderma harzianum* септований, розгалужений, гіфи гладкі, розгалуження дихотомічне. Конідіофори поширюються до верхівки пірамідально і високо розгалужуються. Головні гілки переважно зібрані групами по три-чотири. Гілки конідіофор зазвичай парні. Фіаліди мають колбоподібну форму і зазвичай короткі та широкі в середині із середньою довжиною 4–6 мкм. Спостерігаються фіаліди, які часто закінчуються вузькою шийкою і виникають переважно в скупченому вигляді та мають 3–5 завитків; завитки зазвичай мають колбоподібну форму і розширені посередині. Довжина фіалід, як правило, менша, ніж в інших видів *Trichoderma*, становлячи у середньому 6,0–10,00 мкм. Конідії, як правило, мають кулясту або субкулясту форму із середньою довжиною 2–3 мкм, блідо-зеленого кольору. Пустули не утворюються або формуються погано [26]. Хламідоспори мають кулясту або напівкулясту форму, термінальні або інтеркалярні, зі стромами діаметром 1,0–1,5 мм, гладкою поверхнею, поодинокими або агрегованими, легенькими,

майже круглими за контуром; аскоспори (довжина/ширина $4,3-4,4 \times 3,9 \times 4,0$ мкм) мають зелений колір [27].

В обраного штаму конідієносець утворюється міцелієм у вертикальному положенні, безбарвний, має до двох-трьох відгалужень, які утворюються приблизно під прямим кутом до конідієносця, стигма долеподібна, кінець головки конідієносця звужений, зігнутий, конідії мають гладеньку поверхню [7].

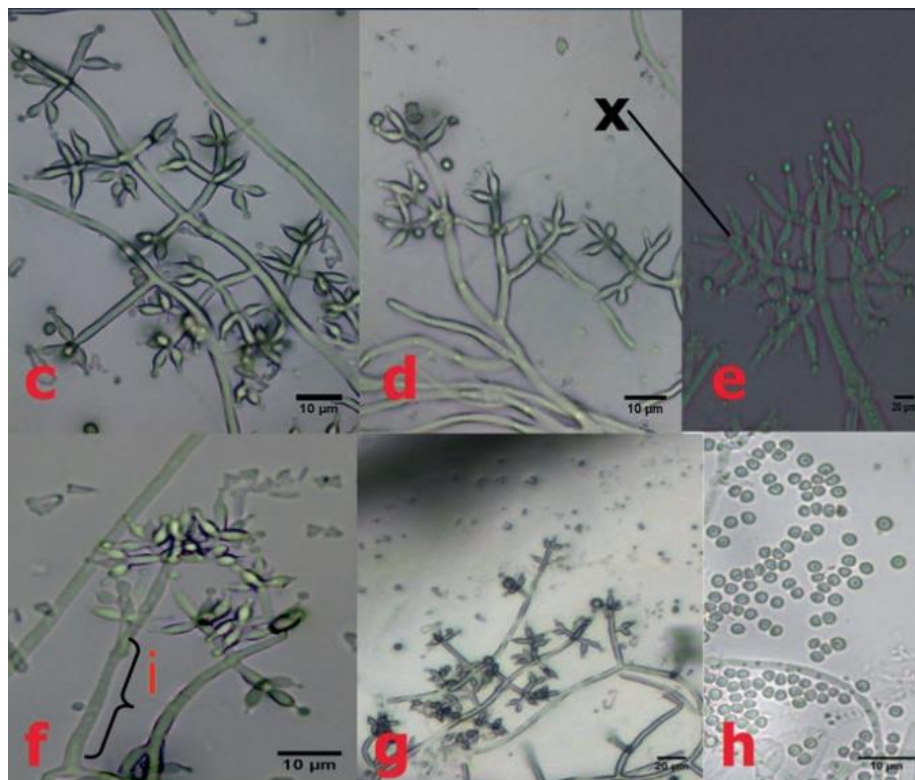


Рисунок 1.1 – Мікроморфологія *Trichoderma harzianum*: c-g, X – фіаліди; h – конідії; c-g, I – конідіофори [27]

Гриби-представники роду *Trichoderma* мають анаморфну (*Trichoderma*) та телеоморфну (*Hypocrea*) форми. Аски *Hypocrea* циліндричні, розмірами $65-75 \times 4-5$ мкм. *Hypocrea* утворюють 8 аскоспор з однією перетяжкою, що знаходяться в одній оболонці на ранніх етапах розвитку. Аскоспори розпадаються на дві округлі, яйцеподібні, витягнуті або клиноподібні аскоспори, часто не однакові формою, діаметром 3-4 мкм. Відповідно сумки містять 16 аскоспор.

Основний тип запасних поживних речовин клітин – глікоген (α -1,4-глюкан) [19].

1.4 Культуральні ознаки

Для *Trichoderma* характерний швидкий ріст, переважно яскравозеленими конідіями, конідієфорна структура багаторазово розгалужена [28].

Штами *Trichoderma harzianum* на твердих поживних середовищах (Чапека, сусло-агар) ростуть швидко та формують розпростерті колонії темно-зеленого або жовто-зеленого кольору. Колонії ізолятів *T. harzianum* зазвичай утворювали 1–2 концентричних кільця з утворенням зелених конідій у зрілих колоніях під час інкубації протягом 5 днів при 28 ± 2 °C на картопляно-декстрозному агарі. Було виявлено, що вони викликають інтенсивне забарвлення агару від жовтих до темно-коричневих пігментів у зрілих колоніях [26].

Штами гриба *Trichoderma harzianum* на твердому середовищі сусло-агар утворюють швидкозростаючі колонії. Міцелій гриба безбарвний, септований, розпростертий. На 4-5-ту добу росту з'являються дерновинки з конідієносцями, подушкоподібні, спочатку білі, з часом жовто-темно-зеленого кольору. Конідії округлі, гладенькі, дрібні, у світлі, що проходить, блідо-зелені, у масі – темні. Спорonoшення рясне, спорonoсні зони розташовані концентричними колами.

На агаризованому середовищі Чапека колонії *T. harzianum* швидко ростуть, але слабо спорonoсяться. Вегетативний міцелій майже непомітний. Зворотна сторона колоній безбарвна.

T. harzianum добре росте на середовищі Чапека, проте найкращий ріст спостерігається на сусло-агарі [29, 30].

На картопляно-декстрозному агарі спостерігається зниження інтенсивності росту, утворення повітряного міцелію та спорonoшення (рис. 1.2). Спочатку міцелій гладкий, водянистого білого кольору та розріджений, доки не утвориться лускоподібний повітряний міцелій. Конідіація переважно виділяється з пустулами, які зазвичай зливаються у великі нерегулярні маси з порошкоподібною поверхнею.

Іноді культура має слабкий солодкий кокосовий запах [26].

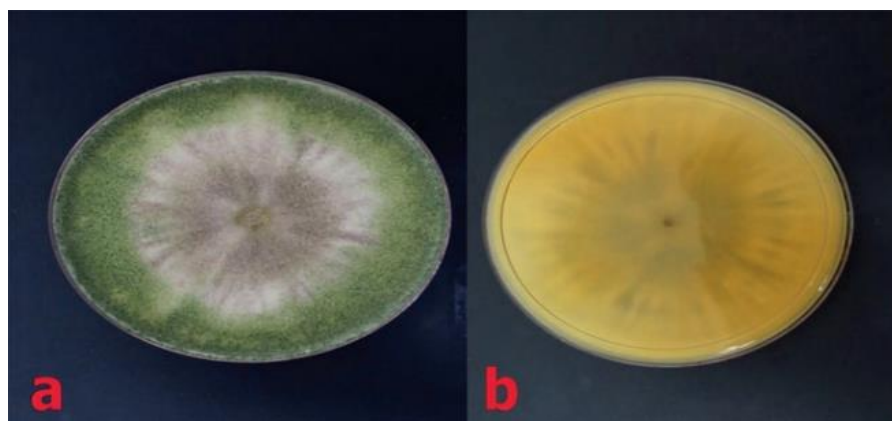


Рисунок 1.2 – *Trichoderma harzianum* на картопляно-дектрозному агарі (5-та доба) [26]

У глибинній культурі формуються кульки неправильної форми з численними виростами середнього розміру (гранули мікросклероцій та заглиблені конідії) [31]. Мікроміцет здатний також до плівкового росту на поверхні: конідії мікроорганізму розростаються по поверхні поживного середовища, формуючи міцелій



Рисунок 1.3 – Утворення мікросклероцій *T. harzianum* у глибинній культурі [31]

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Обраному продуценту характерний гетеротрофний тип живлення.

Як джерела вуглецевого живлення гриби роду *Trichoderma* можуть використовувати ряд вуглеводів: глюкозу, фруктозу, сахарозу, крохмаль; при використанні в якості джерела вуглецю лактози, карбоксиметилцелюлози та целюлози знижуються показники росту культури. У відповідності до інших досліджень, при виборі джерела вуглецю має місце видо- та штамоспецифічність. Більшість видів, порівняно із глюкозою, краще

засвоюють D-фруктозу, D-маннозу, D-галактозу, D-ксилозу, декстрин, іноді сахарозу та гліцерин, а гірше – L- і D-арабінозу, мальтозу, лактозу, D-мелізитоз, етанол, інозитол, D-глюкозоамін, розчинний крохмаль, інουλін, саліцин [32].

Азотне живлення здійснюється за змішаним типом, тобто гриби роду *Trichoderma* можуть використовувати як неорганічні джерела азоту, і органічні азотисті речовини [19]. Так, вважається, що на буферізованих середовищах з рН 4,2-4,3 в якості джерел азоту можуть використовуватися L-аланін, L-аспарагінова кислота, L-глутамінова кислота. У той же час D-аспаргінова кислота, L-гістидин та β -аланін у якості джерел азоту засвоюються гірше [32]. Штами деяких видів здатні засвоювати D-лейцин, D-валін [33].

Нітрит натрію чинить токсичну дію на культуру грибів *Trichoderma*. Помічено кращий ріст культури на середовищах, що містять іони амонію, ніж на таких, що містять нітрати. У якості неорганічного джерела азоту можуть застосовуватися сульфат амонію, нітрат амонію, нітрат натрію, хлорид амонію, фосфат амонію, нітрат калію, причому найкраще застосовувати нітрат амонію або сульфат амонію (останній, як вважається, є найбільш оптимальним варіантом для отримання найвищого виходу біомаси) [32, 33].

Для грибів роду *Trichoderma* було встановлено залежність між конідієутворенням і співвідношенням вуглецю та азоту C:N у складі поживного середовища. Для сахарози в концентрації 6 г/л максимальне конідієутворення спостерігалось при співвідношенні 160:1. Показано, що більш високі концентрації джерела вуглецю, а також менша різниця у співвідношенні C:N у *Trichoderma* збільшують вихід міцелію, а не конідій [32].

Штами *T. harzianum* в однаковому ступені засвоюють як амонійні, так і азотнокислі солі. Найкращим джерелом азоту з органічних сполук є пептон. Добре ростуть на середовищах з аспарагіном та глутаміновою кислотою. Найкращими джерелами вуглецю є ксилоза, глюкоза, сахароза, лактоза, галактоза, маніт, крохмаль. На середовищах із цими цукрами спостерігається інтенсивне зростання. Слабко засвоюються спирти метиловий, етиловий, дульцит.

Граничні значення температури та рН для обраного штаму не вказані, тому приймемо характеристики, спільні для ряду штамів. Штами мікроміцета *T. harzianum* ростуть при температурі від 4 до 35 °С, рН = 5–7,2. Оптимальне значення температури – 25±1 °С, оптимальний рівень рН для утворення спор – 4,0-6,0. Окремі штами розріджують агар та желатину, молоко не пептонізують. [34, 35].

По відношенню до кисню *T. harzianum* є аеробним грибом, основний тип енергетичного метаболізму – дихання. Згідно з літературними даними, деякі штами *T. harzianum* мають анаеробні (бродильні) шляхи метаболізму вуглеводів, серед яких зокрема спиртове бродіння. Анаеробні умови сильно обмежують або повністю зупиняють ріст *Trichoderma*, але не зупиняють їхню життєдіяльність; конідіація, спричинена старінням, не спостерігалася в анаеробних умовах і у присутності інгібіторів, які гальмують процес окисного фосфорилування [36].

Клітинна стінка представників роду *Trichoderma* містить в середньому 15-20% хітину і 25-30% β-1,3-глюкану в залежності від віку міцелію, причому різні частини міцелію можуть мати різну частку глюкану (клітинні стінки надземних гіф містять значно більшу частку глюкану, ніж вегетативний міцелій) [37]. Клітинна стінка спор деяких видів, наприклад, *T. viride* містить полімери, подібні до клітинної стінки міцелію, такі як бета-(1, 3)-, бета-(1, 6) глюкани та білок, але хітин, завжди присутній у міцелії, у спорах відсутній. Меланін замінює цей полімер у стінці спор *T. viride* і розташований у зовнішньому шарі. Спроби охарактеризувати пігмент стінки спори показують, що це неіндольний меланіноподібний поліфенол [38].

Гриби роду *Trichoderma* виробляють ряд літичних ферментів, серед яких зокрема:

1) целюлазний комплекс – комплекс ферментів целюлаз, що мають хімічну специфічність до 1,4-глікозидних зв'язків, які за механізмом дії поділяються на екзо- та ендоглюканази. Екзоглюканази, або целобіогідролази (1,4-β-D-глюкан целобіогідролаза, ЕС 3.2.1.91), відщеплюють целобіозу з кінця полісахаридного ланцюга, зазвичай мають високу активність по відношенню до

кристалічної целюлози. Ендоглюканази (EG) (1,4- β -D-глюкан-4-глюканогідролаза, ЕС 3.2.1.4) здійснюють розрив ланцюгу посередині, таким чином виробляючи нові кінці ланцюгів для дії целобіогідролаз. Ендоглюканази віддають перевагу аморфним ділянкам целюлози і, на відміну від целлобіогідролаза, здатні гідролізувати заміщену целюлозу, наприклад, карбоксиметилцеллюлозу і гідроксиметилцеллюлозу. β -глюкозидаза розщеплює целлобіоз та інші розчинні полісахариди до глюкози;

2) ксиланазний комплекс – комплекс ферментів, що гідролізують полімерні ланцюги ксиланів. Для повного гідролізу ксилану необхідно участь наступних ферментів: ендоксиланаза ЕС3.2.1.8, екзоксиланаза ЕС 3.2.1.37, β -D-ксилозидаза ЕС 3.2.1.37, α -L-арабінофуранізидаза ЕС 3.2.1.55 Штами роду *Trichoderma* є ефективними продуцентами різних типів гідролаз полісахаридів, включаючи ряд геміцелюлолітичних ферментів. Ці ензими гідролізують нецелюлозні рослинні полісахариди – геміцелюлози, які знаходяться в рослинній клітинній стінці в тісній взаємодії з целюлозою. *T. harzianum* є продуцентом ксиланаз з низькою молекулярною масою (ендо- α -1,4-ксиланази), ендо- β -1,4-глюканази;

3) глюканази – ферменти, що розщепляють глюкани (ендо- β -1,3-глюканази, ендо- β -1,6-глюканази);

4) протеази – ряд серин-, тіол-, карбоксил- метало-протеаз – амінопептидази, карбоксипептидази, ендогідролази. Добре вивчені аспартат- і серин-залежні протеази, серинові протеази, субтілізин-подібні протеази, лужні та нейтральні протеази;

5) хітинолітичні ферменти – цитолітичні штами *Trichoderma* є одними з найбільш ефективних агентів біологічного контролю захворювань рослин, а така активність на пряму пов'язана із здатністю цього роду до продукування ряду хітиназ. Усі ферменти, здатні до гідролізу хитину або хітоолігомерів, розривом 1,4- β -зв'язку N-ацетил- β -D-глюкозаміну визначені як хітинолітичні та диференційовані відповідно до кінцевих продуктів реакції. Ендохітиназа хаотично руйнує хитин і хітоолігомери і створює суміш розчинних

низькомолекулярних кінцевих продуктів різних розмірів. Основним кінцевим продуктом є діацетилхітобіоза, Хітин 1,4- β -хітобіозидаза (хітобіозидаза) – екзохітиназна активності, що розщеплює хітин і хітоолігомери з кінця, який не редукується, і звільняє одиничні (GlcNAc)₂. β -N-ацетилгексозамінідаза – фермент, що розщеплює хітоолігомери і хітин з кінцями, які не редукуються, і звільняє одиничні N-ацетилглюкозамінні мономери. Цей фермент здатний розщепити (GlcNAc)₂.

Trichoderma виробляють екзоцелюлярні ферменти (β -1,3-глюканаза (ЕС 3.2.1.39, ЕС 3.2.1.58), β -1,6- глюканази (ЕС 3.2.1.75), целюлази (ЕС 3.2.1.4; ЕС 3.2.1.21, ЕС 3.2.1.91), хітинази (ЕС 3.2.1.30, ЕС 3.2.1.52), протеази (ЕС 3.4.11; ЕС 3.4.13–19; ЕС 3.4.21–24, ЕС 3.4.99)) [19].

Мікроміцетам роду *Trichoderma* властиві три способи розмноження: статеве, безстатеве та вегетативне.

Trichoderma являє собою нестатеву стадію (анаморфу). Телеоморфа гриба представлена аскоміцетом *Hypocrea*. Статеве розмноження здійснюється шляхом запліднення архікарпа (диференційованої жіночої статевої клітини) антеридієм (чоловічою статевою клітиною) з наступним злиттям цитоплазми (цитогамією) та утворенням дикаріону (зходження ядер без злиття). Результатом запліднення є утворення аскогенних гіфів. У дикаріоні відбувається окремі процеси поділу та злиття ядер – каріогамія у сумці, що розвивається, після чого відбувається редукційний поділ.

Безстатеве розмноження забезпечується утворенням спеціалізованих органів із диференційованими спороносними клітинами. Триходермам притаманне екзогенне конідіальне спороношення. Конідії утворюються на конідієносцях, на останній у свою чергу формуються стеригми, фіаліди, що несуть конідії. Формування конідій починається із проростання кінця конідієносця, у результаті чого утворюється невеликий пагорб, який у подальшому відділяється поперечними перегородками, утвореними шляхом випирання цитоплазми. Дозріла конідія відпадає та слугує початком для нової особини.

Вегетативне розмноження здійснюється шляхом утворення хламідоспор – клітин гіфів з товстою оболонкою, зазвичай забарвлених [39].

Достеменно наявність плазмід не вважається родовою характеристикою *Trichoderma*, проте було встановлено наявність кільцевих мітохондріальних плазмід у деяких штамів *Trichoderma harzianum* [40]. Стійкість культури *T. harzianum* до антибіотиків не вивчалася.

Для забезпечення росту та збереження культури мікроміцетів *Trichoderma* часто використовуються тверді середовища – сусло-агар, середовище Чапека, агар із солодовим екстрактом. При довгостроковому зберіганні культуру утримують від 3 до 4 місяців на скошеному сусло-агарі (3–4° за Балінгом), рН 6,4–7,0, у холодильнику при +4 ... +6 °С, пересіви здійснюють через 10–12 місяців. У сублімаційно-висушеному стані культура зберігається за температури +3 ... +4 °С протягом кількох років [35].

Для ідентифікації, ізоляції та кількісного виділення грибів роду *Trichoderma* із природного середовища (грунту) було розроблене триходерма-селективне агаризоване середовище (TSM). Селективність забезпечується за допомогою хлорамфеніколу як бактеріального інгібітора та пентахлорнітробензолу, р-диметиламінобензолдіазосульфонату натрію та бенгальського рожевого як селективних грибкових інгібіторів. TSM також містить низьку концентрацію глюкози, яка забезпечує відносно швидкий ріст і спороношення *Trichoderma*, забезпечуючи зручну та швидку ідентифікацію колоній *Trichoderma*. Склад цього середовища (г/дм³ дистильованої води): MgSO₄×7 H₂O – 0,2; K₂HPO₄ – 0,9; KCl – 0,15; NH₄NO₃ – 1,0; глюкоза – 3,0; левоміцетин – 0,25; р-диметиламінобензолдіазосульфонат натрію 60% – 0,3; пентахлорнітробензол – 0,2; рожево-бенгальський (тетрахлортетрадіодофлуоресцеїн) – 0,15; агар – 20 [41].

1.6 Поширення в природі

Природним середовищем існування *Trichoderma harzianum* є ґрунт. Рід *Trichoderma* включає групу швидкозростаючих мікроміцетів, які є надзвичайно поширеними у сільськогосподарських, прерійних, лісових, солончакових і

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

пустельних ґрунтах у всіх кліматичних зонах. Вони особливо поширені у підстилці вологих змішаних листяних лісів і становлять спочатку незначний компонент мікробіоти, але згодом стають більш домінуючими у ґрунтовій мікрофлорі. Кількісні співвідношення конкретних видів зазвичай встановлюють аналізом розведень ґрунту. Кількість триходерм може становити до 3% від загальної кількості грибкових пропагул з широкого діапазону лісових ґрунтів і 1,5% грибів у ґрунтах пасовищ. Пошук потужних ферментів та організмів, що розкладають біомасу, призвів до ізоляції цих грибів з тіл тарганів, морських мідій та молюсків, а також кишківнику термітів.

Trichoderma є повсюдними колонізаторами целюлозних матеріалів, і тому їх часто можна знайти скрізь, де є рослинний матеріал, що розкладається, а також у ризосфері рослин, де вони можуть зумовлювати системну резистентність рослин до патогенів. Триходерми є вільноіснуючими сапрофітами, але можуть проявляти себе як умовно-патогенні симбіонти рослин і ефективні паразити, здатні паразитувати на інших грибах, а також конкурувати із різноманітними фітопатогенами [5, 42]. Телеоморфи *Hypocrea* часто можна знайти на деревині, на міцелії інших представників аскоміцетів, на живих базидіоміцетах, на їстівних грибах на різних стадіях гниття, рідше – на трав'яних субстратах [43].

Види *Trichoderma* вважаються опортуністичними авірулентними симбіонтами рослин. Ці гриби можуть вражати кілька перших шарів корневих волосків і стимулювати стійкість до атаки патогенів локально, у коренях, або віддалено. *Trichoderma harzianum* відноситься до видів, здатних індукувати стійкість рослин до грибкових паразитів шляхом мікопаразитизму, антибіозу і стимуляції росту рослини загалом [43].

Триходерми є природними антагоністами грибів-фітопаразитів – *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora citrophthora*, *Cladosporium cucumerinum* та ін. і чинять згубну дію на них за рахунок продукування антибіотичних речовин (харзіанові кислоти, аламетицини, трихолін, пептаїболи, антибіотики, 6-пентил- α -пірон, віридин,

гліовірин, глізопреніни, гептелідова кислота, трихополіни А і В, дикетопіперазини (гліотоксин), сесквітерпені, стероїди тощо) та літичних ферментів (1,3- β -глюканази, протеази, хітинази) [19]. Повідомляється про більш ніж 200 вторинних метаболітів грибів роду *Trichoderma*, частина з яких продемонстрували високу біологічну активність, у тому числі проти фітопатогенних агентів. Протипаразитична дія триходерм також пов'язана із різноманітними механізмами конкуренції. Так, порівняно з іншими представниками ґрунтової мікрофлори, гриби роду *Trichoderma* володіють конкурентною перевагою, пов'язаною із розвиненою здатністю до мобілізації та поглинання поживних речовин та мікроелементів із ґрунту [44].

Антифунгальна, антимікробна та рістстимулююча дія метаболітів *T. harzianum* обумовлює можливості та перспективність використання цього мікроміцета в якості основи біопрепаратів для захисту рослин від ряду інфекційних захворювань для біоконтролю розповсюдження фітопатогенів.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 25
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика цільового продукту

Цільовий продукт є препаратом для захисту рослин на основі гриба *Trichoderma*, який являє собою рідину, що містить спори та міцелій гриба *Trichoderma harzianum* MSB1211 у поживному середовищі, у якому відбувалося культивування. Біопрепарат призначений для захисту рослин від захворювань, викликаних збудниками, що мають грибкове походження, та проявляє протигрибкову дію за рахунок синтезу обраним біологічним агентом літичних ферментів, антибіотичних сполук, які чинять згубну дію на патогенні форми, а також інших метаболітів, які забезпечують конкуренцію гриба роду *Trichoderma* з грибовими фітопатогенами.

Фунгіцидна дія препарату забезпечується комплексами літичних ферментів та рядом антибіотичних речовин, що виробляються біологічним агентом.

Мікроміцетам *Trichoderma* властивий широкий спектр метаболітів, серед яких виділяють наступні класи:

- 1) Фактори росту – ауксини, цитокініни.
- 2) Фітогормони типу індолілу оцтової кислоти та етилену, цитокінінподібні молекули, наприклад, зеатин і гіберилін або зв'язаний гіберилін.
- 3) Органічні кислоти типу глюконової, лимонної чи фумарової кислот. Ці органічні кислоти утворюються при метаболізмі вуглецевмісних сполук, головним чином, глюкози.
- 4) Внутрішньоклітинні амінокислоти – серин, лізин, гістидин, теонін, тирозин, валін, аспарагінова та глютамінова кислоти, аргінін, аспарагін, ізовалін та інші.
- 5) Вітаміни – тіамін, біотин, піридоксин, інозит та інші.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Архувів
Розроб.	Корачева А.О.					Д	26	143
Конс.	Шидецький В.Ю.							
Керівн.	Сироїд О.О.							
Затв.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92		

6) Антибіотичні сполуки:

Відомо більше сотні антибіотиків, які продукуються триходермами та виявляють протимікробну активність. Серед цих метаболітів виявлені різноманітні групи хімічних сполук – харзіанові кислоти, аламетицини, трихолін, пептаїболи, 6-пентил- α -пірон, віридин, гліовірин, глізопреніни, гептелідова кислота, дикетопіперазини, сесквітерпені, стероїди, полікетиди (харзінолід у культурі *T. harzianum*) та інші [19].

Алкілпірони – до цього класу сполук відносяться 6-пентил-пірон (6-PP), алкіл-6-дельта лактони.

Пірон 6-пентил-2H-піран-2-он (6PP) – органічна сполука-ароматизатор, що є відповідальною за характерний аромат кокосу, яким володіє культура *T. harzianum*. Ця сполука належить до хімічно різноманітної групи метаболітів низькомолекулярної структури (являє собою ненасичену молекулу лактону), має високий тиск пари за кімнатної температури і відноситься до групи летких органічних сполук (ЛОС) - метаболітів триходерм. Молекула містить два подвійні зв'язки в кільці та пентилловий замісник при вуглеці, суміжному з киснем кільця. Володіє фунгістатичною дією та рістстимулюючою активністю по відношенню до рослин [19, 45, 46]. Ця сполука була виявлена у культуральному середовищі *Trichoderma* та має наступну структуру (рис. 2.1):

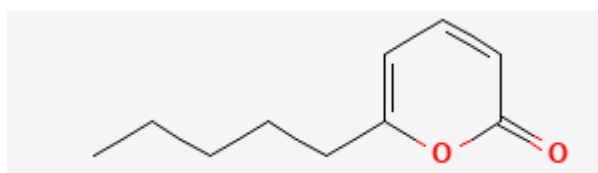


Рисунок 2.1 – Структура протигрибкового пірону 6PP, виділеного з мікроміцету *Trichoderma* [47]

6PP має протигрибкову дію, оскільки зменшує ріст міцелію фітопатогенів, таких як *B. cinerea*, *R. solani* та *F. oxysporum*, а також регулює ріст рослин і стимулює системний захист, можливо, діючи як ауксиноподібна сполука [48].

Ізонітрили – група хімічних сполук з функціональною групою $-N^+\equiv C^-$. Із культур грибів роду *Trichoderma*, було виділено такі сполуки цієї групи, як ізонітрини А, В, С, D (рис. 2.2) та ізонітрилові кислоти Е та F (рис. 2.3) [19].

Ізонітрин С також носить назву триховіридин та є ізонітрильним антибіотиком із незвичайним високофункціональним циклопентановим кільцем, яке містить два реакційноздатні епоксидні замісники [49].

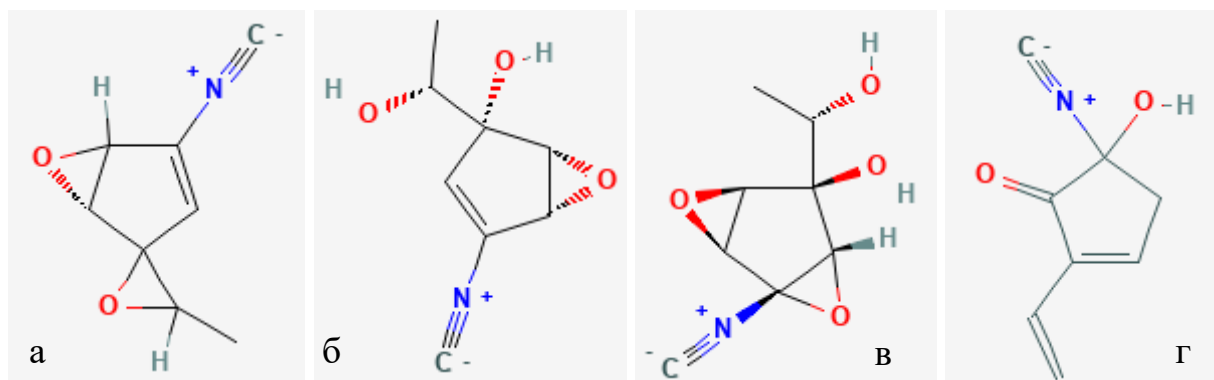


Рисунок 2.2 – структурні формули ізонітринів:

а) ізонітрин А; б) ізонітрин В; в) ізонітрин С (триховіридин); г) ізонітрин D [50, 51, 52, 53]

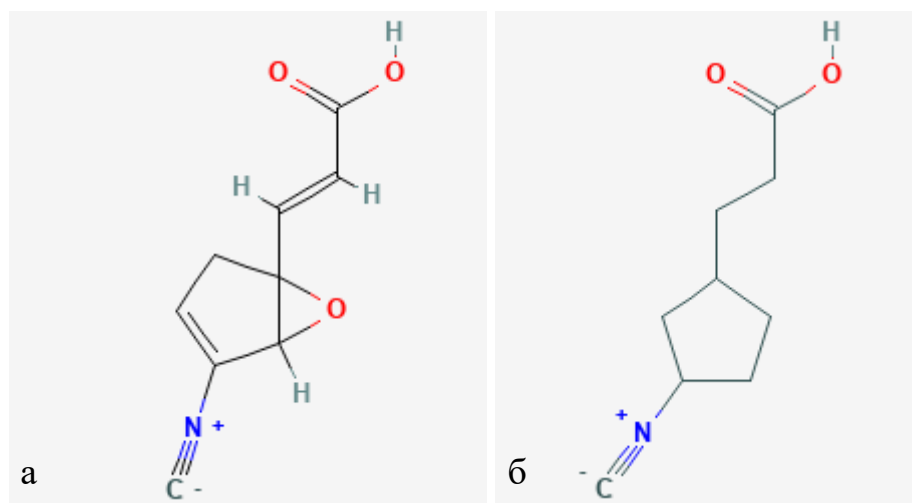


Рисунок 2.3 – Ізонітринолові кислоти:

а) ізонітрилова кислота Е; б) ізонітрилова кислота F [54, 55]

Пептаїболи – клас біологічно активних пептидів. Пептаїболи отримали свою назву через свою структуру – це лінійні пептиди з високою кількістю непротеїногенної α -аміноізомасляної кислоти (амінокислоти Aib) разом з іншими незвичайними амінокислотами, такими як етилнорвалін, ізовалін і гідроксипролін, N-кінець ацетильований, а C-кінцева амінокислота

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

28

гідроксильована до кислого спирту. Ці пептиди належать до більшої групи пептаїбіотиків, які характеризуються наявністю 5–21 амінокислотних залишків, молекулярною масою від 500 до 2200 Да [56, 57].

З культури *Trichoderma* було виділено антибіотик аламетицин F30, який був першою відкритою сполукою групи пептаїболів. Аламетицин є пептидним антибіотиком. Належить до пептаїболових пептидів, які містять непротеїногенний амінокислотний залишок α -аміноізомасляної кислоти. Цей залишок індукує утворення альфа-спіральної структури (рис. 2.4). У клітинних мембранах є каналоутворюючим іонофором і утворює залежні від напруги іонні канали шляхом агрегації чотирьох-шести молекул [58].

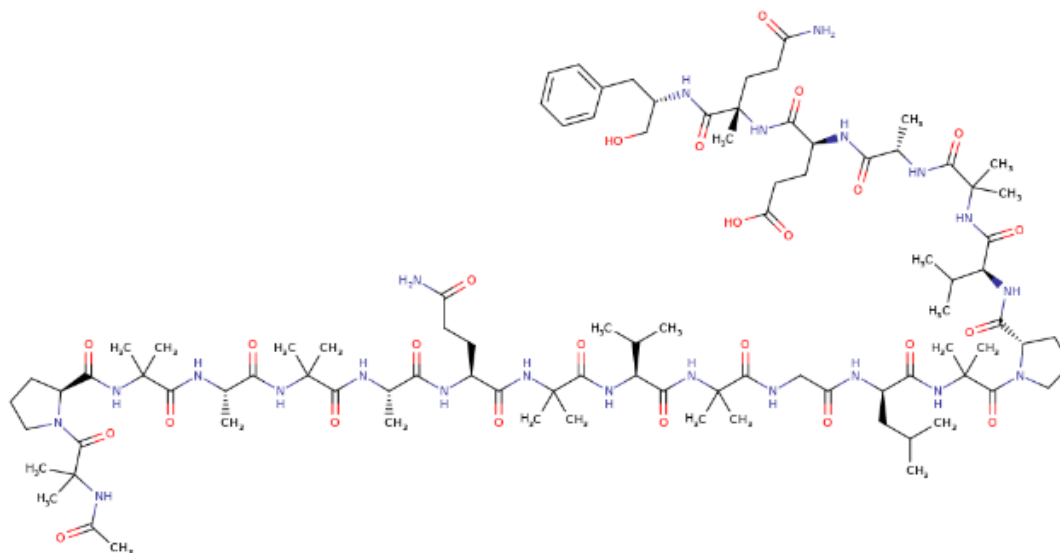


Рисунок 2.4 – Структурна формула антибіотику аламетицину F30 [58]

Повідомлялося також про інші сполуки з цієї групи – антибіотики пептайвірини А і В (рис. 2.5), що проявляли противірусну активність по відношенню до збудника інфекції тютюнової мозаїки [45].

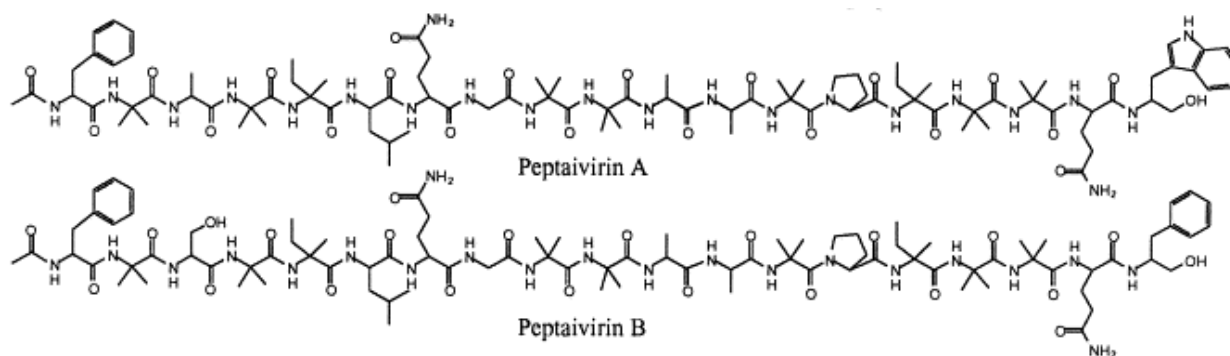


Рисунок 2.5 – Структурні формули пептайвіринів А і В [59]

Дикетопіперазини – похідні 2,5-дікетопіперазину (піперазин-2,5-діону) (рис. 2.6), органічної сполуки, що має шестичленне кільце, яке містить дві амідні групи в протилежних положеннях у кільці [60]. Дикетопіперазини мають загальну формулу $(\text{NHCH}_2(\text{R})\text{C}(\text{O}))_2$ [61]. До цієї групи сполук належать антибіотики гліотоксин – (Q тип – *Trichoderma*) та гліовірин – споріднена сполука до гліотоксину (P – тип *Trichoderma*) [19].

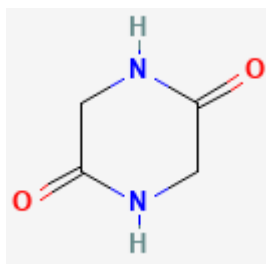


Рисунок 2.6 – Структурна формула 2,5-дикетопіперазину [62]

Гліотоксин – сірковмісне похідне 2,5-дикетопіперазину, містить дикетопіперазин із ді- або полісульфідним зв'язком (рис. 2.7) [63]. Нестійкий на світлі, володіє широким спектром антибіотичної активності по відношенню до грампозитивних бактерій, фітопатогенів, патогенів грибкового походження [19].

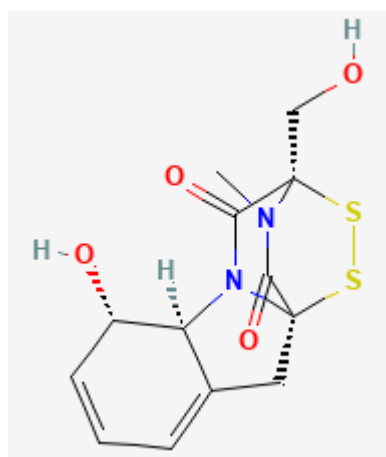


Рисунок 2.7 – Структурна формула гліотоксину [64]

Сесквітерпени – хімічні речовини класу терпенів, які виконують захисну функцію у клітинах *Trichoderma*. Складаються з трьох ізопренових ланок і часто мають молекулярну формулу $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$. Можуть бути циклічними або містити кільця, включаючи багато унікальних комбінацій. Біохімічні модифікації, такі як окиснення або перегрупування, утворюють відповідні

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

30

сесквітерпеноїди [65]. З метаболітів, виділених з культур представників роду *Trichoderma*, до цього класу відноситься гептелідова кислота.

Гептелідова (конінгова) кислота – сесквітерпен, який є потужним, селективним, необоротним інгібітором гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) та селективним конкурентним інгібітором ДНК-полімерази [66].

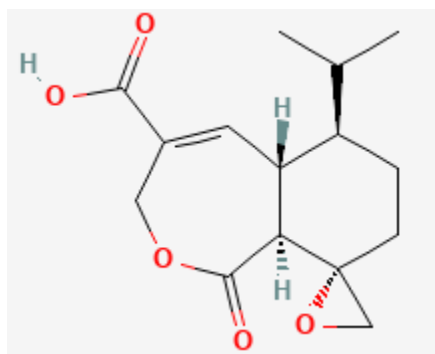


Рисунок 2.8 – Структурна формула гептелідової кислоти [67]

Стероїди – сімейство поліциклічних біологічно активних органічних сполук, які мають чотири кільця, розташованих у певній молекулярній конфігурації. Зазвичай ядро стероїду складається з сімнадцяти атомів вуглецю, з'єднаних у чотири кільця: три шестичленні циклогексанові кільця та одне п'ятичленне циклопентанове кільце. Стероїди різняться за функціональними групами та ступенем окиснення кілець [68]. Стероїдну природу має ряд антибіотиків віридинів, що виробляються представниками роду *Trichoderma*. Вперше віридин виділений з культури *T. viride* [19].

Віридин – протигрибковий метаболіт, який належить до класу фураностероїдів, має характерне електрофільне фуранове кільце, злисте між С-4 і С-6 стероїдного каркасу (рис. 2.9) [69].

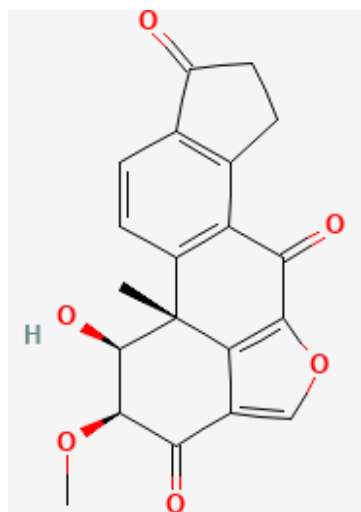


Рисунок 2.9 – Структурна формула вірідину [70]

До основних сполук, відповідальних за фунгіцидну дію біопрепарату на основі *T. harzianum*, також відносяться ферменти груп хітиназ та глюканаз [19].

Хітинази – гідролітичні ферменти, що забезпечують розщеплення глікозидних зв'язків у хітині [71].

Хітиназа ЕС 3.2.1.30 β -D-ацетилглюкозамінідаза (за сучасною класифікацією – 3.2.1.52 β -N-ацетилгексозамінідаза) відноситься до глікозидаз, тобто ферментів, які гідролізують O- та S- глікозильні сполуки, та бере участь у гідролізі кінцевого N-ацетил-D- залишку гексозаміну в N-ацетил- β -D-гексозамінідах. Діє на N-ацетилглюкозиди і N-ацетилгалактозиди у шляху розкладу глікозаміногліканів [72, 73].

Глюканази – ферменти класу гідролаз, які розщеплюють великі полісахариди шляхом гідролізу. Продуктом реакції є глюкан – лінійний полісахарид, що складається з до 1200 мономерів глюкози, з'єднаних глікозидними зв'язками. Вторинна та третинна структури β -глюканаз утворюються укладанням кількох β -структур, кожна з яких складається з кількох антипаралельних ниток, які згинаються та утворюють щілину, що перетинає активний центр ферменту [74, 75].

Глюканаза ЕС 3.2.1.39 глюкан 1,3- β -D-глюкозидаза (ендо-1,3- β -глюканаза) відноситься до класу глікозилаз – ферментів, які гідролізують O- і S-глікозильні сполуки. Цей фермент каталізує гідроліз (1,3)- β -D-глюкозидних зв'язків у (1,3)- β -D-глюканах [76, 77].

Глюканаза ЕС 3.2.1.58 глюкан 1,3-β-D-глюкозидаза (екзо-1,3-β-D-глюкозидаза), що також належить до класу глікозилаз, каталізує послідовний гідроліз одиниць β-D-глюкози з невідновлюючих кінців (1,3)-β-D-глюканів, який супроводжується вивільненням α-глюкози [78].

2.2 Схема хімічних перетворень,

Цільовим продуктом виробництва є біомаса (міцелій та спори *Trichoderma harzianum* MSB1211).

Основоположним процесом, який забезпечує життєдіяльність культури, є метаболізм вуглеводів. Виробниче культивування гриба здійснюється в аеробних умовах. *T. harzianum* є аеробним грибом, відповідно в умовах нарощування біомаси шляхом метаболізму вуглеводів є гліколіз із наступним циклом трикарбонових кислот, який відбувається за схемою (рис. 2.10):

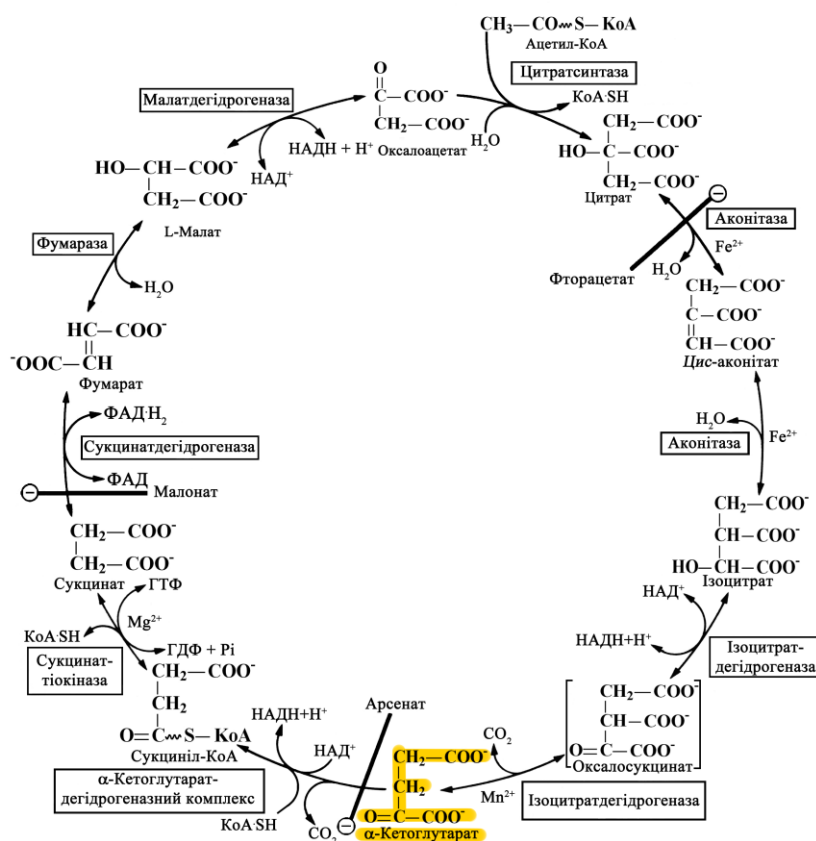


Рисунок 2.10 – Цикл трикарбонових кислот [79]

Проміжні метаболіти циклу трикарбонових кислот можуть піддаватися іншим перетворенням.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

33

Як для представника аскоміцетів, для мікроміцета *Trichoderma harzianum* властиві наступні особливості метаболізму:

1) біосинтез лізину відбувається ААА-шляхом (рис. 2.11) [80]:

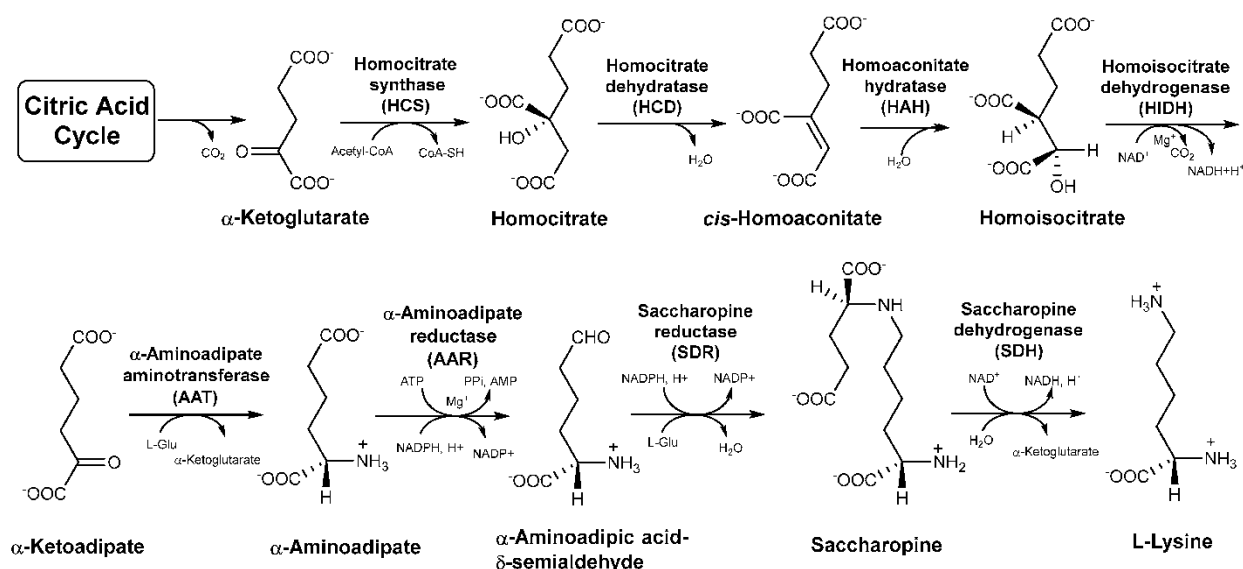


Рисунок 2.11 – α -аміноадипатний (ААА) шлях біосинтезу лізину у вищих грибів [81]

Лізін синтезується з α -аміноадипінової кислоти, утворення якої у свою чергу відбувається через ряд послідовних перетворень α -кетоглутарової кислоти, утвореної у циклі трикарбонових кислот (виділена на рис. 2.10 жовтим кольором).

2) біосинтез триптофану здійснюється мультиферментним комплексом I (1a) [80].

Утворення вторинних метаболітів *Trichoderma harzianum*, зокрема антибіотичних сполук, що забезпечують протипаразитичну дію біопрепарату, відбувається декількома шляхами.

Так, відомо, що пірон 6-пентил-2Н-піран-2-он (6PP) синтезуються з лінолевої кислоти за допомогою процесів відновлення, β -окиснення та ізомеризації (рис. 2.12). Вони можуть перебігати завдяки каталітичній активності різних систем полікетидсинтез (ПКС), а кінцеве утворення кільця, що містить піроновий фрагмент, може відбуватися різними шляхами. Для біосинтезу 6PP запропоновано різні механізми [82].

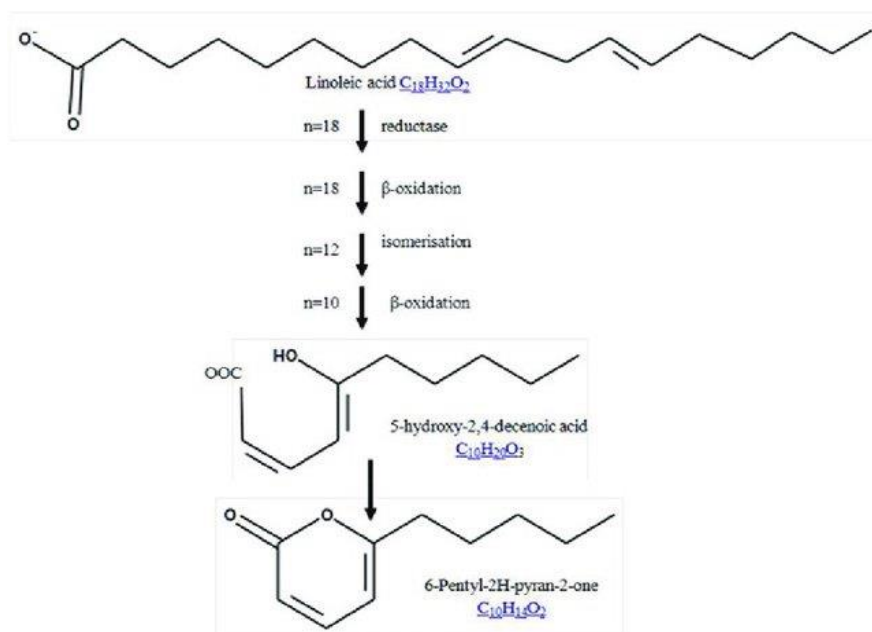


Рисунок 2.12 – Шлях біосинтезу 6-пентил-2Н-піран-2-ону з лінолевої кислоти [82]

Біосинтез ізонітрилів може відбуватися через шикіматний шлях – спеціалізований шлях біосинтезу ароматичних та ряду неароматичних сполук. Через ряд реакцій ароматичні продукти шикіматного шляху втрачають свою ароматичність. Наприклад, дієн-ізоціанідний антибіотик, попередником якого є тирозин, синтезується наступним шляхом (рис. 2.13):

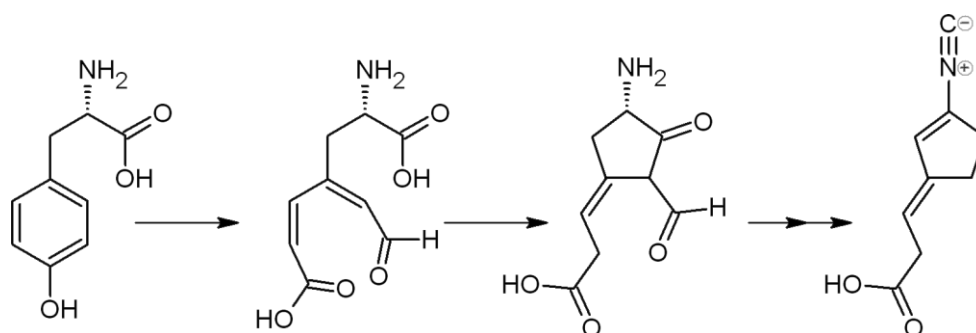


Рисунок 2.13 – Біосинтез ізонітрилової сполуки 3-(3'-ізоциклопент-2-етиліден)пропіонової кислоти

L-тирозин розщеплюється до 3-(3'-ізоциклопент-2-етиліден) пропіонової кислоти, що має Z-конфігурацію щодо екзоциклічного подвійного зв'язку, шляхом розщеплення ароматичного кільця та циклізації бічного ланцюга амінокислоти [83]. Повідомлялося про ряд наявних у аскоміцетів спеціалізованих ферментів – ізоціанідсинтаз [84].

Біосинтез антибіотиків пептидної природи здійснюється за допомогою нерибосомних пептидсинтаз [19, 85].

Біосинтез аламетицину ініціюється на синтетазі шляхом ацетилювання аміноізомасляної кислоти, зв'язаної з тіолестеролом, яка залишається зв'язаною з ферментом. Ацетил-КоА слугує донором ацетату. Зі складових аламетицину гліцин, аланін і валін також ацетилюються при інкубації поодиночці. Це ацетилювання запобігається додаванням аміномасляної кислоти, що вказує на те, що ділянка аламетицинсинтетази, яка каталізує ацетилювання, надає перевагу аміномасляній кислоті. Утворення аламетицину на синтетазі завершується приєднанням фенілаланінолу до карбоксильного кінця пептиду. Як побічний продукт ряду реакції також було виділено аміноспирт, проте малоймовірно, що він є продуктом деградації аламетицину або що він відщепився від синтетазного комплексу. Скоріш за все, він є продуктом реакції окремої ферментної системи [86].

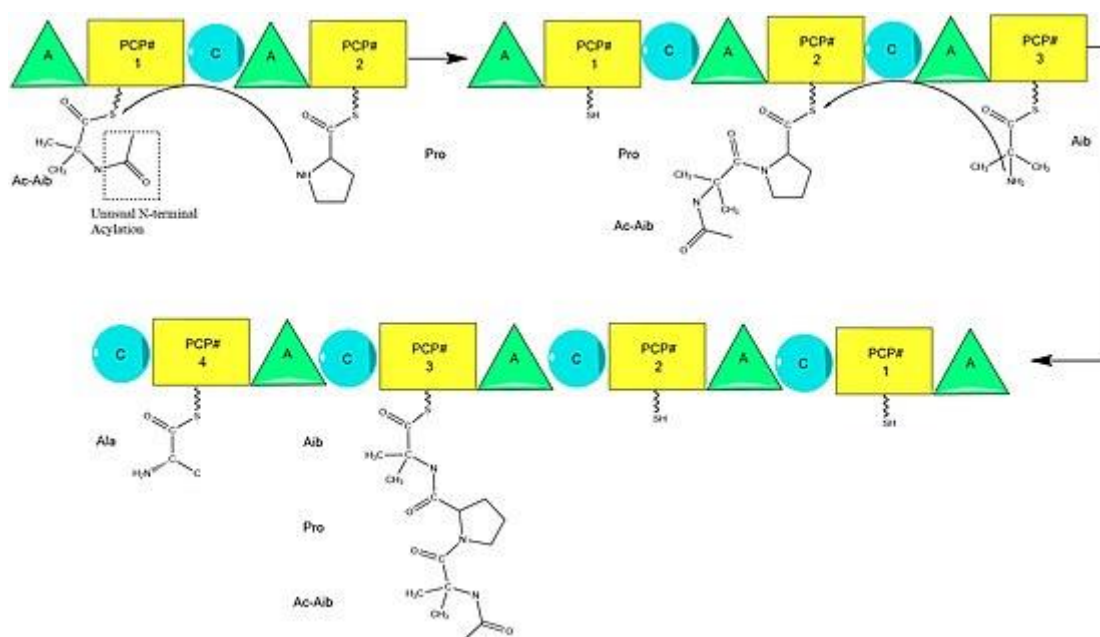


Рисунок 2.14 – Загальний механізм синтезу аламетицину, що демонструє конденсацію амінокислотних субстратів від модуля до модуля. Ас=ацетил Aib=аміноізомасляна кислота. Компоненти модуля: А = аденілілювання РСР = білок-носії пептиду С = конденсація [87]

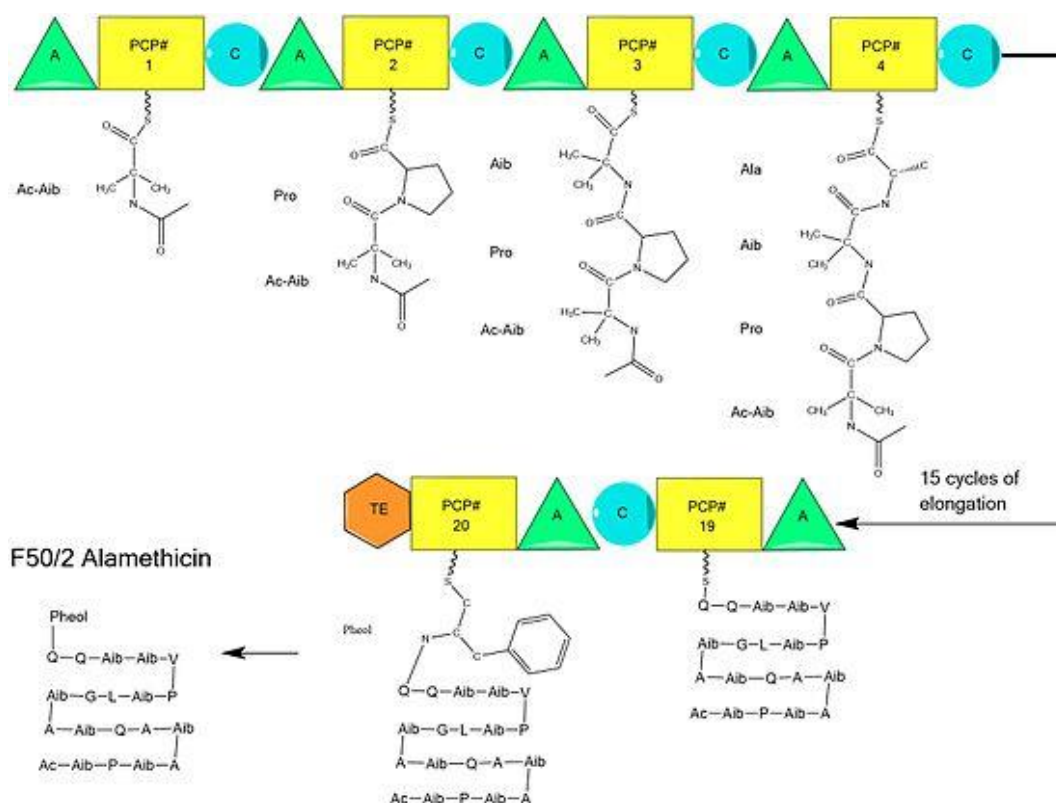


Рисунок 2.15 – Діаграма окремих модулів і подовження молекули аламетицину. Зростаючий пептидний ланцюг показаний для кожного модуля, що закінчується розщепленням тіоефіру та утворенням лінійного аламетицину. Ас=Ацетил Аіб=Аміноізомасляна кислота Феол=Фенілаланінол.

Компоненти модуля: А=Аденіліляція РСР=Пептидильний білок-носі
С=Конденсація [87, 88]

Біосинтез гліотоксину включає приєднання двох молекул кон'югатів глутатіону GSH та їх послідовне розкладання з утворенням двох реакційноздатних тіолових груп (рис. 2.16). Деградація фрагментів GSH вимагає активності Цис-Глі карбоксипептидази GliJ. Фермент утворює гомодимер, причому кожен мономер містить один активний центр. Два іони металів прибувають на протеолітичний центр, таким чином відносячи GliJ до різноманітної родини двоядерних металогідролаз. Залежно від наявності іонів Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} або Ni^{2+} , вони можуть відігравати роль кофакторів. Два розщеплювані пептидні зв'язки однієї молекули-попередника гліотоксину гідролізуються послідовно та в заданому порядку. [89].

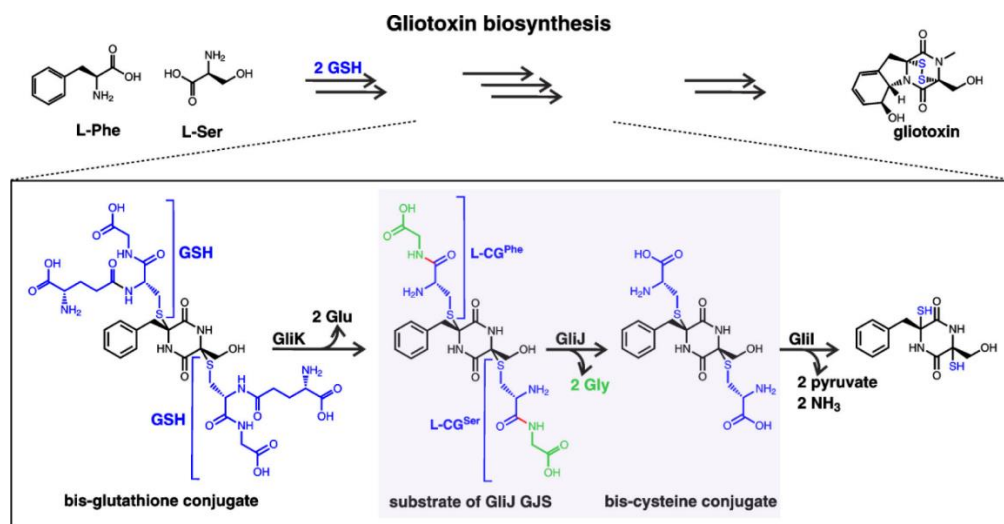


Рисунок 2.16 – Біосинтез гліотоксину [89]

Сесквітерпени побудовані з п'ятиуглецевих ізопренових одиниць і представляють клас C₁₅. Фактично, основною структурною одиницею всіх терпенів є ізопентенілдифосфат (IPP) та диметилалілдифосфат (DMAPP). У грибах IPP і DMAPP синтезуються за допомогою мевалонової кислоти (MVA). Шлях MVA починається з поєднання трьох одиниць ацетил-коензиму А за участі ферменту гідрокси-метилглутарил-КоА-редуктази (HMGR) з утворенням шестивуглецевої мевалонової кислоти, яка перетворюється на п'ятиуглецевий IPP через низку процесів, таких як фосфорилювання, декарбоксилювання та дегідратація. Ізомеризація IPP може призвести до утворення DMAPP [48, 82].

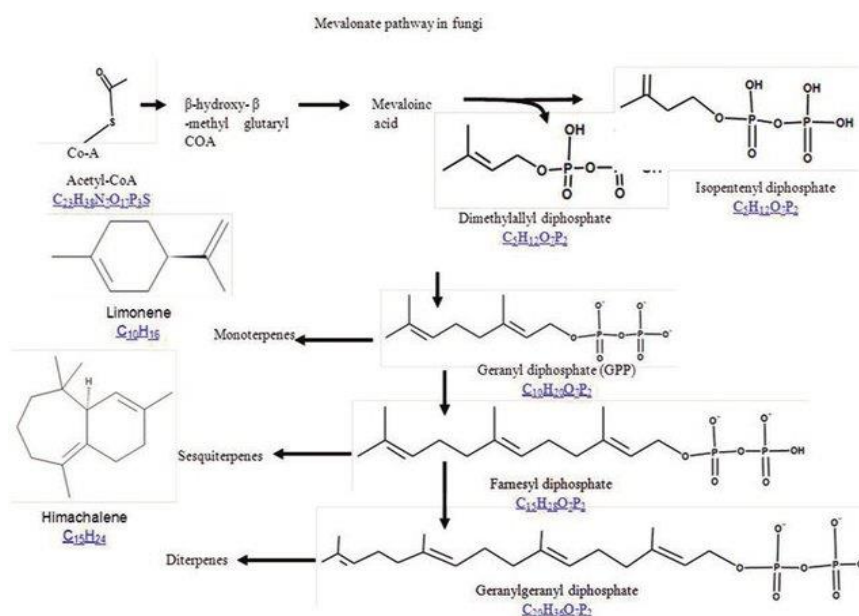


Рисунок 2.17 – Шлях біосинтезу терпенів у грибів [82]

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

38

Повний механізм біосинтезу віридину невідомий. Проте було встановлено, що віридин синтезується з тритерпеноїдного шляху, який починається зі сквалену (рис. 2.18) [90]. Описано включення ланостеролу у віридин. [91]. Хоча механізми та порядок решти етапів від ланостеролу до віридину невідомі, вони включають утворення фуранового кільця, втрату С-13 і С-14 метильних груп, ароматизацію С-кільця, видалення сторони ланцюг і окиснення А-кільця. Втрата атома водню з С-15 під час видалення метильної групи С-14 свідчить про шлях, подібний до біосинтезу інших стероїдів. Метильна група С-14 втрачається у вигляді мурашиної кислоти під дією стерол-14-деметилази. Хоча метильна група С-13 не видаляється на шляху альдостерону, можливо, що віридин піддається окисненню на С-18 з подальшою втратою мурашиної кислоти або декарбоксилюванням для видалення метилу С-13. «Додатковий» вуглець у фурановому кільці в С-4 походить із 3'-положення мевалонової кислоти та представляє С-4β-метильну групу ланостеролу [90, 92]. На субстратах з низьким вмістом азоту у деяких видів *Trichoderma* кінцевим продуктом біосинтезу є стерол віридіол [19].

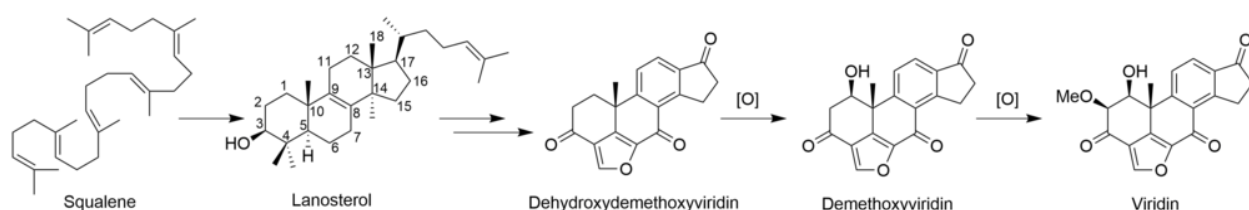


Рисунок 2.18 – Шлях біосинтезу віридину [90]

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

Готовий продукт являє собою рідину або концентрат суспензії, що містить міцелій та спори гриба *Trichoderma harzianum* MSB1211 та поживне середовище, у якому вирощувалася культура при виробничому культивуванні, число життєздатних ефективних організмів 1×10^9 КУО/см³ (допускається не менше 1×10^7 КУО/см³). Наявність домішок та сторонніх мікроорганізмів не допускається.

2.4 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Рід *Trichoderma* включає велику кількість штамів грибів, які діють як агенти біологічного контролю, антагоністичні властивості яких засновані на активації різних механізмів.

Штами *Trichoderma* здійснюють біоконтроль проти грибкових фітопатогенів або опосередковано, конкуруючи за поживні речовини та простір, змінюючи умови навколишнього середовища, або сприяючи росту рослин, захисним механізмам рослин і антибіозу, або безпосередньо, за допомогою таких механізмів, як мікопаразитизм. Ці непрямі та прямі механізми можуть діяти узгоджено, і їх важливість у процесі біоконтролю залежить від штаму *Trichoderma*, антагоністичного гриба, культурної рослини та умов навколишнього середовища, включаючи доступність поживних речовин, рН, температуру та концентрацію заліза. Активація кожного механізму передбачає синтез специфічних сполук і метаболітів, таких як фактори росту рослин, гідролітичні ферменти, сидерофори, антибіотики, пермеази вуглецю та азоту [93].

Представники роду *Trichoderma* використовують різноманітні стратегії для біологічного контролю поширення патогенів рослин. Ключовими стратегіями є паразитизм, конкуренція та антибіоз. Окрім цього, триходерми здатні індукувати стійкість рослин до патогенів.

Щонайменше 75 видів *Hypocrea/Trichoderma*, включаючи *T. harzianum*, володіють мікопаразитарною здатністю атакувати патогенні гриби рослин, такі як *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, види *Pythium* і *Fusarium* і лізувати їхні клітини. Мікопаразитизм проявляється через здатність представників роду *Trichoderma* безпосередньо атакувати гриби інших видів і використовувати їх як джерело живлення. Цей складний процес складається з кількох етапів. Процесу антагонізму передують хемотропізм (тропічний ріст мікроміцета *Trichoderma*) і специфічне розпізнавання шляхом зв'язування вуглеводів клітинної стінки *Trichoderma* з цільовими лектинами грибів. Після розпізнавання гіфа *Trichoderma*

прикріплюється до гіфи хазяїна та ініціює інвазію, утворюючи апресорії, які містять значну кількість осмотично активних сполук, таких як гліцерин, та запускають пенетрацію, з подальшою атакою клітинного апарату мішені шляхом секреції глюканаз, хітиназ і протеаз, які лізують клітинну стінку господаря. Також це явище включає секрецію метаболітів антибіотиків, що призводить до знешкодження та знищення збудника. Механізм дії включає вивільнення атпенінів, потужних і специфічних інгібіторів метаболізму мітохондрій у паразита. Іншим важливим ефектом триходерм як агентів біоконтролю є здатність інгібувати та розкласти пектинази та інші ферменти патогенів, необхідні для колонізації рослинних тканин. При встановленні мікопаразитарної активності *Trichoderma* було також виявлено синергічні ефекти між ферментами (ендохітиназа) та вторинними метаболітами (гліотоксином) [94, 95].

Обмеженість поживних речовин і мікро- та макроелементів у середовищі призводить до формування конкурентних взаємовідносин триходерми з іншими мікрорісницями. У природі види триходерми конкурують із фітопатогенами за поживні речовини, біологічні ніші або місця зараження в ризосфері рослин. Порівняно з іншими представниками ризосферної мікрофлори, гриби роду *Trichoderma* володіють конкурентною перевагою, пов'язаною з розвиненою здатністю до мобілізації та поглинання поживних речовин із ґрунту [94].

За рахунок синтезу сидерофорів (в якості них виступає харзіанова кислота) *T. harzianum* має ефективний механізм поглинання нерозчинного заліза з ґрунту. Крім допомоги рослинам у засвоєнні іонів заліза, гриби роду *Trichoderma* перешкоджають засвоєнню цього елемента фітопатогенами шляхом хелатування [94, 95].

Ще однією конкурентною перевагою грибів роду *Trichoderma* є їхня здатність знижувати рН ґрунту за рахунок секреції органічних кислот, таких як глюконова, лимонна і фумарова. Це сприяє ефективній мобілізації фосфатів, іонів заліза, марганцю та магнію.

Антибіоз – це процес, за якого водорозчинні низькомолекулярні сполуки пригнічують ріст інших мікроорганізмів, чинячи на них летальну або інгібуючу дію. Явище антибіозу пов'язане зі здатністю до синтезу вторинних метаболітів. Залежно від біосинтетичного походження, вторинні метаболіти триходерми поділяють на такі основні групи: пептаїболи, полікетіди та терпени (зазначено у попередніх пунктах розділу) [94].

Антибіоз виникає внаслідок взаємодії з низькомолекулярними речовинами або антибіотиками, виробленими *Trichoderma*, які запобігають росту інших мікроорганізмів. Більшість штамів *Trichoderma* синтезують мінливі та енергонезалежні токсичні метаболіти, які перешкоджають колонізації інших мікроорганізмів [19].

Одними з найбільш вивчених антимікробних речовин триходерми є пептаїболи. За рахунок своєї амфіпатичної природи пептаїболи здатні утворювати в мембранах потенціалзалежні іонні канали [94]. Антимікробну дію пептаїболів, окрім формування каналів, можна пояснити їхньою інгібіторною дією на пов'язані з мембраною ферменти, що беруть участь у синтезі клітинної стінки. Аламетицин індукує утворення пор у плазматичній мембрані, внутрішній мітохондріальній мембрані та внутрішній оболонці пластид рослинних клітин [48]. Пептаїболи сприяють антагонізму рослинних патогенів, пригнічуючи їхню β -глюкансинтазну активність, яка, завдяки синергізму з ферментами, що виділяються *Trichoderma* та руйнують клітинну стінку, сприяє «нападу на здобич», запобігаючи реконструкції клітинної стінки патогенів [56].

У ризосфері між рослинами та асоційованими з ними мікроорганізмами відбувається комунікація через обмін і сприйняття «сигналів». Обмін сигнальними молекулами між рослинами та *Trichoderma* складний і недостатньо охарактеризований. Останні дослідження демонструють, що на ранніх стадіях взаємодії ауксиноподібні метаболіти та білкові сполуки, що вивільняються *Trichoderma*, сприймаються корінням рослин, змінюючи численні гормональні механізми, які контролюють ріст і розвиток рослин у «нормальних» або стресових умовах. Отже, коли коренева система

колонізована триходермами, асоціація потенціюється, забезпечуючи захист у цій зоні від патогенних мікроорганізмів, а сама коренева система зміцнюється, покращується поглинання поживних речовин і води. *Trichoderma* колонізує коріння одно- та дводольних рослин, що може призвести до значних змін у метаболізмі рослин, зміни вмісту гормонів, розчинних цукрів, фенольних сполук та амінокислот; швидкість фотосинтезу; транспірації; вмісті води [95].

Штами *Trichoderma* здатні колонізувати як локальні сайти на коренях, так і всі кореневі поверхні в разі ризосферокомпетентних штамів. Іноді це нагадує морфологічний мікопаразитизм: гіфи проникають через епідерміс корневих клітин. Інвазія штамів *Trichoderma* у зовнішні шари клітин здатна призводити до розвитку системної резистентності рослин (СРР), і штам, що колонізує судинну тканину, може бути більш ефективним індуктором.

Колонізація коренів видами *Trichoderma* призводить до збільшення рівня захисних ферментів рослин, зокрема пероксидаз, хітиназ, β -1,3-глюканаз і ферменту ліпоксигеназного шляху гідроксіпероксид ліази. Зміни метаболізму рослини можуть призводити до акумуляції антимікробних речовин у рослинах [19].

РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1 Особливості геному, наявність плазмід та/або інших генетичних структур. Наявність генетичних карт обраного продуценту або типового представника групи.

Розмір геному нитчастих грибів зазвичай невеликий. Вони є еукаріотичними організмами та мають гаплоїдне ядро. Розраховані розміри геному та кількість хромосом *Trichoderma* – від 31 до 39 Мб і від 3 до 7 відповідно. Розмір хромосом у різних видів різний.

Так, було встановлено розмір геному *Trichoderma harzianum* – 40,98 Мб. Число передбачуваних генів становить 14294, псевдогенів – 25. Відсоток GC 47,6% [96, 97].

Нові види роду *Trichoderma* можуть бути визначені принаймні трьома або більше послідовностями gDNA, тоді як для ідентифікації виду потрібен аналіз зазвичай двох фрагментів штрихкоду ДНК. Кількість генних послідовностей у NCBI для кожного виду може приблизно відповідати кількості ізолятів, виявлених для цього виду, і, таким чином, наближається до загальної частоти появи виду. Цей аналіз показав, що більшість видів (80%) були відносно рідкісними, оскільки вони були представлені менш ніж 50 генними послідовностями кожен, тоді як 35 видів (12% від загальної кількості видів) були представлені більш ніж 100 нуклеотидними послідовностями кожен. З них 84% нуклеотидних послідовностей були віднесені до невеликої групи поширених видів: *T. harzianum sensu lato* (також депонований як *T. lixii* або *Hypocrea lixii*) відповідав за 32% (9532 послідовності) від загальних послідовностей.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розроб.	Карачева А.О.						
Конс.	Шидецький В.Ю.						
Керівн.	Сироїд О.О.						
Затв.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	44	143
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92		

Картування поширеності нуклеотидних послідовностей на філогенетичному дереві роду, яке налічує понад 200 видів, показало, що найпоширеніші види не присутні в одній або декількох інфрародинних групах, а розподілені між різними кладами (рис. 3.1). Найпоширеніші види зустрічаються в кладах Harzianum/Virens (HV), секції Longibrachiatum (SL) та секції *Trichoderma* (ST).

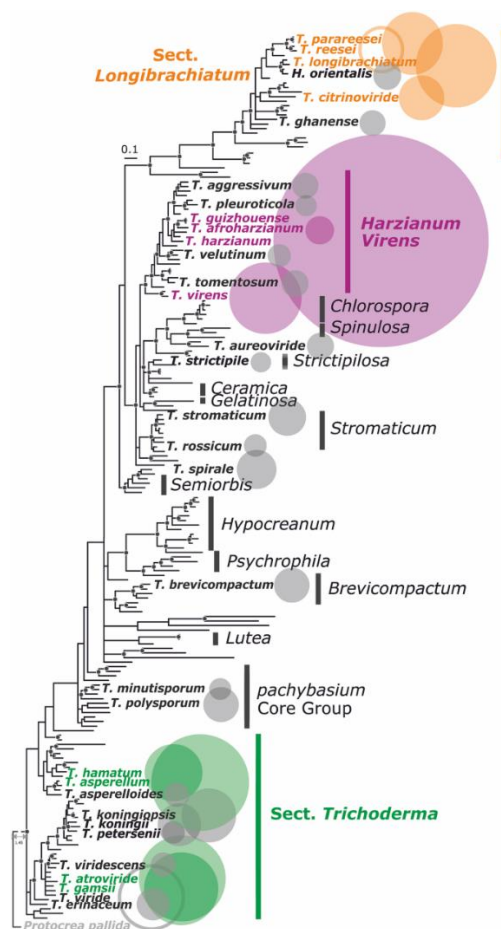


Рисунок 3.1 – Філогенія роду *Trichoderma* та походження найпоширеніших видів. Філогенія *Trichoderma* на основі байєсівського аналізу гена *grp2*.

Показано лише види з найбільшою поширеністю (> 100 нуклеотидних послідовностей) [98]

Середня подібність білкової послідовності в ортологах *Trichoderma* коливається від 90% (SL проти ST) і 92,5% (SL проти HV), до 97–99% у межах видів із тих самих секцій/кладів. Подібність амінокислот з іншими Нуроскреалес висока (75–78,4%).

Пошук функціонально нехарактеризованих білків показав, що 1331 з них є спільними з усіма іншими грибами. Кількість білків, спільних лише між окремими порядками або родинami, вказує на філогенетичні зв'язки: 211 з них присутні лише в *Hypocreaceae*, а 177 - у всіх *Sordariomycetes*.

80,7% генів, що кодують функціонально передбачувані білки, і 67,4% генів, що кодують функціонально непередбачувані білки у *Trichoderma*, присутні у *Sordariomycetes*.

Порівняння внутрішньовидових відмінностей геному двох ізолятів *T. harzianum* показало, що 1699 генів *T. harzianum* T (12%) були відсутні в іншому штамі, а 1419 генів, присутніх в останньому (10,1%), відсутні в типовому штамі. Більшість з цих генів кодували видові орфанні білки, а функцію можна було передбачити лише для 158 і 160 генів у *T. harzianum* T і *T. harzianum* TR247 відповідно [98].

Розроблено проєкт ядерного геному *T. harzianum* T6776 (повнота 98,39%), що складається з 1573 каркасів послідовностей із загальною довжиною збірки 39,73 Мб ($N_{50} = 68\,846$ і $N_{90} = 15\,338$), вмістом GC 48,50% і максимальним розміром каркаса 330 970 п.н. Загалом було передбачено 11 501 модель гена, що кодує білок. Аналіз показав, що 1412 передбачених білків (12,28% протеома) містять сигнальний пептид секреції. Серед цих 63 є білки, специфічні для *Trichoderma*, з яких 35 є специфічними для штаму [99].

Розшифровано геном та побудовано генетичну карту мітохондріального геному ізоляту *T. harzianum* HB324 (рис. 3.1).

Мітогеном ізоляту *T. harzianum* являє собою кільцеву молекулу ДНК 32 277 п.н., вміст GC 27,74%, що складається з 14 генів, пов'язаних з окисним фосфорилуванням (*atp6*, *atp8*, *atp9*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *cob*, *nad1* – *nad4*), *nad4L*, *nad5*, *nad6*), 28 генів, що кодують транспортні РНК, дві рибосомальні РНК (одна кодує малу субодиницю (*rrns*), а інша – велику субодиницю (*rrnl*)) і рибосомальний ген, що кодує білок *rps3*. Ділянка, що кодує білок, становить 52,23% геному, тоді як некодуючі елементи охоплюють 22,37%, включаючи чотири uORF (або гіпотетичні гени), п'ять інтронів IGI і шість самонаведених

ендонуклеаз (HEG). Усі ознаки були закодовані в одному ланцюзі ДНК. Ампліфікація гена *tnl* підтвердила, що мітогеном був повним і є кільцевою молекулою (положення праймерів на малюнку представлені подвійними чорними стрілками). Порівняно з іншими мітохондріальними геномами *Trichoderma*, *T. harzianum* має другий за величиною геном і найбільшу кількість послідовностей IGI в генах (5).

На рис. 3.2 ендонуклеази самонаведення та інтрони представлені фіолетовим та червоним кольором відповідно. Рибосомальні гени показані зеленим кольором; гени, що кодують тРНК, представлені сірим кольором, ORF без визначеної функції (uORF) пофарбовані в оранжевий колір, а основні гени виділені рожевим кольором. Елементи, з'єднані тонкими лініями, представляють фрагменти одного гена. Синє кільце представляє вміст GC. Подвійні стрілки представляють праймери та область, ампліфіковану в гені *tnl* [100].

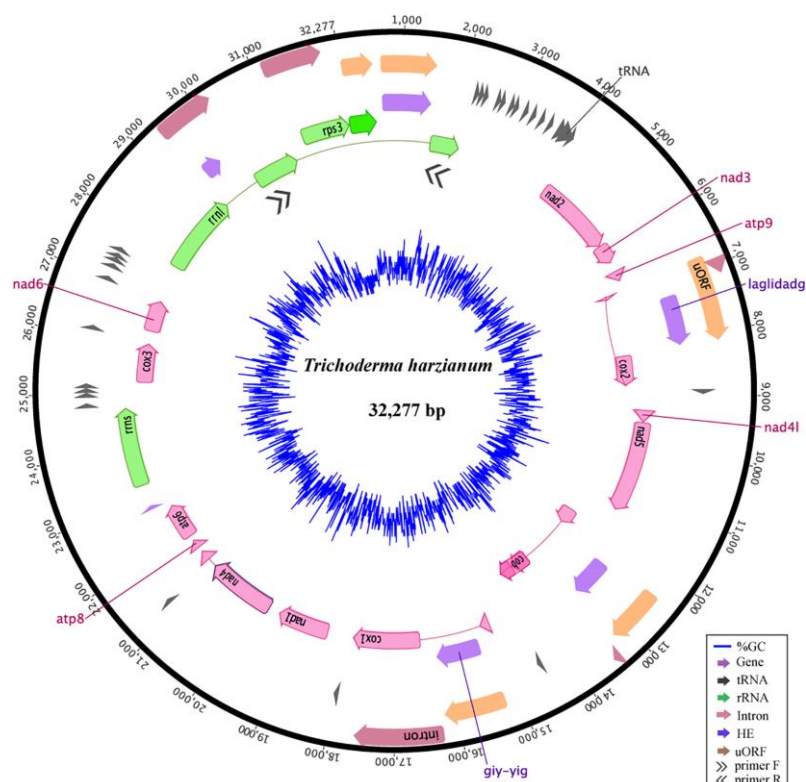


Рисунок 3.2 – Кільцева карта мітохондріального геному ізоляту *Trichoderma harzianum* HB324 [100]

У мітохондріях ізоляту *Trichoderma harzianum* T95 була ідентифікована кільцева плазмід під назвою pThr1 з розміром мономеру 2,6 кб. Дослідження

гібридизації з використанням клонованих плазмід не виявили подібності послідовності ДНК між плазмідною та мітохондріальним геномом ізоляту. Було визначено повну послідовність плазмід, і аналіз послідовності показав, що вона містить одну довгу відкриту рамку зчитування 1818 п.н. Порівняння послідовностей показало, що отримана амінокислотна послідовність ORF демонструє подібність до зворотних транскриптаз кільцевих ретроплазмід *Mauriceville* та *Varkud Neurospora* spp. і лінійні ретроплазмідні штамів pFOXС2 і pFOXС3 *Fusarium oxysporum*. В областях гомології можна знайти сім консервативних амінокислотних блоків [40].

Основний геном *Trichoderma* містив 105 орфанних генів. Хоча вони складали лише 1,5% генів основного геному, орфанних генів, обмежених секціями/кладами або навіть окремими видами, було набагато більше (в середньому 17,4, 13,0 і 10,1% у SL, ST і HV, відповідно) [98].

Для обраного штаму для встановлення належності до виду *T. harzianum* проведено ПЛР-ампліфікацію, за визначеними послідовностями ДНК отримані наступні результати подібності штаму до інших штамів *T. harzianum* (табл. 3.1):

Таблиця 3.1 – Результат порівняння гомології послідовностей ITS штаму MSB1211 [7]

Штам	Відсоток гомології
<i>Hypocrea lixii</i> ізолят S17TH	99%
<i>Hypocrea lixii</i> ізолят NBAII(N)ASS	99%
<i>Trichoderma harzianum</i> ізолят NBAII-Th33	98%
<i>Trichoderma harzianum</i> ізолят IBSD-T112	98%
<i>Trichoderma harzianum</i> GJS 99-225	99%
<i>Hypocrea lixii</i> штам SHSJ5003	99%
<i>Trichoderma inhamatum</i> штам GL0834	98%
<i>Trichoderma harzianum</i> штам IBSD-T137	98%
<i>Trichoderma harzianum</i> штам IBSD-T101	98%

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

Літична й антагоністична активність *Trichoderma* забезпечується кількома генами, що кодують позаклітинні гідролази, зокрема ендохітинази, β -N-ацетилгексоамінідази, протеази, хітин-1,4- β -хітобіозидази, ендо- та екзо- β -1,3-глюканази, ліпази, ксиланази, маннанази, пектинази, пектинліази, амілази, фосфоліпази, РНКазы, ДНКазы тощо. Хітинолітичні та глюканолітичні ферменти каталізують гідроліз клітинних стінок фітопатогенів, оскільки руйнують полімери, які не зустрічаються в рослинних клітинах. Кожен клас гідролаз складається з декількох ферментів, що розрізняються за активністю. Гени гідролаз ідентифіковано (табл. 3.2) і клоновано [19].

Таблиця 3.2 – Гідролітичні ферменти *Trichoderma*, їхні гени у базах даних [19]

Полімер	Ген/фермент	Число сиквенсів у базах даних
Хітин	Chit42 (ендохітиназа)	64
	Chit33 (ендохітиназа)	2
	Nag1 (хитобіозидаза)	2
	Nag2 (хитобіозидаза)	2
	Exs1 (екзохітиназа)	1
	Exs2 (екзохітиназа)	1
	Ech2	2
	Ech3	2
	Ech3B	2
	Cht1	3
	Cht2	2
	Chit22 (ендохітиназа)	2
	Chit36Y	2
	Chit-VIRI	1
	Chit-P	1

Полімер	Ген/фермент	Число сиквенсів у базах даних
Хітин	Chit-HAM	1
	Chit-HAR1	1
	Chit-HAR2	1
	Chit-HAR3	1
	Chit-G2	1
Глюкан	Bgn1 (ендо- β -1,3-глюканаза)	1
	Bgn2 (ендо- β -1,3-глюканаза)	1
	Bgn3 (ендо- β -1,3-глюканаза)	2
	Gluc78 (екзо- β -1,3-глюканаза)	2
	B16-1 (ендо- β -1,6-глюканаза)	2
	B16-2 (ендо- β -1,6-глюканаза)	2
	B16-3 (ендо- β -1,6-глюканаза)	2
Целюлоза	Cbh1 (β -1,4-глюкан-целобіогідролаза)	7
	Cbh1 (β -1,4-глюкан-целобіогідролаза)	6
	Cel2A (β -1,4-ендоглюканаза)	2
	EglII (β -1,4-ендоглюканаза)	1
	EglIII (β -1,4-ендоглюканаза)	1
	EglIII (β -1,4-ендоглюканаза)	1
	EglVI (β -1,4-ендоглюканаза)	1
Мутан	β -1,3-глюканаза	3
Ксилан	Xyl1 (β -ксиланаза)	2
	Xyl2 (β -ксиланаза)	2
	Xyl31 (β -ксиланаза)	1
	Ендо- β -1,4-ксиланаза	1
	β -глюкуронидаза	1
	β -L-арабінофуранозидаса	1

Встановлено, що експресія генів різних **целюлаз** координована. Це проявляється в тому, що їхній відносний рівень експресії приблизно однаковий за всіх умов індукції. *cbh1* – найбільш експресований ген, за ним слідують *cbh2* і *egl1*. Високий рівень експресії *egl5*. Регуляція гена ймовірної мембранної ендонуклеази *cel5b* відрізняється від інших ендонуклеаз.

Експерименти з видаленими генами целюлаз *Trichoderma reesei* продемонстрували координовану експресію целюлаз. Було показано, що делеція *cbh1* спричиняє наростання *cbh2*-ферменту, на відміну від невиявленого відповідного ефекту у штамів, мутантних за *egl1* або *egl2*. Такого роду регуляція *cbh2* проявляється на лактозі і целюлозі як джерелі вуглецю. Припускається, що промотор *cbh1* є фактором транскрипції *cbh2*, для підтвердження необхідний більш детальний аналіз.

Вивчався рівень експресії основних генів целюлаз під час росту грибів на середовищі з необмеженим джерелом вуглецю, або на нейтральних джерелах – сорбітол або гліцерин, з додаванням софорози або інших дисахаридів. Додавання лактози і целобіози збільшують рівень експресії целюлаз. Відчутно збільшують рівень експресії генів целюлаз різні ксилани та ксилобіаза. Результати росту на арабітолі зіставні за експресією з культивуванням на лактозі. Окрім джерела вуглецю, інші фактори, такі, як рН або концентрація азоту, можуть регулювати експресію целюлаз.

Експресія целюлаз пригнічується глюкозою. Припускається, що причиною цього є зникнення індуктора. При цьому у присутності високого рівня глюкози софороза не може індукувати синтез целюлаз. Додавання глюкози в культуральне середовище завжди веде до зникнення транскрипції *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* та *egl5* целюлаз. Таким чином, механізм репресії глюкози сильно впливає на експресію целюлаз.

Прояв спрямованої репресії в експресії целюлаз глюкози отримано з аналізу промоторів целюлаз і з клонування гена, що кодує основний репресор катаболізму вуглецю – білок CRE1.

Промотор целобіогідролази I містить ділянку зв'язування білка глюкозного репресора CREA/Mig1. Дослідження промотора показали, що CREI є не єдиним регулятор і для повної експресії потрібні активатори.

Під час вивчення промотора целобіогідролази II *cbh2 Trichoderma reesei* виявлено специфічний комплекс ДНК-білок, присутній тільки в міцелії, індукованому софорозою. Показано, що фрагмент промотора *cbh2* зв'язує CREI, синтезований *E. coli in vitro* [19].

Грибами роду *Trichoderma*, зокрема штамми *T. harzianum*, продукуються різноманітні форми **ксиланази**. Фермент продукується при використанні як джерела вуглецю целюлози або різних маннанів.

Ендо- β -маннанази – ферменти, що гідролізують β -1,4-глікозидний зв'язок у мананах, галактоманнанах, глюкоманнанах і галактоглюкоманнанах. Досліджена маннаназа кодується геном *man1*.

Досліджені принаймні три різні α -галактозидази (маннанази) AGLI, AGLII і AGLIII, що кодуються генами *agl1*, *agl2* і *agl3* відповідно.

При дослідженні регуляції експресії ксиланази на рівні транскрипції виявлено різну дію ксиланази по відношенню до глюкози. Транскрипція *xyn1* індукується в присутності ксилану і ксилози і не проявляється в присутності глюкози. І навпаки, промотор *xyn2* здатний ініціювати невеликий базовий рівень транскрипції навіть на глюкозу, який збільшувався в присутності ксилану та ксилобіозу. Транскрипція *xyn2* також індукувалася софорозою і целюлозою, на відміну від *xyn1*. Софороза індукує експресію *xyn1* і *xyn2*, як і ксилобіоза при додаванні до гліцеринового середовища. Експресія *xyn1* або *xyn2* при зростанні грибів на глюкозі відсутня. На відміну від генів целюлаз, *xyn1* і *xyn2* експресуються некоординовано [19].

Представлено та вивчено принаймні 4 групи генів, що кодують **хітинази**:

- 1) ендохітиназу (*chit42* і 2 різновиди *chit33*),
- 2) 2 гени, що кодують хітобіозидазу (*Nag1* і *Nag2*),
- 3) 2 гени, що кодують екзохітинази (*Exs1* і *Exs2*), і
- 4) 13 генів, що кодують неохарактеризовані хітинази [19].

Припускають, що хітинолітична система грибів роду *Trichoderma* складається з 5-7 різних ферментів, залежно від штаму. Зазвичай система складається з двох β -(1,4)-N-ацетилглюкозамінідаз (102 і 73 кДа) і чотирьох ендохітиназ (52, 42, 33 і 31 кДа). Ендохітиназа 42 кДа *in vitro* каталізує гідроліз клітинних стінок *Botrytis cinerea*. Індукція відповідного гена асоційована з атакою паразитичного гриба. Припускається, що ген ендохітинази-42 відіграє головну роль у мікопаразитизмі.

Високий рівень індукції позаклітинних хітинолітичних ферментів зазвичай отримують під час росту *Trichoderma* на очищеному хітині, грибних клітинних стінках або міцелії як джерела вуглецю. Індукція хітиназ значно знижена або відсутня *in vitro* на хітозані, целюлозі, неочищеному хітині або ламінарині.

Утворення більшості хітинолітичних ферментів *in vitro* репресується зростаючою кількістю глюкози, сахарози та кінцевими продуктами, що дає підстави вважати, що синтез ферментів специфічно регулюється катаболітною репресією. Існують дані про катаболітну репресію глюкозою експресії генів *chit42/ech42*, детально вивчені в ендохітинази CHIT42 *T. harzianum*, що кодується геном ThEn-42, яка активізується за мікопаразитичної взаємодії.

Було припущено, що на гені ендохітинази-42 існують два різні сайти в ділянці промотора, з якими взаємодіє вуглецевий катаболітний репресор CRE1 у разі мікопаразитизму в середовищі з глюкозою та олігосахаридами. Повідомлялося про репресію глюкозою *chit42* також на рівні мРНК; можливо, у цьому процесі бере участь репресор вуглецевого катаболізму CRE1 [101, 102].

Ген *chit33 T. harzianum* не був гомологічним жодному гену грибів, однак він є гомологічним захисним хітиназам рослин [103].

Клоновано два гени екзохітиназ (*exs1* і *exs2*) *T. harzianum*, що кодують N-ацетил- β -D-гексозамінідазу з молекулярною масою 64 і 68 кДа, гомологічні на 75%. Екзохітиназа з молекулярною масою 64 кДа має 7 сайтів гліколізування і в результаті гліколізування молекулярна маса ферменту зростає до 73-75 кДа [104].

De novo було показано наявність регуляції продукції хітинолітичних ферментів *Trichoderma* на рівні транскрипції. Значні зміни в транскриптомі *T. harzianum* під час взаємодії з грибовими патогенами пов'язані з дією набору факторів транскрипції (рис. 3.3). Керована координація між утворенням мРНК і ферменту була виявлена для *nag1*, *chit33*, *chit42*, *ech-43*, хоча додаткова посттранскрипційна регуляція проявляється для *chit33*. Транскрипція всіх цих генів сильно індукується автоклавованим міцелієм, хітином, N-ацетилглюкозаміном, а також дерепресується глюкозою. Однак деякі гени регулюються незалежно. Незалежна транскрипція була отримана для *chit42* за індукції хітином або грибною клітинною стінкою [19].

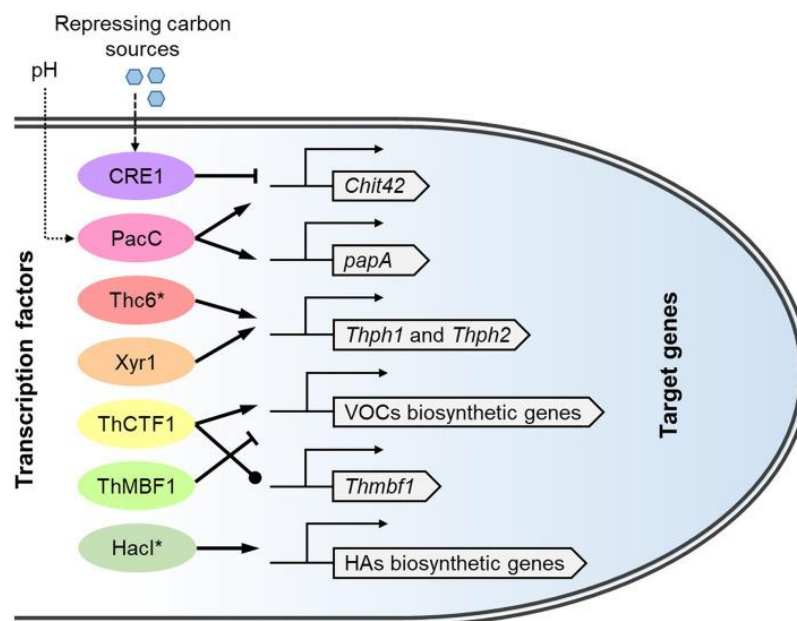


Рисунок 3.3 – Система регуляції транскрипції генів, пов'язаних із біоконтролем, у комплексі видів *T. harzianum* (VOC – летючі органічні сполуки; НА – гарціанові кислоти. Фактори транскрипції, які є інженерними цілями для покращення штаму, позначені зірочками) [105]

Експресія гена, що кодує СНІТ42, вивчена в деталях. Експресія *ech-42* може бути індукована хітином, світлом і мікопаразитичними взаємодіями та ефективно репресувалася глюкозою, як і інші гени. Клоновано й охарактеризовано істотну частину промотора ThEn-42 з *T. harzianum* P1. Відзначено сильний прояв катаболітної репресії ThEn-42, що здійснюється за допомогою Cre1.

Cre1 зв'язується промотором ThEn-42. Він зв'язується і відокремлюється від промотора під час репресії та дерепресії гена, відповідно. Мікопаразитична взаємодія позбавляє можливість Cre1 зв'язуватися з двома окремими ділянками промотора гена хітинази chit42, щоб інактивуючи його експресію. Це відбувається навіть у присутності глюкози – імовірно, через те, що з промотором зв'язується білок мікопаразитичної природи, який діє як позитивний регулятор ThEn-42 для синтезу chit42. Експресія chit42 ініціюється розчинними хітоолігосахаридами, які можуть вироблятися конститутивними хітинолітичними ферментами [19, 105].

Ген *T. harzianum*, що кодує Cre1, було клоновано, проведено функціональний аналіз ThEn-42 і nag1 промоторів *in vivo* та *in vitro*.

CRE1, консервативний репресор вуглецевого катаболіту в грибах, є першим продемонстрованим фактором транскрипції в біоконтролі з *T. harzianum*. Дослідження цього механізму дало розуміння регуляції експресії хітиназ в умовах мікопаразитичної взаємодії [19, 100, 105].

Порівняльний аналіз трьох видів *Trichoderma* (*T. reesei*, *T. atroviride*, *T. virens*) дав інформацію про гени, пов'язані із протигрибковими властивостями *Trichoderma*, включаючи гени **вторинного метаболізму** у мікопаразитів (табл. 3.3). Багато з цих генів є частиною великих біосинтетичних кластерів генів, що містять основні ферменти, такі як нерибосомні пептидсинтетази (NRPS), полікетидсинтази (PKS) або терпенсинтази/циклази, додаткові ферменти (наприклад, цитохром P450, оксидоредуктази, метилтрансферази тощо), і, в деяких випадках, гени транспортерів і факторів транскрипції. Геном *Trichoderma harzianum* був також згодом доданий до загальнодоступних баз даних, але потребує детального аналізу [48].

Таблиця 3.3 – Гени вторинного метаболізму та кластери генів у геномах різних видів *Trichoderma* (*T. reesei* , *T. atroviride* та *T. virens*) [48]

Основні гени	<i>T. reesei</i>		<i>T. atroviride</i>		<i>T. virens</i>	
	Загальна кількість	Частина генного кластера	Загальна кількість	Частина генного кластера	Загальна кількість	Частина генного кластера
NRPS	8	5	9	7	22	17
PKS	11	6	15	9	18	8
PKS/NRPS	2	2	1	1	4	4
Терпенциклаза	6	2	7	3	11	7

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.

Природний добір являє собою здатність до виживання та репродукції організмів певного виду, найбільш пристосованих до умов навколишнього середовища. Його дія полягає у збереженні та нагромадженні спадкових змін, які мають користь для популяції і виду в цілому, та створенні нових особин, пристосованих краще за інших до умов свого існування, які лишають потомство. Використання цього методу передбачає вилучення природного штаму мікроорганізму для подальших операцій з ним. Застосування цього методу сприяло отриманню та ідентифікації більшості відомих на сьогодні штамів *Trichoderma*, зокрема *Trichoderma harzianum* [19, 106]. Отримання ізолятів *Trichoderma harzianum* із ґрунту, кореневої системи рослин і кореневищ дозволив ідентифікувати хімічні похідні з інгібуючою по відношенню до фітопатогенів активністю [105].

Отримання продуцента з природного середовища передбачає відбір проб з найбільш вірогідного місцезнаходження мікроорганізму, внесення зразків у рідке селективне середовище (триходерма-селективне середовище), отримання таким чином накопичувальних культур та виділення чистих культур (висів

розбавленої суспензії клітин накопичувальної культури на тверде поживне середовище з метою отримання окремих колоній, кожна з яких містить клітини, які розвиваються з однієї клітини, яка і являє собою чисту культуру) [26, 106].

Штучний добір полягає у створенні нових або покращенні наявних штамів мікроорганізмів через систематичне збереження особин, яким притаманні певні спадкові ознаки, що зберігаються протягом кількох поколінь. Процес добору забезпечує зростання мінливості організмів, але супроводжується зниженням їхньої загальної життєздатності.

Методи добору (природного і штучного) ґрунтуються на необхідності одержання форм мікроорганізмів, що більш пристосовані у середовищі, ніж вихідна культура, та проявляє необхідні властивості [106].

Штучний добір штамів *Trichoderma* здійснюють шляхом виділення їх з безпосереднього середовища існування – ґрунту, кори дерев, що гниють тощо.

Загалом штучний добір штамів грибів роду *Trichoderma* здійснюється за приблизною схемою:

1. Відбір зразку ґрунту разом із частини кореневої системи культурної рослини або інших частин рослини (наприклад, кора дерев, що гниє);
2. Відокремлення грибів роду *Trichoderma* із загального числа ґрунтових мікроорганізмів шляхом висіву розведення зразку на триходерма-селективне середовище;
3. Отримання чистої культури;
4. Морфологічна та/або молекулярно-біологічна ідентифікація виду;
5. Аналіз біологічної активності виділених чистих культур (селекція на антибіотичні властивості, ферментативну, фунгістатичну, фунгіцидну, рістстимулюючу дію, здатність до суперпаразитування на цільових організмах-шкідниках тощо);
6. Відбір штаму із найвищою бажаною активністю.

Аналіз існуючих патентів показує, що доволі часто штами *Trichoderma*, отримані шляхом штучного добору з природних середовищ існування, є

ефективними потенціальними продуцентами для препаратів, основу яких складає жива біомаса біологічного агенту [7, 34, 107].

Основним недоліком методу добору є його надзвичайна трудомісткість, оскільки добір, як правило, здійснюється без детального знання шляхів біосинтезу. Тому селекційні роботи такого роду можуть займати велику кількість часу, але не приносити значних практичних результатів [106].

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу:

Відомо про можливості застосування різноманітних типів мутагенів, фізичних та хімічних, що використовувалися для отримання високопродуктивних штамів *T. harzianum*, призначених для біоконтролю хвороб рослин.

Так, обробку хімічним мутагеном N'-метил-N'-нітро-N'-гуанідином (NTG) здійснювали для створення мутантних штамів *T. harzianum*-гіперпродуцентів целюлаз. Спори десятиденної культури ізолятів *T. harzianum*-1432, які показали максимальну активність проти патогену під час скринінгу, доведені до концентрації 1×10^5 спор/мл, обробляли NTG, інкубували при 37 °C у струшувальній водяній бані протягом 45–90 хвилин для досягнення життєздатності 5–10%. Через певні проміжки часу мутагенез зупиняли, пропускаючи весь зразок об'ємом 4 мл через фільтр Millipore 0,45 м, двічі промиваючи спори 0,1 М фосфатним буфером і, нарешті, ресуспендуючи спори в тому самому буфері. Спори, оброблені NTG, висівали на мінімальне середовище для отримання колонієутворюючих одиниць.

Один з отриманих штамів, Th-m1, продукував більшу кількість ферментів з більш високою активністю целюлази та β -1,3-глюканази, ніж у іншого відібраного штаму. Ці результати переконливо підтверджують твердження, що, виходячи з високих рівнів вивільнення целюлази та β -1,3-глюканаз штамом Th-m1, він володів сильнішими мікопаразитарними властивостями, ніж інші відібрані батьківські та мутантні штами *Trichoderma*. Скоординована активність цих ферментів, що фиділяються Th-m1, робить його здатним

руйнувати різні полімери, що призводить до ефективного руйнування клітинних стінок патогенів [108].

Мутагенні методи покращення агентів біоконтролю грибів через регулятори продукування протигрибкових метаболітів є ефективними та перспективними. Повідомлялося, що мутація може не тільки впливати безпосередньо на гени целюлаз, але також впливати на їхній синтез і секрецію. Підвищення виділення хітинази та целюлази можна досягти за допомогою мутантів *Trichoderma*. Було продемонстровано метод покращення антагоністичних мікроорганізмів для біологічного контролю хвороб рослин шляхом мутації за допомогою фізичного мутагену – γ -опромінення.

Так, мутанти були індуковані та виділені шляхом обробки батьківських спорових культур *T. harzianum* дикого типу гамма-опроміненням при 20 крад протягом 75 хвилин або 50 крад протягом 180 хвилин. При цьому було отримано мутантний ізолят TH508 (доза опромінення 50 крад протягом 180 хв), який на 100% пригнічував ріст *Sclerotinium cepivorum in vitro* [109].

Після опромінення ультрафіолетовим світлом (УФ) активність позаклітинної протеази деяких мутантів *T. harzianum* була в 6-12,5 разів вищою, ніж у штаму дикого типу, і було доведено, що певні мутанти є більш ефективними проти грибкових патогенів *in vitro*. Повідомлялося, що надмірна експресія гена *prb1*, що кодує серинову протеазу, збільшує виділення протеаз та посилює антагоністичну активність проти *R. solani* [105].

3.2.3 Використання методів генної та клітинної інженерії

Раціональна генна інженерія ефективно використовується для покращення хітиназної активності штамів *T. harzianum*. Для цього застосовуються стратегії як надекспресії, так і ензимної інженерії. Надмірна експресія гена *chit33* з використанням конститутивного промотора призвела до приблизно 200-кратного збільшення активності позаклітинної хітинази, а інгібіторна здатність проти *R. solani* була ефективно покращена. Крім того, основні хітинази, що продукуються *T. harzianum*, не мають специфічного хітинзв'язуючого домену (ChBD), що впливає на їх спорідненість з

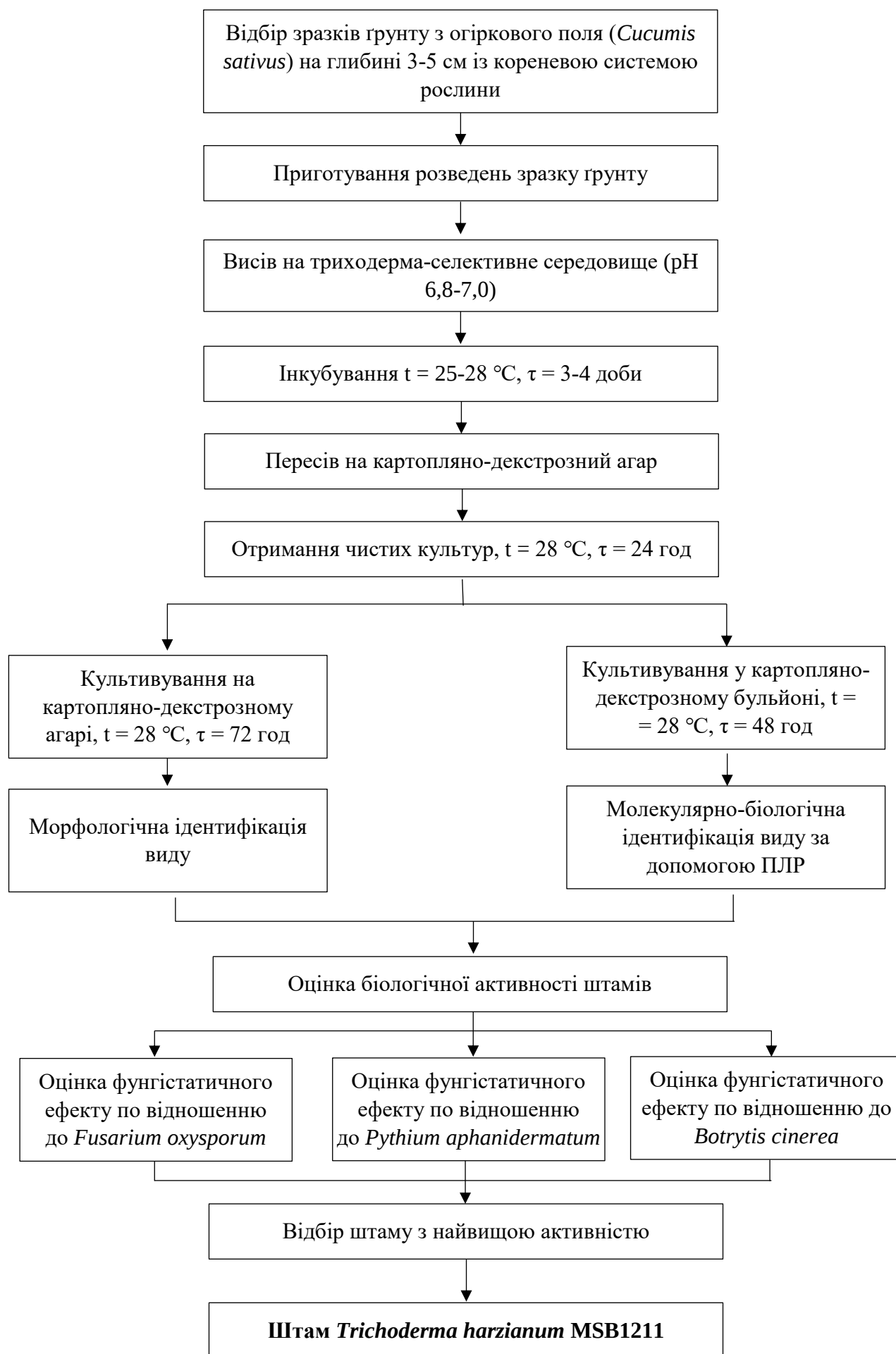
нерозчинним хітином у клітинній стінці гриба. Трансформанти з надекспресією химерної хітинази, що несуть ChBD з хітинази *T. atroviride*, показали вищу активність хітинази та сильніше інгібування проти *R. solani* порівняно з тими без ChBD [110, 111]. Подібним чином додавання целюлозозв'язуючих доменів (CBD) із здатністю зв'язуватися з поверхнею хітину до хітиназ призвело не лише до підвищення активності хітинази, але й до більш ефективного інгібування *R. solani*, *B. cinerea* і *Phytophthora citrophthora*, ніж штам дикого типу [105].

Генна інженерія застосовується також для створення штамів з посиленням синтезом вторинних метаболітів, що мають протипатогенну дію.

Мультиплексна генетична інженерія штамів вимагає розробки високоефективних інструментів маніпулювання генами. Традиційно опосередковані поліетиленгліколем і *Agrobacterium* методи трансформації використовуються для конструювання мутантів у *T. harzianum*, що дозволяло регулювати надекспресію генів і цілеспрямовану генетичну рекомбінацію (наприклад, генний нокаут) [112]. Нові методи штамової інженерії, наприклад, редагування геному на основі CRISPR/Cas9, впроваджують прості платформи для здійснення мультиплексних генетичних модифікацій у нитчастих грибах. Нещодавно цей метод був використаний у *T. harzianum* для інактивації гена *pyr4* для створення урацил-дефіцитного штаму [105, 113]. Методи редагування геному також мають перевагу в тому, що за їхньою допомогою легко досягти генетичних модифікацій без введення чужорідної ДНК. Для гетерологічної експресії кластерів біосинтетичних генів повідомлялося про складання великих фрагментів ДНК на основі гомологічної рекомбінації в дріжджах або безпосередньо в нитчастих грибах. Очікується, що ці методи допоможуть у систематичній генетичній модифікації *T. harzianum* для розробки агентів біоконтролю нового покоління [105].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі [7]

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 60
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції – біопрепарат для захисту рослин на основі *Trichoderma harzianum* (найближчим аналогом можна вважати препарати, що носять назву «Триходермін», а також препарати «БіоНорма Триходерма» та «ЕКОСТЕРН Триходерма»).

Біопрепарат підлягає регламентації у відповідності до ДСТУ 4756:2007 «Захист рослин. Терміни та визначення понять» та ДСТУ 7938:2015 «Добрива органічні. Агрономічні вимоги щодо якості добрив для використання в органічному виробництві». Характеристика готової продукції здійснюється відповідно до ТУ У 24.1-30165603-024:2020.

Продукт призначений для профілактики захворювань та захисту рослин від грибкових хвороб, таких як: фітофтороз, альтернаріоз, ризоктоніоз, фузаріоз, парша, чорна ніжка, антракноз, пероноспороз, борошниста роса, біла та сіра гнилі. Препарат застосовується для захисту зернових, зернобобових, олійних, технічних, овочевих, плодових, ягідних культур та декоративних рослин. Препарат не тільки проявляє захисну дію, але також здатний покращувати ріст зазначених культур. Препарат застосовується шляхом обробки рослин, ґрунту та/або розсади перед висаджуванням, обприскування вегетативних рослин або внесення в рядок.

За зовнішнім виглядом препарат являє собою рідину або концентрат суспензії, яка має від зеленого до коричнево-зеленого забарвлення та володіє специфічним запахом. Основа препарату – спори та міцелій грибів-антагоністів роду триходерма, титр препарату 1×10^9 КУО/см³ (допускається не менше 1×10^7 КУО/см³), може містити антибіотичні метаболіти або біологічно активні речовини, які володіють захисною дією та здатністю стимулювати ріст і розвиток рослин і підвищувати їхню стійкість до фітопатогенів.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розроб.	Карачева А.О.						
Конс.	Шидецький В.Ю.						
Керівн.	Сироїд О.О.						
Затв.							
					Стадія	Аркуш	Архів
					Д	62	143
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92		

Готовий препарат фасується у флакони по 0,5, 1 л та каністри штабельовані 10 л з поліетилену низького тиску за ГОСТ 16338-85 Е Полиэтилен низького тиску. Технические условия (Поліетилен низького тиску. Технічні умови). Кожна пляшка закривається кришкою з індукційним запаюванням.

Кожна партія продукції супроводжується індивідуальним сертифікатом якості «OrganicStandart». На упаковці вказується реєстраційний номер посвідчення препарату. За необхідності у сертифікат також вносяться коригування рекомендацій щодо розведення.

Пакування та маркування готової розфасованої продукції здійснюється у відповідності до ГОСТ 28471 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение».

На кожен ємність з препаратом (флакон або каністру) наклеюється етикетка, яка містить наступну інформацію:

- найменування підприємства-виробника та його товарний знак;
- найменування препарату;
- марка препарату;
- об'єм нетто;
- номер партії;
- дата виготовлення;
- призначення препарату;
- норми використання (на упаковці вказується інструкція до використання);
- термін зберігання;
- умови зберігання;
- позначення діючого стандарту (сертифікату).

Ємності з готовим продуктом перед відвантаженням упаковуються у вторинну тару – ящики з гофрованого картону за ДСТУ ГОСТ 9142:2019 «Ящики из гофрированного картона. Общие технические условия» з підпергаментом марки П-3 ДСТУ ГОСТ 1760:2018 «Підпергамент. Технічні

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

умови», який повністю покриває всю внутрішню поверхню тари, включаючи верх ящика, без зазорів або проміжків. На ящик наноситься інформація про продукт шляхом нанесення печатки або тиснення.

Продукцію транспортують вантажним автомобільним транспортом із дотриманням правил, чинних для транспортних засобів даного типу. Транспортні засоби повинні бути чистими і сухими. Не допускається залучення для транспортування автомобілів, що використовувалися для перевезення отрутохімікатів.

Препарат зберігається при температурі +5...+18 °С у сухих, добре вентильованих приміщеннях, захищених від вологи та потрапляння сонячного світла. Термін зберігання – 6 місяців.

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

Характеристика сировини, матеріалів, напівпродуктів виробництва, їхній перелік та показники, які регламентують вимоги до них, наведені у табл. 4.1.

Таблиця 4.1 – Характеристика сировини, матеріалів, напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1 Амоній сірчистоокислий (NH ₄) ₂ SO ₄	ГОСТ 10873-73	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Масова частка амонію сірчистоокислого – не менше 99%.	Компонент поживного середовища

Продовження таблиці 4.1

1.2 Вода питна	ДСанПіН 2.2.4-171-10	рН, забарвленість, загальна жорсткість, каламутність, лімітуюча ознака шкідливості, мікробіологічні (до 100 МО/мл), органолептичні, паразитологічні, радіаційні, санітарно-токсикологічні, фізико-хімічні.	Компонент поживного середовища, для приготування розчинів, мийки, ополіскування обладнання, для подачі у сорочку реакторів
1.3 Калій фосфорнокислий двозаміщений 3-водний $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	ГОСТ 2493-75	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Масова частка калію фосфорнокислого двозаміщеного 3-водного – не менше 98%.	Компонент поживного середовища
1.4 Калій фосфорнокислий однозаміщений KH_2PO_4	ГОСТ 4198-75	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Масова частка калію фосфорнокислого однозаміщеного – не менше 98%.	Компонент поживного середовища

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

65

Продовження таблиці 4.1

1.5 Кукурудзяний екстракт	МРТУ 18-241-68	Усі показники у відповідності до МРТУ. Вміст вологи – 30–60%, загального азоту 2,7–4,5%, амінного азоту – 1,0–2,0%.	Компонент поживного середовища
1.6 Магнію сульфат 7-водний $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ГОСТ 4523-77	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Масова частка магнію сульфату 7-водного – не менше 99,0%	Компонент поживного середовища
1.7 Меляса бурякова	ДСТУ 3696-98	Усі показники у відповідності до ДСТУ. Вміст цукрів, що зброджуються – не менше 43%.	Компонент поживного середовища
2. Допоміжні матеріали:			
2.1 Засіб миючий синтетичний	ДСТУ 2972:2010	Усі показники у відповідності до ДСТУ, миюча здатність – не менше 85%	Мийний засіб для обробки обладнання

Продовження таблиці 4.1

2.2 Кислота соляна HCl	ДСТУ 2904-94	Усі показники у відповідності до ДСТУ. Масова частка кислоти соляної – 35%	Для регулювання показнику pH
2.3 Натрію гідроксид NaOH	ГОСТ 4328-77	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Масова частка гідроксиду натрію – 97%	Для регулювання показнику pH
2.4 Перекис водню H ₂ O ₂	ГОСТ 177-88	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Масова частка перекису водню – 33%.	Дезінфікуючий розчин для обробки приміщень
2.5 Пропінол Б- 400	ТУ 6-14-300-80	Усі показники у відповідності до ТУ.	Піногасник
2.6 Спирт етиловий C ₂ H ₅ OH	ДСТУ 4221:2003	Усі показники у відповідності до ДСТУ. Масова частка спирту етилового – 96%.	Дезінфікуючий розчин для обробки рук персоналу

Продовження таблиці 4.1

2.7 Сусло-агар	ГОСТ 29112-91	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Стерильність; масова частка вуглеводів – не менше 6,0%.	Компонент твердого поживного середовища для відновлення музейної культури
2.8 Хлорамін Б	ВТУ 27/24-79-65	Усі показники у відповідності до ВТУ. Вміст активного хлору – 25-29%.	Дезінфікуючий розчин для обробки обладнання
3. Матеріали:			
3.1 Кришки поліетиленові з індукційною запайкою	ТУ У25.2-33120146-001:2005	Усі показники у відповідності до ТУ. Зовнішній вигляд	Для тари для готової продукції
3.2 Папір етикеточний	ГОСТ 7625-86	Зовнішній вигляд, ступінь проклейки	Маркування готової продукції
3.3 Підпергамент марки П-3	ДСТУ ГОСТ 1760:2018	Зовнішній вигляд	Покриття внутрішньої поверхні ящиків
3.4 Скловолокло	ГОСТ 19170-2001	Діаметрі – 21 мкм Діаметр – 5-8 мкм	Для фільтру грубої очистки Для головного фільтру

Продовження таблиці 4.1

3.5 Стрічка клеєва на паперовій основі марки В ₃	ГОСТ 18251-87	Усі показники у відповідності до ДСТУ. Ширина бобини – 70 мм	Заклеювання картонних ящиків
3.6 Фібра базальтова	ТУ В В.2.7-26.8-32673353-001:2007	Діаметр – 0,5-1,5 мкм	Для індивідуального фільтру
3.7 Флакони поліетиленові	ТУ У25.2-33120146-001:2005	Усі показники у відповідності до ТУ. Зовнішній вигляд	Пакування готової продукції
3.8 Ящики картонні	ДСТУ ГОСТ 9142:2019	Усі показники у відповідності до ГОСТ. Зовнішній вигляд, якість склейки та зшивки	Вторинне пакування готової продукції

4.3 Опис технологічного процесу

Технологія виробництва біопрепарату для захисту рослин включає у себе такі принципові стадії біотехнологічного виробництва, як: допоміжні роботи – санітарна підготовка виробництва, підготовка повітря, підготовка робочих розчинів, приготування поживних середовищ; стадії технологічного процесу – підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування; пакування, маркування та відвантаження; переробка відходів і знешкодження викидів. Зазначені процеси представлені у графічній частині дипломного проєкту на технологічній схемі виробництва; апаратурне оформлення технологічних процесів проілюстроване у вигляді апаратурної схеми виробництва у графічній частині проєкту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

Обладнання до початку виробничого процесу обробляється дезінфікуючими розчинами. Метою цієї обробки є попередження потрапляння контамінантів у напівпродукти виробництва та готову продукцію. З цією ж метою обробку дезінфікуючими розчинами також проходить персонал.

Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів включає у себе підготовку засобів для обробки рук, для обробки обладнання та поверхонь приміщень.

Розчини дезінфікуючих засобів повинні бути приготовані у відповідності до «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків», затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001р. № 502 та мають бути дозволені для використання у біотехнологічній промисловості.

ДР 1.1.1 Приготування розчину миючого засобу для прибирання приміщень та мийки обладнання

Робочий розчин готується шляхом розчинення синтетичного мийного засобу у кількості 50 г у 10 л води питної температурою 40-50 °С у реакторі-змішувачі та подається до ДР 1.3.1, ДР 1.3.2, ДР 1.4.1. Розчин зберігається у закритій тарі протягом двох тижнів.

ДР 1.1.2 Приготування розчину для обробки рук

Робочий розчин етилового спирту для обробки рук концентрацією 76% готується додаванням до 100 частин 96%-го етилового спирту 26,3 частин води питної температури 20°С. Готовий розчин направляється до ДР 1.2.3.

ДР 1.1.3 Приготування розчинів для обробки обладнання та поверхонь приміщень

Етап включає у себе приготування розчинів пероксиду водню, що використовуються для знезараження поверхонь приміщень та обладнання.

ДР 1.1.3.1 Приготування розчину пероксиду водню для щоденного прибирання

					<i>ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ</i>	Арк. 70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Робочий розчин пероксиду водню з концентрацією 1%, який використовується для дезінфекції виробничих приміщень, готується розведенням 33%-го розчину пероксиду водню питною водою до необхідної концентрації та направляється до ДР 1.3.1.

ДР 1.1.3.2 Приготування розчину пероксиду водню для генерального прибирання

Робочий розчин пероксиду водню з концентрацією 6%, який використовується для генерального прибирання та дезінфекції технологічного обладнання та комунікацій, готується розведенням 33%-го розчину пероксиду водню питною водою до необхідної концентрації та направляється до ДР 1.3.2 [114].

ДР 1.1.3.3 Приготування розчину хлораміну

Двовідсотковий (2%) розчин Хлораміну Б готують розчиненням 200 мл Хлораміну Б у 10 л теплої води (50-60° С) у реакторі. Розчин хлораміну Б застосовують для обробки усіх типів поверхонь і для передстерилізаційної очистки і направляють до ДР 1.4.2.

ДР 1.2 Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає у себе санітарну підготовку, навчання персоналу, включаючи інструктаж з техніки безпеки, та підготовку персоналу до роботи на певному робочому місці.

ДР 1.2.1 Санітарна підготовка персоналу

Для підтримки належного стану персоналу здійснюється контроль стану здоров'я при прийомі працівників на роботу, направлення працівників до медичного закладу на проходження регулярного повного медичного огляду один раз на рік для запобігання поширенню інфекцій.

ДР 1.2.2 Навчання персоналу

Навчання персоналу передбачає проходження інструктажів з техніки безпеки, зокрема первинних інструктажів при прийомі на роботу, додаткових інструктажів про роботу в асептичних умовах для працівників відповідних виробничих підрозділів, а також навчання персоналу, що займатиметься

технічним обслуговуванням, щодо заходів запобігання можливих ризиків для здоров'я. Передбачена також періодична перепідготовка персоналу.

ДР 1.2.3 Підготовка персоналу до роботи

До роботи допускають виключно здоровий та навчений персонал, який володіє необхідними навичками та відповідним кваліфікаційним рівнем знань. За необхідності персонал забезпечується засобами індивідуального захисту – халатами, рукавичками, окулярами, бахілами. Перед роботою у виробничих приміщеннях здійснюється обробка рук персоналу дезінфікуючим розчином етилового спирту від ДР 1.1.2 концентрацією 76% [115].

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

Дана підстадія включає у себе прибирання виробничих приміщень – щоденне та генеральне.

ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

Щоденне вологе прибирання виробничих приміщень здійснюється з використанням розчину миючого засобу від ДР 1.1.1 з розрахунком 100 мл/м² підлоги та розчином перекису водню від ДР 1.1.3.1 після кожної зміни у визначеній на виробництві послідовності за відповідною методикою. Відпрацьовані розчини направляють до ЗВ. Щоденне прибирання включає вологе прибирання поверхонь приміщення (підлога, двері, дверні ручки, підвіконня, столи тощо) з подальшим промиванням теплою водою та висушуванням. Здійснюють візуальний контроль чистоти поверхонь після прибирання. Для збільшення ефективності прибирання перед здійсненням відновлення музейної культури проводять додаткове опромінювання лабораторії ультрафіолетовим випромінюванням.

ДР 1.3.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання здійснюють не рідше, ніж двічі на місяць, використовуючи розчин миючого засобу від ДР 1.1.1 та дезінфікуючи приміщення розчином перекису водню від 1.1.3.2. Після закінчення робочого дня здійснюють опромінювання приміщення ультрафіолетом, тривалість 2 год [114]. Відпрацьовані розчини направляють до ЗВ 9.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

Підстадія включає мийку, ополіскування обладнання, перевірку на герметичність та стерилізацію, а також мийку вузлів обладнання.

ДР 1.4.1 Мийка обладнання та вузлів

Миття реакторів здійснюється автоматично за допомогою СІП-мийки. У бак для мийного засобу заливається розчин синтетичного мийного засобу від ДР 1.1.1 та встановлюються необхідні параметри – температура 50-60 °С, тривалість процесу 30 хвилин.

Знімні частини обладнання (вузли), що безпосередньо контактують із сировиною або проміжними продуктами, знімаються, розбираються, їх миття відбувається вручну розчинами синтетичних миючих засобів [114]. Відпрацьований мийний розчин направляють до ЗВ 9.

ДР 1.4.2 Дезінфекція обладнання і комунікацій

Дезінфекцію проводять розчином хлораміну Б від ДР 1.1.3.3, спосіб та тривалість дезінфекції залежить від виду та призначення обладнання. Дезінфекцію хлораміном Б також проводять після завершення кожного виробничого циклу, після миття обладнання. Відпрацьований розчин хлораміну відправляють до ЗВ 9.

ДР 1.4.3 Ополіскування обладнання

Обладнання після мийки ополіскується водою питною для видалення залишків забруднень та миючих засобів. Здійснюється обов'язковий візуальний контроль якості відмивки (за рН).

ДР 1.4.4 Перевірка на герметичність

Перевірка на герметичність здійснюється шляхом створення в апараті надлишкового тиску 0,2 МПа протягом 30 хв зі спостереженням за показами манометра. Герметичність підтверджується сталими показами манометра.

ДР 1.4.5 Стерилізація обладнання

Стерилізацію обладнання та вузлів здійснюють гострою парою за тиску 0,2-0,3 МПа при температурі 140 °С, тривалість процесу 20-40 хвилин [114].

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1 Підготовка технічного стерильного аераційного повітря

Виробництво біопрепарату на основі гриба *T. harzianum* вимагає асептичних умов. При проведенні допоміжних робіт окрема увага приділяється не тільки стерилізації поживного середовища, мийці та дезінфекції обладнання, а й також підготовці стерильного повітря для аерації при здійсненні виробничого культивування. Повітря, що використовуватиметься для аерації, має підвищені вимоги до ступеня чистоти та стабільності термодинамічних показників.

ДР 2.1.1 Забір повітря з атмосфери

Забір повітря здійснюють через забірний пристрій, у найменш забрудненому та загазованому місці у найвищій точці 8-10 м над землею. Мікробіологічна забрудненість повітря у місцевості залежить від таких факторів, як пора року, вологість повітря, швидкість вітру, запиленість ґрунтів у місцевості.

ДР 2.1.2 Механічна очистка повітря

Уже у трубопроводі повітря проходить крізь решітку, яка видаляє крупні механічні частки. Очистка повітря від пилу, дрібних механічних домішок та частини мікроорганізмів відбувається у фільтрі класу G, який дозволяє затримувати частинки розміром більше 5 мкм. Коефіцієнт проскоку від загального вмісту пилу у повітрі становить 10%.

ДР 2.1.3 Нагнітання повітря

Нагнітання повітря для забезпечення тиску в системі і проходження наступних етапів фільтрації здійснюється за допомогою компресора, який стискає повітря до 0,2 МПа. Внаслідок стискання повітря нагрівається до температури 100-120 °С, тому для створення оптимальних умов для вирощування мікроорганізмів потребує подальшої стабілізації показників повітря.

ДР 2.1.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря

Повітря через вентилятор надходить до нагрівальної колони, де відбувається усереднення та стабілізація його термодинамічних показників: температура 20-30 °С, вологість до 60-70%. Волога під час охолодження переходить у краплі конденсату, уловлюється та виводиться у каналізацію.

ДР 2.1.5 Очистка повітря на головному фільтрі

Другий рівень очистки проводиться на фільтрах класу F, що дозволяють очистити повітря від частинок розміром більшим за 1,5 мкм (від залишків пилу та мікроорганізмів). Головний фільтр забезпечує очищення повітря на 95%.

ДР 2.1.6 Очистка повітря на індивідуальному фільтрі

На даному етапі очистка стиснене повітря подається на індивідуальний фільтр тонкої очистки класу H та очищується від часток, розмір яких перевищує 0,3 мкм. Максимальний ступінь очищення, який забезпечується на даному етапі – 99,999% [116, 117].

ДР 2.2 Підготовка вентиляційного повітря

Стадії підготовки вентиляційного повітря до очистки повітря на головному фільтрі аналогічні таким підготовки аераційного повітря, однак очистка на головному фільтрі здійснюється з використанням фільтру класу HEPA.

ДР 2.2.1 Забір повітря з атмосфери

Забір повітря здійснюється через забірний пристрій у найменш забрудненому та загазованому місці у найвищій точці 8-10 м. Мікробіологічна забрудненість повітря залежить від пори року, вологості повітря, швидкості вітру, запиленості ґрунтів у місцевості.

ДР 2.2.2 Механічна очистка повітря

У трубопроводі повітря проходить крізь решітку, яка видаляє крупні механічні частки. Очистка повітря від пилу, більш мілких механічних домішок та частини мікроорганізмів відбувається у фільтрі класу G, який затримує частинки розміром більше 5 мкм. Ефективність фільтрування становить близько 90%.

ДР 2.2.3 Нагнітання повітря

Нагнітання повітря для забезпечення тиску в системі і проходження наступних етапів очистки здійснюється за допомогою вентилятора відцентрового, який стискає повітря до тиску 0,5-1 кПа. Швидкість повітря – 2-6 м/с.

ДР 2.2.4 Очистка повітря на головному фільтрі

Очищення здійснюється у повітряному фільтрі HEPA класу E11. Він затримує частинки розміром до 1,5 мкм, забезпечуючи ефективність очищення повітря у 95% [118].

ДР 3. Приготування робочих розчинів

Для регулювання рН при здійсненні вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування готуються розчини лугу – гідроксиду натрію – та соляної кислоти.

ДР 3.1 Приготування розчину лугу

Для приготування розчину лугу 1 кг кристалічного гідроксиду натрію розчиняють у 9 л води у реакторі. Готовий розчин має концентрацію 10% і направляється до ТП 5.3 та ТП 6.

ДР 3.2 Приготування розчину кислоти

До місткості, наповненою питною водою температури 20 °С, вводять концентровану соляну кислоту (концентрація 35%) з розрахунку 0,376 л кислоти на кожний літр води у реакторі. рН готового розчину 1,0. Готовий розчин 0,1Н соляної кислоти направляється до ТП 5.3 та ТП 6 [119, 120].

ДР 4. Підготовка поживного середовища

Отримання посівного матеріалу у колбах і посівному ферментері та виробниче культивування здійснюється на рідкому комплексному поживному середовищі наступного складу, г/л:

Кукурудзяний екстракт – 7,5;

Меляса бурякова – 20;

Сульфат амонію – 0,5;

Калій фосфорнокислий однозаміщений – 0,5;

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 76
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Калій фосфорнокислий двозаміщений 3-водний – 0,5;

Магнію сульфат 7-водний – 0,2.

синтетичний піногасник (пропінол Б-400) – 0,1% [121].

Стадія включає у себе приготування поживних середовищ для отримання посівного матеріалу у колбах, у посівному ферментері та для виробничого культивування, підготовку піногасника.

ДР 4.1 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу у колбах

Усі компоненти поживного середовища, окрім піногасника, змішуються у качалочній колбі за допомогою дозатора, рН середовища доводиться до 6,0 за допомогою лугу NaOH від ДР 3.1 або кислоти HCl від ДР 3.2. Середовище в колбах стерилізуються в автоклаві подачею насиченої водяної пари під тиском 0,1 МПа при температурі 120 °С протягом 60 хвилин.

Проводять контроль мікробіологічної чистоти готового середовища. Стерильне поживне середовище направляють до ТП 5.2.

ДР 4.2 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу у посівному ферментері та виробничого культивування

Підстадія включає попередню стерилізацію термостабільних та термолабільних компонентів поживного середовища для отримання посівного матеріалу у посівному ферментері та виробничого культивування та змішування стерилізованих компонентів.

ДР 4.2.1 Стерилізація термостабільних компонентів поживного середовища

Усі компоненти поживного середовища, окрім меляси та піногасника, вносяться у ферментери (посівний та виробничий) при постійному перемішуванні та стерилізуються гострою парою 0,2 МПа при температурі 140 °С протягом 120 хв з подальшим охолодженням до 30 °С.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 4.2.2 Стерилізація термолабільних компонентів поживного середовища

Меляса та кукурудзяний екстракт стерилізується окремо від інших компонентів середовища. Меляса з додаванням води подається у реактор-змішувач, розігрівається до 80 °С, далі глухою парою нагрівається до 120 °С і витримується протягом 2 хв. Після цього меляса та кукурудзяний екстракт охолоджуються до 25-30 °С і вносяться до інших змішаних стерильних компонентів у посівний або виробничий ферментери.

ДР 4.2.3 Змішування компонентів поживного середовища

Усі простерилізовані компоненти змішуються у ферментері, температуру поживного середовища знижують до 25-30 °С, а його рН доводять до 6,0 за допомогою лугу (10% NaOH) або кислоти (0,1N HCl) від ДР 3.1 та ДР 3.2 відповідно. Проводять контроль мікробіологічної чистоти готового середовища. Стерильне поживне середовище направляють до ТП 5.3 та до ТП 6.

ДР 4.3 Підготовка піногасника

В якості піногасника використовується пропінол Б-400 в кількості 0,1% від робочого об'єму апарата [121]. Піногасник стерилізують у реакторі нагріванням до 125-128°С протягом 2 годин. Стерильний піногасник направляється до ТП 5.3 та ТП 6.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1 Відновлення музейної культури *T. harzianum*

Музейну культуру штаму *Trichoderma harzianum* MSB1211 асептично висівають на скошений сусло-агар у пробірки, інкубують у термостаті при температурі 28 °С протягом 7 діб.

ТП 5.2 Отримання посівного матеріалу у колбах

Семидобову культуру від ТП 5.1 стерильною лопаткою або шпателем переносять у качалочні колби об'ємом 1,0 л, які містять 600 мл поживного середовища. Колби з культурою поміщають на качалки, культивування проводять у термостатованому приміщенні зі сталою температурою 25-30 °С.

Культура вирощується у колбах протягом 72-96 годин при частоті обертання качалки 180 об/хв.

ТП 5.3 Отримання посівного матеріалу у посівному ферментері

Вирощений посівний матеріал разом із середовищем від ТП 5.2 переносять у посівний ферментер об'ємом 0,63 м³ у кількості 10% від об'єму середовища, коефіцієнт заповнення ферментеру – 0,6 від номінального об'єму, поживне середовище від ДР 4.2.3. Перемішування комбіноване – за допомогою повітря через барботер та лопатевої мішалки. Аерація – 0,5 м³/(м³·хв), частота обертання мішалки – 150 об/хв. Культивування проводять при температурі 25±1 °С та рН 6,0 протягом 3 діб [7, 19, 121].

ТП 6. Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюється у ферментері об'ємом 5,0 м³ з коефіцієнтом заповнення від номінального об'єму 0,6. Посівний матеріал з посівного ферментеру від ДР 5.3 стерильно перекачується у виробничий ферментер до поживного середовища від ДР 3.3 у кількості 10% від об'єму середовища. Культивування проводиться при температурі 25±1 °С, рН 6,0 при неперервному змішаному перемішуванні за рахунок барботування повітря та механічного перемішування лопатевою мішалкою. Аерація – 0,5 л/(л·хв), швидкість обертання мішалки – 160 об/хв. Тривалість процесу виробничого культивування – 3-4 доби.

За необхідності у процесі виробничого культивування у ферментер вводиться стерильний піногасник від ДР 4.4 .

Вихід біомаси становить близько 24,2 г/л, кінцевий титр клітин – 1×10^7 – 1×10^9 КУО/см³ [7, 19, 121].

ПМВ 7. Фасування готового продукту

Фасування готового продукту – рідкого біопрепарату – відбувається на автоматичній лінії у флакони з поліетилену низького тиску об'ємом 1 л. Кришки флаконів запаюються індукційною запайкою. Кожна пакувальна одиниця має етикетку з паперу етикетного, що містить інформацію про продукт.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ПМВ 8. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту

Флакони з готовим препаратом пакуються у вторинну тару – ящики з гофрованого картону – рядками. Внутрішню поверхню ящиків, включаючи верх, без зазорів і проміжків, покриває підпергамент марки П-3 ДСТУ ГОСТ 1760:2018. На пакувальні матеріали наноситься маркування печаткою або тисненням.

Пакування та маркування здійснюється у відповідності до ГОСТ 28471 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение».

ЗВ 9. Знешкодження відходів та промислових викидів

Відпрацьоване повітря та конденсат після виробничого циклу знезаражується та стерилізується. Очищення зараженого повітря відбувається шляхом проходження його через сепаратор із наступною доочисткою у скрубери.

Стічні води, що містять рідкі відходи виробництва (промивні дезінфікуючі розчини, відпрацьована вода, залишки розчинів для санітарної обробки виробництва), відродяться у міську каналізацію та піддаються доочищенню. Суміші агресивних хімічних речовин відправляються на нейтралізацію. Здійснюють нейтралізацію промивних вод до $\text{pH} = 7,0$.

Тверді відходи виробництва – склобій, одноразові засоби індивідуального захисту (рукавички, маски, бахіли, шапки), браковані флакони та кришки, утилізуються на міському сміттєзвалищі.

ПВ 10. Переробка відходів

Фільтрувальні матеріали, використані на етапі підготовки повітря, підлягають повторному використанню. Відновлення фільтрів здійснюється відмочуванням їх у гарячій воді, очищенням та обробкою дезінфікуючими розчинами.

4.4 Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва – діляниць приготування поживного середовища, отримання посівного матеріалу, виробничого культивування,

					<i>ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ</i>	Арк. 80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

фасування готового продукту – наведений у табл. 4.2. Матеріальний баланс розраховано з урахуванням об'єму ферментеру (номінальний об'єм – 5,0 м³, коефіцієнт заповнення – 0,6) на одну серію готової продукції – 2690 флаконів по 1 л.

Таблиця 4.2 – Матеріальний баланс виробництва

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ДР 4.2	Меляса	61,2			ДР 4.2	Поживне середовище			2983,6
	Кукурудзяний екстракт	22,95				Втрати (2%)			59,67
	Амоній сірчистоокислий (NH ₄) ₂ SO ₄	1,53							
	Магнію сульфат 7-водний	0,612							
	Калій фосфорн-окислий двозаміщений	1,53							
	Калій фосфорно-кислий однозаміщений	1,53							
	Піногасник пропінол Б-400	0,00306							
	Вода питна			2953,59					
Всього:		3043,31			Всього:		3043,31		

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ТП 5.3	Поживне середовище від ДР 4.2			283,64	ТП 5.3	Посівний матеріал до ТП 6			300
	Посівний матеріал з колб від ТП 5.2			28,36		Втрати з виносом повітря (4%)			12
Всього:		312			Всього:		312		
ТП 6	Поживне середовище від ДР 4.2			2700	ТП 6	Рідкий біопрепарат до ПМВ 7			2700
	Посівний матеріал від ТП 5.3			300		Втрати з виносом повітря (10%)			300
Всього:		3000			Всього:		3000		
ПМВ 7	Культуральна рідина			2700,0	ПМВ 7	Готовий упакований препарат		2690	
	Флакони поліетиленові 1 л		2690					2690	
	Кришки поліетиленові з індукційною запайкою		2690					2690	
	Етикетки		2690					2690	
						Втрати			10
Всього:		10770			Всього:		10770		

4.5 Контроль виробництва

Перелік контрольних точок, що забезпечують виконання технологічного режиму виробництва, наведено у табл. 4.3.

Таблиця 4.3 – Контроль виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика
1	2	3	4	5
ДР 1.1.1 Приготування розчину миючого засобу для прибирання приміщень та мийки обладнання К _т	Вода технічна Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	40-50 °С
ДР 1.1.1 Приготування розчину миючого засобу для прибирання приміщень та мийки обладнання К _х	Розчин миючого засобу Концентрація	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	0,5%
ДР 1.1.2 Приготування розчину для обробки рук К _т	Розчин етилового спирту Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	20 °С

Продовження таблиці 4.3

ДР 1.1.2 Приготування розчину для обробки рук К _т	Розчин етилового спирту Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	76%
ДР 1.1.3.1 Приготування розчину пероксиду водню для щоденного прибирання К _х	Розчин пероксиду водню Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	1%
ДР 1.1.3.2 Приготування розчину пероксиду водню для щоденного прибирання К _х	Розчин пероксиду водню Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	6%
ДР 1.1.3.3 Приготування розчину хлораміну К _т	Вода технічна Температура	Візуальний, термометр	Кожну операцію	50-60 °С
ДР 1.1.3.3 Приготування розчину хлораміну К _х	Розчин хлораміну Б Концентрація	Візуальний, аналітичний	Кожну операцію	2%

Продовження таблиці 4.3

ДР 1.2.3 Підготовка персоналу до роботи К _м	Чистота рук виробничого персоналу	Мікробіологічний	1 раз на 2 тижні	Обробка рук
	Мікробна контамінація			Не більше 200 КУО
ДР 1.3.1 Щоденне прибирання К _т	Приміщення та поверхні Візуальна забрудненість поверхонь	Візуальний	Кожну операцію	Відсутність видимих забруднень поверхонь
ДР 1.3.2 Генеральне прибирання К _т	Приміщення та поверхні Візуальна забрудненість поверхонь	Візуальний	Кожну операцію	Відсутність видимих забруднень поверхонь
ДР 1.3.2 Генеральне прибирання К _т	Поверхні Мікробіологічна забрудненість поверхонь	Змиви з поверхонь та висів на чашки Петрі	Кожну операцію	Не більше 200 КУО
ДР 1.4.1 Мийка обладнання та вузлів К _т	Миючий розчин Температура	Візуальний, термометр	Кожну операцію	50-60 °С
	Режим мийки обладнання Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	30 хв
ДР 1.4.3 Ополіскування обладнання та комунікацій К _т	Режим ополіскування обладнання і комунікацій Візуальна забрудненість	Візуальний	Кожну операцію	Відсутність залишків забруднень і миючих засобів

Продовження таблиці 4.3

ДР 1.4.3 Ополіскування обладнання та комунікацій К _х	Вода питна Показник рН	рН-метр, візуальний	Кожну операцію	7,0
ДР 1.4.4 Перевірка на герметичність К _т	Режим перевірки на герметичність Тиск	Манометр, візуальний	Кожну операцію	0,2 МПа
	Режим перевірки на герметичність Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	30 хв
ДР 1.4.5 Стерилізація обладнання К _т	Режим стерилізації обладнання Тиск	Манометр, візуальний	Кожну операцію	0,2-0,3 МПа
	Режим стерилізації обладнання Температура	Годинник, візуальний	Кожну операцію	140 °С
	Режим стерилізації обладнання Тривалість	Термометр, візуальний	Кожну операцію	20-40 хв
ДР 2.1.1 Забір повітря з атмосфери К _т	Забірний пристрій Висота забору повітря	Геодезичний контроль геометричних параметрів	Одноразово	8-10 м
ДР 2.1.2 Механічна очистка повітря К _т	Повітря аераційне Ефективність очистки	Аспіраційний, датчик запиленості, візуальний	2 рази на місяць	90%

Продовження таблиці 4.3

ДР 2.1.3 Нагнітання повітря К _т	Режим компресіонуван- ня повітря Тиск	Манометр, візуальний	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 2.1.4 Стабілізація термодинаміч- них показників повітря К _т	Повітря аераційне Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	20-30 °С
	Повітря аераційне Вологість	Психрометр, візуальний	Кожну операцію	60-70%
ДР 2.1.5 Очистка повітря на головному фільтрі К _т	Повітря аераційне Ефективність очистки	Аспіраційний, датчик запиленості, візуальний	2 рази на місяць	95%
ДР 2.1.6 Очистка повітря на індивідуаль- ному фільтрі К _т	Повітря аераційне Ефективність очистки	Аспіраційний, датчик запиленості, візуальний	2 рази на місяць	99,999%
ДР 2.2.2 Механічна очистка повітря К _т	Повітря вентиляційне Ефективність очистки	Аспіраційний, датчик запиленості, візуальний	2 рази на місяць	90%
ДР 2.2.3 Нагнітання повітря К _т	Режим компресіонуван- ня повітря Тиск	Манометр, візуальний	Кожну операцію	0,5-1 кПа

Продовження таблиці 4.3

ДР 2.2.4 Очистка повітря на головному фільтрі К _т	Повітря вентиляційне Ефективність очистки	Аспіраційний, датчик запиленості, візуальний	2 рази на місяць	95%
ДР 3 Приготування робочий розчинів К _т	Вода питна Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	20 °С
ДР 3.1 Приготування розчину лугу К _х	Розчин гідроксиду натрію NaOH Концентрація	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	10%
ДР 3.2 Приготування розчину кислоти К _х	Розчин соляної кислоти HCl Концентрація	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	1Н
ДР 4 Підготовка поживного середовища К _т	Режим перемішування компонентів поживного середовища Частота обертів	Тахометр, візуальний	Кожну операцію	~ 100 об/хв

Продовження таблиці 4.3

ДР 4 Підготовка поживного середовища К _x	Поживне середовища Концентрація меляси	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	20 г/л
	Поживне середовища Концентрація кукурудзяного екстракту	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	7,5 г/л
	Поживне середовища Концентрація (NH ₄) ₂ SO ₄	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	0,5 г/л
	Поживне середовища Концентрація KH ₂ PO ₄	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	0,5 г/л
	Поживне середовища Концентрація K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	0,5 г/л
	Поживне середовища Концентрація MgSO ₄ ·7H ₂ O	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	0,2 г/л
	Поживне середовища Концентрація піногасника пропінолу Б-400	Аналітичний, візуальний	Кожну операцію	0,1%

Продовження таблиці 4.3

ДР 4.1 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу у колбах К _т	Режим стерилізації поживного середовища Тиск	Манометр, візуальний	Кожну операцію	0,1 МПа
	Режим стерилізації поживного середовища Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	120 °С
	Режим стерилізації поживного середовища Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	60 хв
ДР 4.1 Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу у колбах К _х	Поживне середовище для отримання посівного матеріалу у колбах Показник рН	рН-метр, візуальний	Кожну операцію	6,0
ДР 4.2.1 Стерилізація термостабіль- них компонентів поживного середовища К _т	Режим стерилізації компонентів Тиск	Манометр, візуальний	Кожну операцію	0,2 МПа
	Режим стерилізації компонентів Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	140 °С

Продовження таблиці 4.3

ДР 4.2.1 Стерилізація термостабіль- них компонентів поживного середовища К _т	Режим стерилізації поживного середовища Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	120 хв
Р 4.2.1 Стерилізація термостабіль- них компонентів поживного середовища К _м	Розчин термостабільних компонентів Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4.2.2 Стерилізація термолабіль- них компонентів поживного середовища К _т	Режим розігріву компонентів Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	80 °С
	Режим стерилізації компонентів Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	120 °С
	Режим стерилізації компонентів Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	2 хв
Р 4.2.1 Стерилізація термостабіль- них компонентів поживного середовища К _м	Розчин термостабільних компонентів Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

91

Продовження таблиці 4.3

ДР 4.2.3 Змішування компонентів поживного середовища К _т	Поживне середовище Режим змішування	Тахометр, візуальний	Кожну операцію	~ 100 об/хв
	Поживне середовище Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	25-30 °С
ДР 4.2.3 Змішування компонентів поживного середовища К _х	Поживне середовище Показник рН	рН-метр, візуальний	Кожну операцію	6,0
ДР 4.2.3 Змішування компонентів поживного середовища К _м	Поживне середовище Мікробіологічна чистота	Біоіндикатори, візуальний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4.3 Підготовка піногасника К _т	Режим стерилізації піногасника Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	125-128 °С
	Режим стерилізації піногасника Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	120 хв
ДР 4.3 Підготовка піногасника К _м	Піногасник Мікробіологічна чистота	Біоіндикатори, візуальний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці 4.3

ТП 5.1 Відновлення музейної культури <i>T. harzianum</i> К _т	Режим культивування Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	28 °С
	Режим культивування Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	7 діб
ТП 5.1 Відновлення музейної культури К _м	Культура <i>T. harzianum</i> Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний, візуальний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 5.2 Отримання посівного матеріалу у колбах К _т	Режим культивування Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	25-30 °С
	Режим культивування Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	72-96 годин
	Режим культивування Частота обертання качалки	Тахометр, візуальний	Кожну операцію	180 об/хв
ТП 5.2 Отримання посівного матеріалу у колбах К _м	Посівний матеріал у колбах Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний, візуальний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці 4.3

ТП 5.3 Отримання посівного матеріалу у посівному ферментері К _т	Посівний ферментер Заповнення посівного ферментеру	Рівнемір, візуальний	Кожну операцію	0,6
	Режим культивування Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	25±1 °С
	Режим культивування Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	3 доби
	Режим культивування Частота обертання мішалки	Тахометр, візуальний	Кожну операцію	150 об/хв
	Режим культивування Витрата аераційного повітря	Витратомір, візуальний	Кожну операцію	0,5 м ³ /(м ³ ·хв)
ТП 5.3 Отримання посівного матеріалу у посівному ферментері К _х	Посівний матеріал Показник рН	рН-метр	Кожну операцію	6,0
ТП 5.3 Отримання посівного матеріалу у посівному ферментері К _м	Посівний матеріал у колбах Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний, візуальний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

94

Продовження таблиці 4.3

ТП 6 Виробниче культивування К _т	Посівний ферментер Заповнення посівного ферментеру	Рівнемір, візуальний	Кожну операцію	0,6
	Режим культивування Температура	Термометр, візуальний	Кожну операцію	25±1 °С
	Режим культивування Тривалість	Годинник, візуальний	Кожну операцію	3-4 доби
	Режим культивування Частота обертання мішалки	Тахометр, візуальний	Кожну операцію	160 об/хв
	Режим культивування Витрата аераційного повітря	Витратомір, візуальний	Кожну операцію	0,5 м ³ /(м ³ ·хв)
ТП 6 Виробниче культивування К _х	Культуральна рідина Показник рН	рН-метр	Кожну операцію	6,0
ТП 6 Виробниче культивування К _м	Культуральна рідина (готовий препарат) Мікробіологічна чистота	Мікробіологічний, візуальний	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
	Культуральна рідина Титр клітин	Мікробіологічний, візуальний	Кожну операцію	1×10 ⁷ –1×10 ⁹ КУО/см ³

Кінець таблиці 4.3

ПМВ 7 Фасування готового продукту К _т	Флакони з препаратом Герметичність запайки	Візуальний	Кожну операцію	Відсутність порушень герметичності запайки
ПМВ 8 Пакування, маркування, відвантаження готового продукту К _т	Вторинна тара з готовим продуктом Кількість флаконів	Візуальний	Кожну операцію	n = 20 штук
ЗВ 9 Знешкодження відходів та промислових викидів К _х	Промивні води Показник рН	рН-метр, візуальний	Кожну операцію	7,0
ПВ 10 Переробка відходів К _т , К _х , К _м	Фільтрувальні матеріали етапу підготовки повітря Вологість, мікробіологічна чистота, наявність фізичних, хімічних забруднень	Психрометр, фізико-хімічний, мікробіологічний, візуальний	Кожну операцію	У відповідності до НТД для даного матеріалу

РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

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

Вибір обладнання для біотехнологічних процесів повинен враховувати такі їх особливості, як:

- чутливість біологічних агентів до фізико-хімічних впливів;
- наявність переносу речовин між різними фазами (типу «рідина-клітини», «газ-рідина-клітини»);
- вимоги до умов асептики;
- низькі швидкості перебігу біохімічних процесів;
- нестабільність цільових продуктів;
- піноутворення;
- складні механізми регуляції росту та біосинтезу [122].

Головний об'єкт виробничого культивування – культуральна рідина, яка по суті являє собою гетерогенну систему, у якій присутні щонайменше 3 фази, розділені між собою поверхнею фазового контакту (ПФК). Рідка фаза представлена диспергованими (розчиненими) речовинами, що беруть участь у біотехнологічному процесі (наприклад, компоненти поживного середовища). Клітини біологічного агента складають собою квазітверду фазу. Газова фаза представлена повітрям та газовими метаболітами, утвореними біологічним агентом у процесі його життєдіяльності.

Таким чином, ферментер як біологічний реактор у процесі виробничого культивування виконує декілька функцій. По-перше, ферментер забезпечує оптимальні для біологічного агента гідродинамічні умови, які у свою чергу визначають інтенсивність перебігу процесів тепло- та масообміну за умови збереження сталості основних фізико-хімічних характеристик поживного

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Корачева А.О.			РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш
Конс.		Шидецький В.Ю.				Д	97
							143
Керівн.		Сироїд О.О.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92	
Затв.							

середовища. По-друге, у ферментері формуються захищені умови, що орієнтовані на недопустимість потрапляння до системи контамінантів – у першу чергу біологічних. По-третє, ферментер по суті також функціонує як теплообмінник, забезпечуючи процеси теплообміну та зберігаючи рівновагу в системі.

Культивування біологічного агенту в багатофазній системі забезпечується одночасною реалізацією масопереносу у двох (поживне середовище – клітини біологічного агенту) або трьох (газ – поживне середовище – клітини біологічного агенту) фазах [123].

Залежно від способу культивування, що здійснюється у ферментерах, вони поділяють на апарати неперервної та періодичної дії.

За стерильністю ферментери поділяються на стерильні та ті, що не потребують строгої стерильності.

Залежно від наявності підведення стерильного повітря розрізняють ферментери для аеробного або анаеробного культивування.

Залежно від проведення процесу та способу культивування ферментери поділяються на апарати для глибинного аеробного, глибинного анаеробного або поверхневого культивування.

Обраний у проєкті біологічний агент, клітини якого разом із середовищем культивування складають основу готового біопрепарату, є міцеліальним аеробним хемогетеротрофним грибом *Trichoderma harzianum* MSB1211; основою поживного середовища виступають меляса, кукурудзяний екстракт. Для інтенсифікації процесів масо- та теплообміну між клітинами біологічного агенту та поживним середовищем обрано апарат для глибинного культивування. Серед недоліків такої конструкції, порівняно з установками для поверхневого культивування, можна вважати більш складну їх конструкцію, проте апарати обраного типу є більш сучасними та характеризуються більшою продуктивністю та рядом інших переваг, таких як забезпечення асептики, можливість автоматизації процесу культивування, можливість регулювання умов процесу тощо.

Об'єм апарату становить 5 м³. Оскільки ріст культури супроводжується піноутворенням, коефіцієнт заповнення апарату приймаємо 0,6, з урахуванням введення у середовище піногасника.

Ферментери, у яких відбуваються анаеробні або аеробні процеси, у залежності від способу введення в апарат енергії для перемішування:

- 1) ферментери з підводом енергії газовою фазою (ФГ) – барботажні, барботажно-ерліфтні, колонні, форсуночні;
- 2) ферментери з підводом енергії рідкою фазою (ФР) – ежекційні з циркуляційним контуром, із самовсмоктувальною мішалкою;
- 3) комбіновані (ФРГ) [124].

Для останнього типу конструкції основним конструктивним елементом є перемішувачий пристрій, який забезпечує високу інтенсивність розчинення кисню та високий ступінь диспергування. Це барботажні апарати з механічним перемішуванням. У ферментерах такого типу підведення рідкої фази здійснюється для перемішування, а газової фази – для аерації.

Для таких апаратів можливі три способи перемішування:

- механічний – здійснюється за допомогою механічних мішалок. Аерація може здійснюватися шляхом барботажу. Розбризкування повітря у вигляді дрібних бульбашок забезпечує механічний вібратор, встановлений поруч з барботером;
- пневматичний – здійснюється пропусканням через рідину потоку повітря. Посилення перемішування та аерації здійснюється за допомогою обертових дисків з отворами, що встановлені поблизу барботера, або за допомогою придонних пропелерів;
- циркуляційне – спрямований потік рідини по замкнутому контуру створюється насосами або ежекторами [124, 125, 126].

Найбільш розповсюдженою групою апаратів, що використовуються для культивування аеробних мікроорганізмів, є група апаратів з перемішувачими пристроями, в які енергія вводиться за допомогою механічного перемішувачого пристрою. Складовими механічних мішалок є центральний вал та лопаті різної

форми. Мішалка є рухомим робочим органом механічного перемішуючого пристрою та чинить безпосередній вплив на середовище культивування. Головною перевагою апаратів із механічними перемішуючими пристроями є високі швидкості масообміну кисню та значна економія потужності [123, 127].

Характер руху середовища при перемішуванні за допомогою механічного перемішуючого пристрою залежить від таких технічних особливостей, як конструкція та параметри роботи мішалки та конструкція апарату, у якому відбувається процес.

Вибір типу перемішуючого для ферментеру ґрунтується на знанні наступних факторів:

- в'язкість середовища культивування;
- необхідна інтенсивність перемішування для процесу.

Окрім цього, при виборі типу мішалки також враховуються особливості біологічного агенту, характер часток у середовищі, кількість фаз та ін.

Основні переваги апаратів, оснащений механічними перемішуючими пристроями – мобільність та універсальність. Із їх допомогою можна створити будь-який гідродинамічний режим, оптимальний для даного біологічного агенту, змінюючи швидкість обертання мішалки, циркуляції рідини, що перекачується насосом, або руху газової фази. Мішалка у такому апараті забезпечує гомогенність взаємодіючих фаз, а також необхідну інтенсивність транспорту субстратів та газів (включаючи кисень) за рахунок високого рівню диспергування газової фази [123].

Перемішування у ферментері може забезпечуватися різними типами мішалок, такими як лопатеві, якірні, рамні, турбінні або трьохлопатеві (пропелерні) та ін. (рис. 5.1). У біотехнологічних виробництвах зазвичай надають перевагу швидкісним мішалкам – лопатевим, гвинтовим та турбінним, які працюють при в'язкості культуральної рідини не більше 50 Па·с.

У промислових ферментерах зазвичай використовуються механічні мішалки з обертальним рухом. Робота таких мішалок приводить до появи складного тривимірного руху рідини – тангенціального, радіального,

аксіального (осьового), у якому переважає колова складова швидкості. Таким чином по краях мішалки виникають вихорі, які зумовлюють перемішування рідкої фази [123, 128].

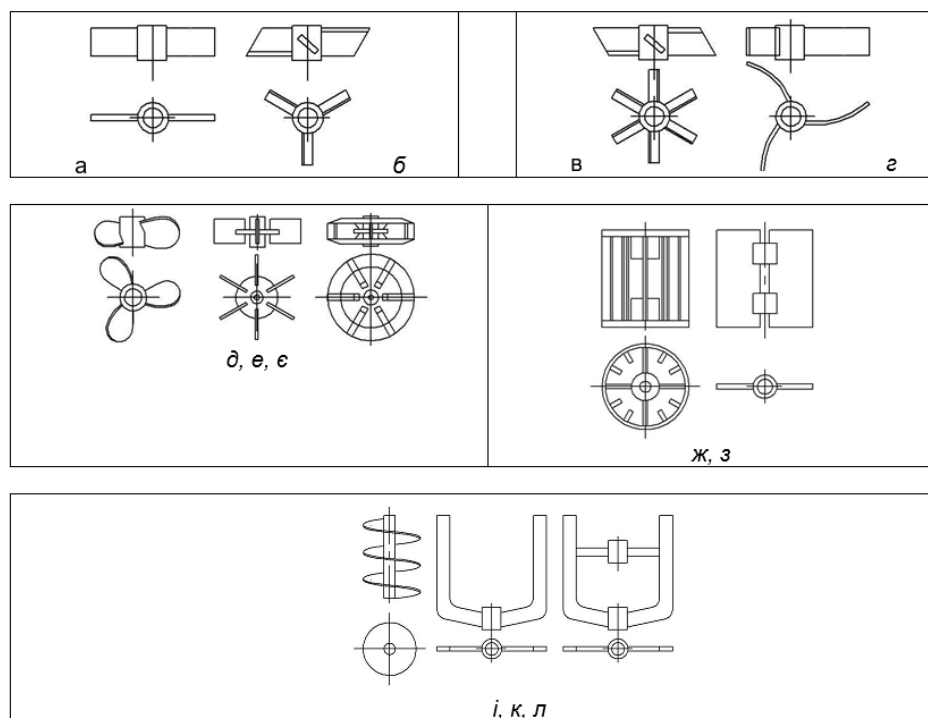


Рисунок 5.1 – Конструкції різноманітних типів мішалок:

а – лопатева мішалка; б – трьохлопатева мішалка; в – шестилопатева мішалка; г – спірально-лопатева мішалка; д – гвинтова мішалка; е – відкрита турбінна мішалка; є – закрита турбінна мішалка; ж – клітьова мішалка; з – листова мішалка; і – шнекова мішалка; к – якірна мішалка; л – рамна мішалка [123]

Застосування конструкцій з лопатевими мішалками доцільне у випадку:

- перемішування з метою суспендування, розчинення, при проведенні хімічних реакцій;
- перемішуванні взаємно розчинних рідин;
- грубому емульгуванні;
- переведенні у завислий стан волокнистих частинок тощо;
- повільному розчиненні аморфних, волокнистих речовин тощо [129].

Лопатеві мішалки мають дві лопаті та, як правило, є низькооборотними. Одною з їхніх переваг є простота конструкції та низька вартість (найчастіше),

але їхня інтенсивність їх роботи часто недостатня. Окрім цього, рідина перемішується не повністю в об'ємі апарату, що зумовлюється слабким потоком рідини уздовж осі мішалки [130].

Пропелерні (трюхлопатеві) мішалки зазвичай застосовуються для процесів, які супроводжуються перебігом хімічних реакцій. Їх застосовують при:

- розчиненні;
- емульгуванні рідин;
- переведенні у завислий стан твердих частинок (концентрація яких не перевищує 50%);
- перемішуванні волокнистих матеріалів;
- вирівнюванні температури та інтенсифікації теплообміну [129].

Застосування пропелерних мішалок є ефективним у випадку, коли потрібно забезпечити інтенсивну циркуляцію рідини при мінімальних енергетичних затратах. При суспендуванні розміри частинок повинні бути не вище 0,1-0,5 мкм, а їхній вміст – 10% [129, 131].

Якірні мішалки найкраще застосовувати, коли перемішуються в'язкі, та важкі рідини; для переведення у завислий стан твердих частинок у в'язкому середовищі; задля попередження та запобігання випадіння осаду на внутрішніх стінках і днищі апарату, а також інтенсифікації теплообміну.

Використання рамних мішалок доцільне при необхідності у забезпеченні інтенсивнішого перемішування по висоті, при перемішуванні в'язких та важких рідин, зокрема у великих об'ємах, інтенсифікації теплообміну та попередженні відкладання осаду на внутрішніх поверхнях апарату.

Турбінні мішалки застосовуються за наступним призначенням:

- інтенсивне перемішування, в особливості рідин, які значно різняться за в'язкістю;
- диспергування газу в рідині;
- розчинення, емульгування рідин;

- переведення у завислий стан кристалічних, аморфних твердих частинок при їх вміст $< 80\%$;
- переведення в завислий стан волокнистих частинок при їх вмісті $< 5\%$;
- змулювання твердих частинок при їх вмісті $< 60\%$ та розмірах до 0,15 мм;
- вирівнювання температури [129].

При виборі мішалок перевага зазвичай віддається турбінним мішалкам з радіальним потоком, оскільки вони забезпечують ефективне диспергування повітря та його контакт із рідиною в зоні мішалки, де досягається найвища міра турбулізації потоку.

Турбінні мішалки підрозділяються на відкриті (лопаті знаходяться не в корпусі) та закриті (лопаті розташовані в корпусі так, що утворюються закриті канали, подібні до ротора відцентрового насосу).

Однією з найбільш простих та високоефективних варіантів конструкції турбінної мішалки є відкрита з плоскими лопатками, розміщеними радіально.

Мішалки з плоскими лопатками, порівняно з іншими конструкціями, мають менше проскакування повітря уздовж валу та забезпечують краще диспергування повітря [129]. Обертання лопатей забезпечує створення поруч із радіальними потоками осьових потоків рідини, сприяючи тим самим інтенсивному перемішуванню культуральної рідини у великих об'ємах.

До переваг турбінних мішалок, принципів для виробництва, що описується, відносяться високі швидкості перемішування та розчинення; висока ефективність при перемішуванні в'язких рідин і рідин, що мають середню в'язкість. Недоліком таких мішалок є порівняно складний та високовартісний процес виготовлення [124, 132].

У біотехнологічних процесах турбінні мішалки часто використовуються для бережного перемішування культуральної рідини, що містить міцелій. Кількість обертів таких мішалок знаходиться в межах від 2 до 5 м/с, а колова швидкість – 3-8 м/с [133].

Таким чином, виходячи з характеристик культуральної рідини (вміст волокнистих частинок $< 2,4\%$; в'язкість $< 10 \text{ Па}\cdot\text{с}$, концентрація аморфних твердих частинок (біомаси) менше 80% , біологічний агент – міцеліальний гриб, культуральна рідина містить міцелій, спори та метаболіти гриба), обраний тип мішалки – турбінна відкрита.

Ферментер обраної конструкції (рис. 5.2) призначений для глибинного аеробного періодичного культивування.

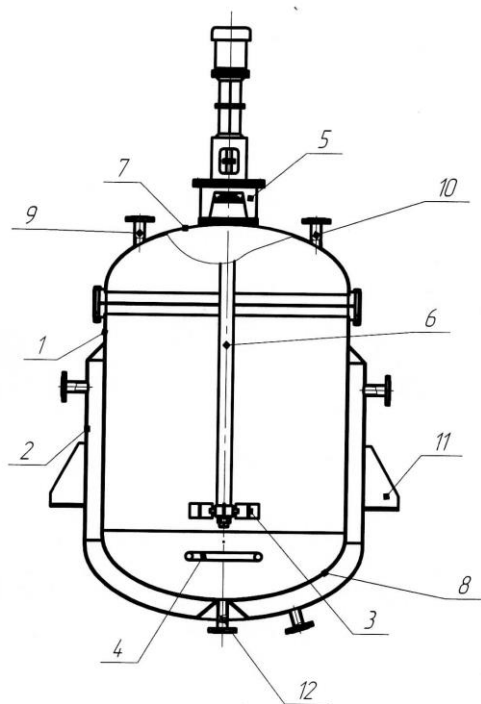


Рисунок 5.2 – Вертикальний ферментер з механічним перемішуючим пристроєм та барботером [134]

Ферментер, що проектується, являє собою вертикальну циліндричну ємність з еліптичними днищами. Він оснащений механічною турбінною мішалкою (3) і для введення у систему стерильного аераційного повітря оснащений барботером (4), що виконує функцію диспергатора газу.

Корпус ферментеру закріплений на опорах 11. Складовими корпусу апарату є обичайка (1), кришка (7) та днище (8). На кришці розміщується привід мішалки (5), патрубки (9, 10) для підведення та відведення речовин, подачі стисненого газу, встановлення контрольно-вимірювальних приладів. Апарат оснащений суцільною (оскільки його об'єм менший за $6,3 \text{ м}^3$) сорочкою (2) для

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ

Арк.

104

підведення та відведення тепла. Приводом мішалки служить електродвигун, сполучений з валом мішалки (6) прямої або заниженої передачі. Штуцер (12) призначений для зливу продукту [135].

Апарат оснащений пристроями термостатування, перемішування, регуляції рН та обладнаний системою подачі поживного середовища, пари, піногасника, води та посівного матеріалу із посівного ферментеру [116, 136]. Для забезпечення стерильності процесу та герметизації обираємо одинарне торцеве ущільнення ТСФ [129].

Середовище у ферментері володіє слабкокислою ($\text{pH} = 6,0$) реакцією, у зв'язку з чим вибір матеріалу для виготовлення ґрунтується на його відповідності ряду вимог: стійкість дії кислого середовища, окиснення та корозії (для запобігання потрапляння корозійних часточок у культуральну рідину та їхнього негативного впливу на показники готової продукції). Обираємо матеріалом, з якого виготовлений ферментер, високолеговану хромонікелеву корозійно-стійку неіржавіючу сталь марки 12Х18Н10Т за ГОСТ 5632-72 «Стали высоколегированные и сплавы коррозионно-стойкие, жаростойкие и жаропрочные». Матеріал для виготовлення валу перемішуючого пристрою – хромонікелевий нержавіючий сплав з підвищеною жароміцністю та збільшеною стійкістю до корозії 14Х17Н2 за ГОСТ 5631-72. Матеріал для виготовлення деталей зовнішніх пристроїв – вуглецева сталь ВСт3сп5 за ГОСТ 380-94 «Сталь углеродистая обыкновенного качества низколегированная» [123, 129].

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Технічна характеристика ферментера

Ферментер призначений для проведення виробничого культивування культури гриба *Trichoderma harzianum* для виробництва біопрепарату для захисту рослин.

1. Об'єм апарата, м^3 :

номінальний	5;
робочий	3.

2. Площа поверхні теплообміну сорочки, м^2	6,41.
3. Температура середовища, $^{\circ}\text{C}$:	
культурального	25;
у сорочці (середня температура теплоносія)	20.
4. Тип перемішуючого пристрою	мішалка турбінна відкрита.
5. Кількість мішалок	1.
6. Частота обертання валу мішалки, с^{-1}	2,67.
7. Потужність електродвигуна, кВт	1,5.
8. Габаритні розміри:	
довжина, мм	2040;
висота, мм	4140;
ширина, мм	2340.
9. Маса, кг	297,4.

5.2.1 Конструктивний розрахунок

Розрахунок проводиться по методиці, наведеній у навчальному посібнику Л.І. Ружинської «Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв» [129].

Вихідні дані для конструктивного розрахунку:

Номінальний об'єм апарату V_n , м^3	5.
Коефіцієнт заповнення апарату K	0,6.
Температура поживного середовища t , $^{\circ}\text{C}$	25.
Тривалість процесу культивування τ , с	345600.
Абсолютний тиск в апараті p_a , МПа	0,02.
Тип перемішуючого пристрою	турбінна мішалка.
Частота обертання мішалки n , с^{-1}	2,67.

1) Теплофізичні характеристики середовища

Основний вміст культуральної рідини складає поживне середовище, біомаса продуцента та синтезовані у процесі життєдіяльності біологічного агенту метаболіти. Оскільки компонентом, вміст якого є у середовищі

найбільшим, є м'яса (20 г/л, тобто 2%), приймаємо за модельне середовище, для якого проводитимуться розрахунки, розчин м'яса, та обчислюємо його теплофізичні характеристики:

Густина поживного середовища:

$$\rho_{\text{ПС}} = 1007,3 + 4,11(CP - 0,11t) = 1007,3 + 4,11(2 - 0,11 \cdot 25) = 1004,22 \text{ кг / м}^3$$

Динамічна в'язкість поживного середовища:

$$\begin{aligned} \mu_{\text{ПС}} &= (2,7 + 0,192CP)t^{-m} \cdot 10^{-3} = (2,7 + 0,192 \cdot 2) \cdot 25^{-0,426} \cdot 10^{-3} = \\ &= 0,783 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}, \end{aligned}$$

де $m = 0,426$.

Теплоємність поживного середовища:

$$\begin{aligned} c_{\text{ПС}} &= [4,073 - 0,00134(14,4CP - t)] \cdot 10^3 = [4,073 - 0,00134(14,4 \cdot 2 - 25)] \cdot 10^3 = \\ &= 4067,908 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}} \end{aligned}$$

Теплопровідність поживного середовища:

$$\lambda_{\text{ПС}} = 0,512 + 0,00095|t - 40| = 0,512 + 0,00095 \cdot |25 - 40| = 0,5263 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості поживного середовища:

$$\nu_{\text{ПС}} = \frac{\mu_{\text{ПС}}}{\rho_{\text{ПС}}} = \frac{0,783 \cdot 10^{-3}}{1004,22} = 0,779 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2 / \text{с}$$

Робочий об'єм ферментера становить:

$$V_p = V_n \cdot \varphi = 5 \cdot 0,6 = 3 \text{ м}^3$$

2) Параметри ферментеру

Знаючи номінальний об'єм – 5 м³, обираємо параметри ферментеру.

Обираємо реактор з еліптичним днищем та еліптичною кришкою (тип 0), з гладкою сорочкою (тип 01).

Відповідно до ГОСТ 20680-86 приймаємо:

Внутрішній діаметр апарату $D_v = 1800 \text{ мм} = 1,8 \text{ м}$;

Висота корпусу апарату $H = 2230 \text{ мм} = 2,23 \text{ м}$.

3) Параметри еліптичного днища за ГОСТ 6522-78:

Об'єм рідини в днищі $V_{\text{дн}} = 0,8617 \text{ м}^3$;

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 107
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Висота відбортаної частини днища $h_1 = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м}$;

Висота еліптичної частини днища $h_b = 450 \text{ мм} = 0,45 \text{ м}$;

Площа внутрішньої поверхні днища $F_{\text{дн}} = 3,74 \text{ м}^2$.

Товщина стінки $s = 10 \text{ мм} = 0,01 \text{ м}$.

4) Параметри мішалки

Обраний тип мішалки – турбінна відкрита (рис. 5.2):

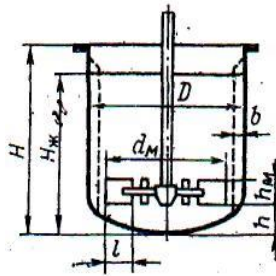


Рисунок 5.2 – Турбінна відкрита мішалка [129]

Для обраного типу мішалок дійсні співвідношення:

$$D/d_M = 3 \div 4;$$

$$h_M/d_M = 0,2;$$

$$h/d_M = 0,4 \div 1;$$

$$l/d_M = 0,25;$$

$$b/d_M = 0,1;$$

$$\xi_M = 8,4$$

Розраховуємо параметри мішалки:

$$d_M = \frac{D}{4} = \frac{1,8}{4} = 0,45 \text{ м};$$

$$h_M = 0,2d_M = 0,2 \cdot 0,45 = 0,09 \text{ м};$$

$$h = 0,8d_M = 0,8 \cdot 0,45 = 0,36 \text{ м};$$

$$l = 0,25d_M = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м};$$

$$b = 0,1d_M = 0,1 \cdot 0,45 = 0,045 \text{ м}.$$

5) Висота рівня рідини в реакторі:

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_1 + h_b = \frac{4(3 - 0,8617)}{3,14 \cdot 1,8^2} + 0,04 + 0,45 = 1,584 \text{ м}.$$

6) Розрахунок глибини воронки

Глибина воронки розраховується за формулою:

$$h_6 = \frac{Bn^2 d_m^2}{2g},$$

де B – параметр глибини воронки, g – прискорення вільного падіння, $g = 9,81$ м/с².

Параметр висоти завантаження визначаємо за формулою:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D_6} + 1 = 8 \cdot \frac{1,584}{1,8} + 1 = 8,041.$$

Обчислюємо параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_M R_{eu}^{0,25}},$$

де Re_{eu} – критерій Рейнольдса, ξ_m – коефіцієнт гідравлічного опору мішалки, для турбінної відкритої мішалки $\xi_m = 8,4$, z_M – кількість мішалок на одному валу (приймаємо $z_M = 1$).

$$Re_{eu} = \frac{n \cdot \rho_{ПС} \cdot d_m^2}{\mu_{ПС}} = \frac{2,67 \cdot 1004,22 \cdot 0,45^2}{0,783 \cdot 10^{-3}} = 692834,7$$

Таким чином, параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_M R_{eu}^{0,25}} = \frac{8,041}{8,4 \cdot 1 \cdot 692834,7^{0,25}} = 0,279$$

За значенням E по графіку на рис. 5.3 обираємо відповідне значення параметрів ψ та B : $\psi = 0,75$ $B = 11$.

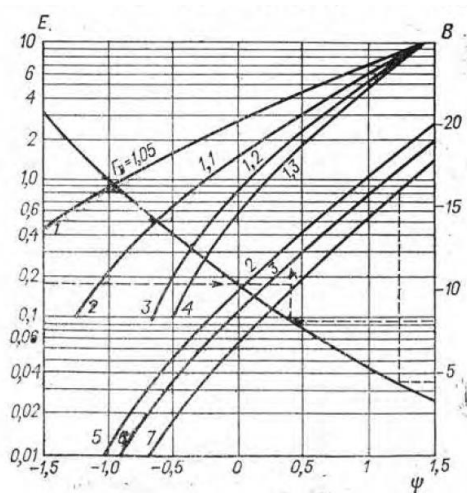


Рисунок 5.3 – Номограма до розрахунку глибини воронки для турбінної (7) мішалки [137]

Глибина воронки становить:

$$h_B = \frac{Bn^2 d_M^2}{2} = \frac{11 \cdot 2,67^2 \cdot 0,45^2}{2} = 0,807 \text{ м}$$

Розраховуємо гранично допустимо глибину воронки:

$$h_{ep} = H_p - h = 1,584 - 0,36 = 1,224 \text{ м}$$

Оскільки $h_B < h_{ep}$, встановлення перегородок в апараті не потребується.

7) Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність перемішування газорідної системи:

$$N_{p-z} = 0,695 \cdot \frac{(Eu_M \cdot \rho_{ПС})^{0,9} \cdot n^{3,15} \cdot d_M^{5,85}}{V_n^{0,25}},$$

де Eu_M – критерій Ейлера, $Eu_M = KN$ (коефіцієнт потужності), що визначається із залежності, зображеної на рис. 5.4:

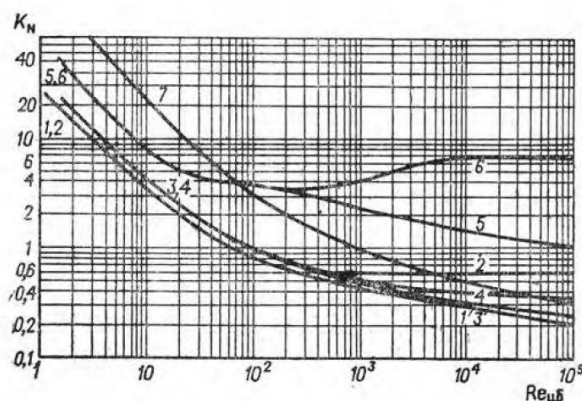


Рисунок 5.4 – Залежність $K_N = f(Re_{цв})$ для турбінної відкритої мішалки (5)

[137]

$V_{п}$ – витрати повітря в апараті, $V_{п} = 1,5 \text{ м}^3/\text{хв} = 0,025 \text{ м}^3/\text{хв}$.

$K_N = 1$, тому потужність перемішування (з урахуванням наявності барботування) становить:

$$N_{пер} = 0,695 \cdot \frac{(1 \cdot 1004,22)^{0,9} \cdot 2,67^{3,15} \cdot 0,45^{5,85}}{0,025^{0,25}} = 180,82 \text{ Вт}$$

8) Розрахунок потужності привода мішалки

Значення потужності, яка витрачається на тертя в ущільненнях валу мішалки залежить, від діаметра валу d_v в місці ущільнення, який можна визначити із наближеного співвідношення:

$$d_g = C \cdot d_m,$$

де значення коефіцієнту С для турбінної відкритої мішалки становить 0,117.

$$d_g = 0,117 \cdot 0,45 = 0,053 \text{ м}$$

Розчин (культуральну рідину) вважаємо неагресивним середовищем, приймаємо одинарне торцеве ущільнення. Потужність, яка витрачається на тертя у торцевому ущільненні

$$N_{yuz} = 6020 d_g^{1,3} = 6020 \cdot 0,065^{1,3} = 172,34 \text{ Вт}$$

Потужність привода мішалки:

$$N_{el} = \frac{[(K_n \cdot K_h)(\sum K_i \cdot N) \cdot N_{p-z} + N_{yuz}]}{\eta},$$

де K_n – коефіцієнт, що показує наявність в апараті відбивних перегородок (якщо вони є, $K_n = 1$, якщо вони відсутні $K_n = 1,25$; оскільки перегородки відсутні, застосовуємо $K_n = 1,25$);

K_h – коефіцієнт, який враховує рівень рідини в реакторі,

$$K_h = \sqrt{\frac{H_p}{D_g}} = \sqrt{\frac{1,584}{1,8}} = 0,938;$$

K_i – коефіцієнт, який враховує витрати потужності на подолання опору внутрішніх пристроїв реактора ($K_i = 1,1 \div 1,2$, приймаємо $K_i = 1,1$);

N – кількість внутрішніх пристроїв реактору ($N = 4$: трубопроводи для наповнення ферментера рідиною, для перекачування біологічного агенту; пристрої для заміру температури, рівня рідини);

η – коефіцієнт корисної дії привода (обирається в межах 0,85-0,9, приймаємо $\eta = 0,85$).

$$N_{el} = \frac{[(1,25 \cdot 0,938)(1,1 \cdot 4) \cdot 180,82 + 172,34]}{0,85} = 1300,4 \text{ Вт}$$

9) Розрахунок барботеру

Висота барботажного пристрою:

$$h_g = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м}$$

Діаметр, на якому розміщені отвори у барботері:

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 111
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$D_o = 0,5 \cdot d_m = 0,5 \cdot 0,45 = 0,225 \text{ м}$$

Діаметри отворів d_o від 2 до 5 мм, приймаємо $d_o = 2 \text{ мм} = 0,002 \text{ м}$.

Площа отвору:

$$F_o = \frac{\pi \cdot d_o^2}{4} = \frac{3,14 \cdot 0,002^2}{4} = 3,142 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2$$

Відстань від мішалки до барботера:

$$h_{мб} = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,45 = 0,1125 \text{ м}$$

Внутрішній діаметр барботеру:

$$d_{б.в} = \sqrt{\frac{4 \cdot V_n}{W_n \cdot \pi}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,025}{25 \cdot 3,14}} = 0,036 \text{ м}$$

де W_n – швидкість газу в отворах W_n приймаємо 25 м/с.

Середній діаметр барботеру:

$$D_{сер} = 6 \cdot d_{б.в} = 6 \cdot 0,036 = 0,214 \text{ м}$$

Кількість отворів у барботері, шт:

$$z_o = \frac{4 \cdot V_n}{W_n \cdot \pi \cdot d_o} = \frac{4 \cdot 0,025}{25 \cdot 3,14 \cdot 0,002} \approx 318$$

Кількість отворів у одному ряду, шт:

$$z_1 = \frac{\pi \cdot D_o}{t} = \frac{3,14 \cdot 0,225}{0,025} \approx 28$$

де t – крок між отворами, приймаємо $t = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ м}$

Знаходимо кількість рядів:

$$n = \frac{z_o}{z_1} = \frac{318}{28} \approx 11$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів у барботері становить:

$$S_{отв} = \frac{\pi}{4} \cdot d_o^2 \cdot z_o = \frac{3,14}{4} \cdot 0,002^2 \cdot 318 = 0,0010 \text{ м}^2$$

5.2.2 Тепловий розрахунок

1) Вихідні дані до теплового розрахунку:

Температура поживного середовища t , °C 25.

Питома теплоємність повітря $c_{пов}$, Дж/(кг · К) 1005.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		112

Температура теплоносія (води) t_v , °C 20.

Густина теплоносія ρ_v , кг/м³ 998,2.

Динамічна в'язкість теплоносія μ_v , Па·с $1000 \cdot 10^{-6}$.

Теплоємність теплоносія c_v , Дж/(кг · К) 4190.

Теплопровідність теплоносія λ_v , Вт/(м · К) 0,599.

Теплофізичні характеристики поживного середовища, що використовуються для теплового розрахунку, обчислені та наведені у п. 5.2.1.

Для розрахунків приймаємо, що теплофізичні властивості культуральної рідини, поживного середовища та посівного матеріалу однакові.

Густина повітря при температурі поживного середовища t :

$$\rho_n = 1,29 \cdot \frac{273}{t + 273} = 1,29 \cdot \frac{273}{25 + 273} = 1,182 \text{ кг / м}^3$$

Маса повітря:

$$m_n = \rho_n \cdot V_n = 1,182 \cdot 0,025 = 0,030 \text{ кг}$$

Об'єм посівного матеріалу, що вводиться від посівного ферментеру для виробничого культивування, становить 10% робочого об'єму виробничого ферментеру.

Таким чином, маса поживного середовища у ферментері:

$$m_{ПС} = \rho_{ПС} \cdot V_{ПС} = 1004,22 \cdot 0,9 \cdot 3 = 2711,39 \text{ кг}$$

Маса посівного матеріалу:

$$m_{ПМ} = \rho_{ПМ} \cdot V_{ПМ} = 1004,22 \cdot 0,1 \cdot 3 = 301,27 \text{ кг}$$

Маса культуральної рідини:

$$m_{КР} = \rho_{КР} \cdot V_{КР} = 1004,22 \cdot 3 = 3012,66 \text{ кг}$$

Надходження теплоти в апарат відбувається із поживним середовищем, із посівним матеріалом і з повітрям.

Кількість теплоти, що надходить із поживним середовищем:

$$Q_{ПС} = m_{ПС} \cdot c \cdot t = 2711,39 \cdot 4067,908 \cdot 25 = 275,74 \text{ МДж}$$

Кількість теплоти, що надходить із біологічним агентом:

$$Q_{ПМ} = m_{ПМ} \cdot c \cdot t = 301,27 \cdot 4067,908 \cdot 25 = 30,64 \text{ МДж}$$

Кількість теплоти, що надходить із повітрям:

$$Q_n = m_n \cdot c_n \cdot t \cdot \tau = 0,030 \cdot 1005 \cdot 25 \cdot 345600 = 256,54 \text{ МДж}$$

Теплота, яка надходить внаслідок дисипації механічної енергії від перемішуючого пристрою (мішалки):

$$Q_m = N_{\text{пер}} \cdot \tau = 180,82 \cdot 345600 = 62,49 \text{ МДж}$$

Теплота, яка надходить внаслідок дисипації механічної енергії від аераційного повітря:

$$Q_{\text{дис}} = V_n \cdot \Delta p \cdot \tau = 0,025 \cdot 15,607 \cdot 345600 = 134,85 \text{ МДж}$$

$$\Delta p = \rho_{\text{КР}} \cdot H_p \cdot g = 1004,22 \cdot 1,584 \cdot 9,81 = 15,607 \text{ кПа}$$

Вміст вуглеводів у мелясі становить 45%, яка, у свою чергу, у складі середовища знаходиться у вмісті 2%. Таким чином, вміст вуглеводів у середовищі становить $2\% \cdot 45\% = 0,9\%$.

Маса вуглеводів у середовищі:

$$m_{\text{ц}} = m_{\text{КР}} \cdot 0,9\% = 3012,65 \cdot 0,0009 = 27,11 \text{ кг}$$

Теплота реакції згорання вуглеводів при $q_c = 16,5 \cdot 10^6 \text{ Дж/кг}$:

$$Q_{\text{ц}} = m_{\text{ц}} \cdot r_{\text{ц}} = 27,11 \cdot 16,5 \cdot 10^6 = 1,294 \text{ кДж}$$

Сумарна кількість теплоти, що надходить до системи:

$$\begin{aligned} \sum Q_{\text{над}} &= Q_{\text{ПС}} + Q_{\text{ПМ}} + Q_n + Q_m + Q_{\text{дис}} + Q_{\text{ц}} = \\ &= 275,74 + 30,64 + 256,54 + 62,49 + 134,85 + 1,294 \cdot 10^{-3} = 760,258 \text{ МДж} \end{aligned}$$

Втрати теплоти у навколишнє середовище (приймаємо 10% від загальної кількості теплоти):

$$Q_{\text{в}} = \sum Q_{\text{над}} \cdot 0,1 = 760,258 \cdot 0,1 = 76,026 \text{ МДж}$$

Втрати теплоти культуральної рідини:

$$Q_{\text{КР}} = m_{\text{КР}} \cdot c \cdot t = 3012,66 \cdot 4067,908 \cdot 25 = 306,38 \text{ МДж}$$

Втрати теплоти повітря:

$$Q_n = V_n \cdot c_n \cdot t \cdot \tau = 0,025 \cdot 1005 \cdot 25 \cdot 345600 = 217,08 \text{ МДж}$$

Розрахуємо сумарну витрату теплоти для системи:

$$\sum Q_{\text{вит}} = Q_{\text{в}} + Q_{\text{КР}} + Q_{\text{н.в}} = 76,03 + 306,38 + 217,08 = 599,49 \text{ МДж}$$

Таким чином, теплове навантаження у ферментері становить:

$$Q_m = -\sum Q_{над} + \sum Q_{вит} = -760,26 + 599,49 = -160,77 \text{ МДж}$$

$Q_T < 0$, отже, підтримання температури культивування у ферментері забезпечується його охолодженням.

$$Q = |Q_m| = 160,77 \text{ МДж}$$

2) Визначення маси теплоносія

$$t_{кр} - \Delta t_{cp} = t_T$$

Приймаємо $\Delta t_{cp} = 5^\circ\text{C}$. Тоді:

$$t_m = t_{кр} - 5^\circ\text{C} = 25 - 5 = 20^\circ\text{C},$$

$$t_2 = t_m + 1^\circ\text{C} = 21^\circ\text{C},$$

$$t_1 = t_m - 1^\circ\text{C} = 19^\circ\text{C}$$

Масу теплоносія визначаємо із співвідношення:

$$m_m \cdot c_{\theta} \cdot |t_1 - t_2| = Q,$$

$$m_m = \frac{Q}{c_{\theta} \cdot |t_1 - t_2|} = \frac{160,77}{4190 \cdot |19 - 21|} = 19185,29 \text{ кг}$$

3) Масова витрата теплоносія:

$$G_m = \frac{m_m}{\tau} = \frac{19185,29}{345600} = 0,0555 \text{ кг / с}$$

4) Об'ємна витрата теплоносія:

$$W_m = \frac{G_m}{\rho_{\theta}} = \frac{0,0555}{998,2} = 5,561 \cdot 10^{-5} \text{ м}^3 / \text{с}$$

5) Визначення поверхні теплообміну

Для визначення поверхні теплообміну обчислюємо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці (води) та середовища і коефіцієнт теплопередачі.

Для апаратів із сорочкою коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що перемішується, до стінки апарату визначається з виразу:

$$Nu = \frac{\alpha \cdot D}{\lambda},$$

$$\text{звідки } \alpha = \frac{Nu \cdot \lambda}{D}.$$

5.1) Визначення коефіцієнту тепловіддачі від культуральної рідини через стінку апарату:

$$a = \frac{D_c - 2s - D_g}{2} = \frac{2 - 2 \cdot 0,02 - 1,8}{2} = 0,09 \text{ м}$$

$$b = 0,15 - a = 0,15 - 0,09 = 0,06 \text{ м}$$

Діаметр сорочки D_c приймаємо на 0,2 м більше, ніж D_b (по 0,1 м з обох сторін), рівним $D_c = D_g + 0,2 = 2 \text{ м}$.

Еквівалентний діаметр становить:

$$d_{екв} = \frac{2ab}{a+b} = \frac{2 \cdot 0,09 \cdot 0,06}{0,09 + 0,06} = 0,072 \text{ м}$$

Середній діаметр ферментера:

$$D_{сер} = D_c - a = 2 - 0,09 = 1,91 \text{ м}$$

Критерій Нуссельта:

$$Nu_{KP} = 1,35 Re_{KP}^{0,59} \cdot Pr_{KP}^{0,38} \cdot \left(\frac{\mu_p}{\mu_{cm}} \right)^{0,14}$$

Значенням $\left(\frac{\mu_p}{\mu_{cm}} \right)^{0,14}$ можна знехтувати, оскільки приймаємо, що біля

стілки різниця температури складає 1 °С.

Критерій Рейнольдса:

$$Re_{KP} = \frac{d_m (n \cdot d_m + 4 \cdot W_n)}{\nu_{ПС}} = \frac{0,45(2,67 \cdot 0,45 + 4 \cdot 0,0098)}{0,779 \cdot 10^{-6}} = 715523,6$$

$$W_n = \frac{4 \cdot V_n}{\pi \cdot D_g^2} = \frac{4 \cdot 0,025}{3,14 \cdot 1,8^2} = 0,0098 \text{ м / с}$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_{KP} = \frac{\mu_{ПС} \cdot c_{ПС}}{\lambda_{ПС}} = \frac{0,783 \cdot 10^{-3} \cdot 4067,908}{0,5263} = 6,050$$

$$Nu_{KP} = 1,35 Re_{KP}^{0,59} \cdot Pr_{KP}^{0,38} = 1,35 \cdot 715523,6^{0,59} \cdot 6,05^{0,38} = 7614,4$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини становить:

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		116

$$\alpha_{KP} = \frac{Nu_{KP} \cdot \lambda_{ПС}}{D_6} = \frac{7614,4 \cdot 0,5263}{1,8} = 2226,15 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

5.2) Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія (води):

Швидкість руху води:

$$W_6 = \frac{W_m}{ab} = \frac{5,561 \cdot 10^{-5}}{0,09 \cdot 0,06} = 0,0103 м / с$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_6 = \frac{W_6 \cdot d_{екв}}{\nu_6} = \frac{0,0103 \cdot 0,072}{1,01 \cdot 10^{-6}} = 734,17$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_{KP} = \frac{\mu_6 \cdot c_6}{\lambda_6} = \frac{1000 \cdot 10^{-6} \cdot 4190}{0,599} = 6,995$$

Оскільки критерій Рейнольдса менше 10000, критерій Нуссельта визначається за критеріальним рівнянням:

$$Nu_6 = 0,037 Re_6^{0,8} \cdot Pr_6^{0,43} = 0,037 \cdot 734,17^{0,8} \cdot 6,995^{0,43} = 16,753$$

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія (води):

$$\alpha_6 = \frac{Nu_6 \cdot \lambda_6}{d_{екв}} = \frac{16,753 \cdot 0,599}{0,072} = 139,38 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

5.3) Коефіцієнт теплопередачі:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_{KP}} + \frac{s}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_6}} = \frac{1}{\frac{1}{2226,15} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{139,38}} = 121,23 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

де $\lambda_{ст} = 16 \text{ Вт/(м} \cdot \text{К)}$ – питома теплопровідність стінки ферментера із сталі

5.4) Розрахуємо необхідну площу поверхні теплообміну:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \tau \cdot \Delta t_{cp}} = \frac{160,77 \cdot 10^6}{121,23 \cdot 345600 \cdot 5} = 0,767 м^2$$

5.5) Обчислимо дійсну поверхню теплообміну:

$$F_d = H_c \cdot \pi \cdot D_6 = (H_p - h_d) \cdot \pi \cdot D_6 = (1,584 - 0,45) \cdot 3,14 \cdot 1,8 = 6,414 м^2$$

$$F_d > F$$

Дійсна поверхня теплообміну більша за необхідну площу поверхні теплообміну, тобто поверхнею теплообміну сорочки апарата забезпечується необхідний температурний режим під час його роботи, встановлення додаткових теплообмінних конструкцій і зміювиків не потребується.

2.3 Гідравлічний розрахунок

Для вибору насоса розрахуємо загальний гідравлічний опір, що створює напір у сорочці апарату. Загальний гідравлічний опір залежить від втрати тиску на підйом води $\Delta P_{n\dot{o}}$, атмосферного тиску ΔP_{atm} та втрат напору (питомої енергії) $\Delta P_{вut}$ на місцеві опори, зміни напрямку руху рідини, подолання сил тертя об стінки труби тощо, приймаємо 20%.

Загальний гідравлічний опір обчислюємо з виразу:

$$\Delta P_{заг} = \Delta P_{n\dot{o}} + \Delta P_{atm} + \Delta P_{вut} = (\rho_v g H_c + \Delta P_{atm}) \cdot 1,2$$

H_c – висота сорочки; виходячи з висоти рівня рідини у ферментері $H_p = 1,584$ м, приймаємо $H_c = 1,6$ м.

$$\Delta P_{заг} = (\rho_v g H_c + \Delta P_{atm}) \cdot 1,2 = (998,2 \cdot 9,81 \cdot 1,6 + 101325) \cdot 1,2 = 134541,7 \text{ Па}$$

Тоді значення необхідної потужності насосу становить (при ККД насосу $\eta = 0,8$):

$$N_n = \frac{\Delta P_{заг} \cdot G_m}{\rho_v \cdot \eta} = \frac{134541,7 \cdot 0,0555}{998,2 \cdot 0,8} = 0,008 \text{ кВт.}$$

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Для забезпечення подачі теплоносія у сорочку апарату обираємо насос консольний відцентровий марки К 8/18 (1,5/3000). Насос що має сальникові ущільнення, його потужність становить 0,9 кВт; насос оснащений приводним електродвигуном потужністю 1,5 кВт ККД – не менше 53%, максимальна продуктивність – 8,0 м³/год, максимальний напір – 18 м, частота обертання – 3000 об/хв. Насос придатний для використання при тиску води на вході не більше 196133 Па для рідин, що мають рН в межах 6-9 та температуру від 0 до 85 °С [122, 138].

Для нагнітання повітря, що далі очищується у головному та індивідуальному фільтрі для отримання стерильного аераційного повітря, обираємо одноступінчастий гвинтовий повітряний компресор VPM (VFD+PM) виробництва United Compressor Systems з робочим тиском 7-10 бар, продуктивністю 1,65-70,3 м³/хв та робочою потужністю 11-355 кВт [139].

Для нагнітання вентиляційного повітря обираємо відцентрові вентилятори ВР 287-46 (ВЦ 14-46) загальнопромислового призначення з двигуном потужністю 30 кВт на 1500 об/хв, продуктивністю 6,8-27 тис. м³/год. Дані вентилятори призначені для повітря та газових сумішей з температурою до 80°C, які не містять липких речовин, волокнистих матеріалів, у яких вміст пилу та інших твердих домішок не перевищує 100 мг/м³ [140].

У відповідності до призначення у технологічному процесі обираємо фільтри для очистки повітря.

Для механічної очистки повітря обираємо фільтр класу G, який затримує частинки розміром більше 5 мкм та забезпечує ефективність фільтрування 90%.

Для очищення аераційного повітря обираємо головний фільтр класу F, що очищає повітря від частинок розміром > 1,5 мкм (залишки пилу та мікроорганізмів), та забезпечує ефективність очищення повітря 95%.

У якості індивідуальних фільтрів обираємо фільтри тонкої очистки класу H, які очищують повітря від часток розміром > 0,3 мкм та забезпечують максимальний ступінь очищення 9,999% [116, 117].

Для очищення вентиляційного повітря для приміщень обираємо фільтр НЕРА класу E11, який очищає повітря від часток розмірами до 1,5 мкм, ефективність очищення повітря становить 95% [118].

Для приведення в дію оборотного валу мішалки виробничого ферментеру обираємо електричний привід MR102-90L – співвісно-циліндричний мотор-редуктор (виконання на лапах), який є редукторним механізмом у збірці з електродвигуном потужністю 1,5 кВт. Номінальний момент обертання у вихідному валі – до 120 Нм, оптимальна частота обертання валу 140-350 об/хв (загалом межі від 99 до 355 об/хв) [141].

Для забезпечення необхідного температурного режиму перемішування культури у процесі вирощування посівного матеріалу в колбах обираємо лабораторний шейкер Selecta виробництва Rotabit, модель 111С, який вміщує у себе 18 колб об'ємом 1000 мл, забезпечує швидкість обертання від 30 до 600 об/хв, має контрольований діапазон температури від +5°C до 60 °C та точність температури 0,1 °C [142].

Для дозування компонентів при підготовці поживного середовища обираємо дозатор об'ємно-рідинний FlexW15S виробництва FlexMash для рідких, в'язких та твердих речовин, що володіє продуктивністю: до 400 кг/год; межі зважування – 0,1-30 кг, похибка дозування (постійна, незалежно від величини дози): $\pm 1,5\%$ [143].

Для контролю умов проведення процесів обираємо рН-метри, манометри та термометри з такими характеристиками:

- 1) рН-метр промисловий рН-101П:
 - діапазон вимірювання рН – 0 ... 14;
 - діапазон вимірювання ЕРС електрохімічної комірки – 2900,0 ... 1900,0 мВ;
 - діапазон вимірювання температури – 0,0 °C ... 150,0 °C;
 - дискретність по ЕРС – 0,1 мВ;
 - дискретність по температурі – 0,1 °C;
 - дискретність по рН / рХ – 0,01;
 - межі допустимої абсолютної похибки вимірювання ЕРС – $\pm 0,4$ мВ;
 - межі допустимої абсолютної похибки вимірювання температури – $\pm 0,5$ °C [144].
- 2) манометр ДМ 05-07 («Склоприлад»):
 - діаметр корпусу – 100 мм;
 - матеріал корпусу – неіржавіюча сталь;
 - діапазон вимірювання – 0-1,6 МПа;
 - ступінь захисту – IP65;
 - клас точності – 1.5;

- матеріал механізму – неіржавіюча сталь;
- експлуатаційний діапазон температур – $-40^{\circ}\text{C} \dots +150^{\circ}\text{C}$ [145].

3) термометр біметалічний (осьовий) ТБ-100-100:

- діаметр корпусу – 100 мм;
- матеріал корпусу – сталь;
- діапазон вимірювання – $0 \dots +150^{\circ}\text{C}$;
- ступінь захисту – IP54;
- клас точності – 1.5;
- матеріал механізму – латунь [146].

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

5.4.1 Вимоги до охорони праці

Безпека роботи на виробництві, що проектується, забезпечується головним чином суворим дотриманням техніки безпеки, технологічного регламенту проведення усіх операцій і знанням і виконанням вимог безпеки при роботі з різними видами обладнання, а також контролем справності обладнання. Проект виробництва виконується у відповідності до вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки.

Обладнання розміщується у просторах приміщеннях, добре освітлених, теплих (температура не нижче 24°C), із гладкою водонепроникною підлогою.

До небезпечних для персоналу факторів, присутніх на виробництві, що проектується, належать:

- 1) високий тиск (прилади, що працюють під тиском – автоклави);
- 2) підвищена вологість повітря від автоклавів;
- 3) випаровування від середовищ, що автоклавуються;
- 4) електрична напруга 380 В;
- 5) високі температури (автоклави, сухожари);
- 6) вогонь (для працівників, які контактують із лабораторним газовим пальником);
- 7) луги та кислоти (застосовуються для приготування робочих розчинів для регулювання рН).

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 121
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Основні умови можливості експлуатації виробничого обладнання включають у себе його надійність, безпечність при експлуатації, передбачену можливість огляду, чищення, промивки, продувки апарату та ремонту у випадку несправностей. Внутрішні пристрої, якими оснащений апарат, повинні бути з'ємними (у більшості випадків).

Апарати, що використовують гарячу пару або газ, повинні мати конструкцію, яка здатна до ефективного охолодження стінок, що перебувають під тиском, до необхідної температури.

Зварні з'єднання повинні бути розташовані поза опорами апарату; якщо це неможливо, необхідно забезпечити контроль над підпорними швами.

Головними умовами забезпечення безаварійної роботи обладнання є правильна його установка, експлуатація у відповідності до усіх норм та правил безпеки та своєчасне проведення планово-попереджувального ремонту. Окрім цього, обов'язковою є регулярна та своєчасна перевірка обслуговуючим персоналом справності арматури, контрольно-вимірювальних приладів тощо [116].

У випадку несправностей, що виникають у запобіжних клапанах, манометрі, запобіжних блокувальних пристроях, засобах кріплення, контрольно-вимірювальних приладів та засобів автоматики, підвищенні тиску в апараті вище допустимого, виникненні пожеж апарат повинен бути зупинений.

Обов'язковою умовою початку роботи з будь-якою одиницею обладнання є перевірка її на герметичність.

До роботи з приладами, що працюють під тиском, допускаються виключно працівники, що мають відповідну кваліфікацію, не молодше 18 років, що пройшли медичний огляд, не мають протипоказань, а також пройшли інструктаж на робочому місці та навчені безпечним методам роботи. Конструкція таких апаратів повинна відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003-74, ГОСТ 25167-82 і «Правил будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском».

При роботі з приладами, що працюють при високих температурах, працівники оснащуються халатом, рукавичками та фартуком [147].

Усі апарати та трубопроводи для зменшення тепловиділення та запобігання опіків повинні бути вкриті шаром теплоізоляції, температура поверхні теплоізоляції на робочих місцях не має перевищувати 45 °С. Задля безпеки передбачене суцільне розфарбовування трубопроводів у розпізнавальні кольори по групах речовин, що транспортуються ними.

Відвід статичної електрики здійснюється шляхом заземлення апаратів, трубопроводів, цистерн, зливних і наливних пристроїв, а також бункерів, мірників, повітроводів, які можуть накопичувати високі потенціали зарядів [122].

Задля забезпечення безпеки здоров'я працівників до роботи допускається тільки проінструктований персонал, ознайомлений у деталях з конструкцією приладу, що обслуговується ним, принципом дії цієї одиниці обладнання, технологією та правилами техніки безпеки ведення робіт. Інструкція по техніці безпеки розробляється індивідуально для кожного виду обладнання у відповідності до ГОСТ 12.2.003-91 «Оборудование производственное. Общие требования безопасности» та повинна бути вивішена біля робочих місць [122].

Про кожний нещасний випадок на виробництві негайно повинно повідомлятися керівникові робіт, при цьому до розслідування обстановку та стан обладнання мають зберігати такими, які вони були до інциденту (якщо це не загрожує здоров'ю та життю персоналу).

Для зменшення контакту шкіри та слизових оболонок з біологічним агентом, випаровуваннями середовища та агресивними випаровуваннями мийних розчинів працівники повинні бути забезпечені засобами індивідуального захисту: одноразовими масками або респіраторами, нитриловими або гумовими рукавичками, окулярами, нетканинними халатами тощо.

5.4.2 Вимоги до охорони навколишнього середовища

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 123
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Охорона навколишнього середовища забезпечується виконанням вимог Санітарних правил і норм шляхом використання матеріалів, дозволених до застосування у даній галузі промисловості та таких, що відповідають правилам і нормам екологічної безпеки, а також оснащенням підприємств обладнанням, яке дозволяє отримувати необхідні показники в межах норми для відходів та викидів підприємства (системи очищення повітря та стічних вод).

Основний технологічний процес виробництва, що описується, є майже безвідходним, оскільки як поживне середовище, так і біомаса входять до складу готового біопрепарату. Тому відходи виробництва включають у себе відпрацьоване тверде поживне середовище, відпрацьовані одноразові засоби індивідуального захисту працівників, відпрацьоване повітря, а також рідкі відходи (відпрацьована вода та миючі розчини, поживне середовище – якщо присутня контамінація поживного середовища на стадії підготовки посівного матеріалу; конденсат). Викиди в атмосферу токсичних сполук відсутні.

Каналізаційну систему виробництва, у яку скидаються стічні води, повинна бути спроектована у відповідності до вимог СНіП 2.04.03-85. Каналізація. Зовнішні мережі і споруди.

Для очистки стічних вод, що містять різні типи частинок різноманітних розмірів, застосовуються наступні методи:

Механічна очистка – забезпечує видалення нерозчинних домішок розміром від десятих часток міліметра до 0,1 мкм (проціджування, відстоювання) – дозволяє видалити до 60% нерозчинних домішок.

Фізико-хімічні методи – використовуються для видалення частинок, що перебувають у вигляді молекулярно-дисперсних частинок діаметром менше 0,001 мкм та утворюють у воді істинні розчини (реагентна очистка, хімічне окислення), а також для видалення частинок менше 0,0001, що відповідають іонному ступеню дисперсності – лугів, кислот та їх солей – та зменшення мінералізації стічних вод (іонний обмін, зворотний осмос)

Біологічна очистка – застосовується з метою видалення стічних вод від основної маси органічних забруднень, що знаходяться у них у розчиненій,

колоїдній або нерозчинній формі. Принцип дії цього методу – мінералізація (окиснення) органічних забруднень аеробними мікроорганізмами, які можуть використовувати ці органічні речовини в якості джерела живлення.

Для доочистки вод, що очищені останнім зазначеним методом, застосовуються такі методи, як фільтрування через сітчасті фільтри, через зернисті завантаження (пісок, керамзит, антрацит, вугілля тощо), доочистка у біоставках, фізико-хімічна доочистка (згадані вище методи, а також гіперфільтрація) [148].

Відпрацьоване повітря забруднене клітинами мікроорганізмів, пилом білкових та інших продуктів мікробного синтезу, що утворюються на стадії виробничого культивування, а також пилом поживних солей і сировини, що застосовується у виробництві, пилом, що піднімається на стадіях упаковки, завантаження на транспортні засоби тощо.

Основною мірою попередження забруднення атмосфери викидами виробництва є герметизація виробничих апаратів (ферментерів та ін.), а також застосування різноманітних типів одинарних або батарейних циклонів, гідроциклонів, тканинних або електричних фільтрів, скрубєрів.

Для зниження запиленості промислових викидів атмосферу білковими та іншими продуктами білкового синтезу застосовують скрубєр Вентурі, що складається з труби Вентурі, призначеної для коагуляції дрібних твердих частинок, інерційного апарату та відцентрових скрубєрів, у яких збільшені частинки та краплі рідини видаляються від газів [122].

Стерилізація повітря, що виходить з ферментерів, є важливим етапом технологічного процесу біосинтезу. Повітря, що видаляється з ферментерів, містить велику кількість мікроорганізмів та має високу вологість. Для відділення вологи використовуються жалюзійні конструкції, що володіють низьким гідравлічним опором. На тканинних сітках з нержавіючого матеріалу сепарується близько 99% вологи. Для очищення та стерилізації повітря використовуються фільтрувальні елементи з мікрОВОЛОКОН боросилікатного скла, зв'язаних епоксигумою, фільтр-патрони з яких мають високу

стерилізаційну здатність (до 99,9999 %) та добре уловлюють частинки розміром більше 0,6 мкм. Стерилізація цих фільтрів здійснюється текучою парою [116].

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 126
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. У проєкті для виробництва біопрепарату для захисту рослин продуцентом було обрано штам гриба *Trichoderma harzianum* MSB1211, який характеризується підвищеною антагоністичною активністю по відношенню до фітопатогенів грибкового та бактеріального походження, здатний до синтезу антибіотичних сполук і біологічно активних речовин, які сприяють підвищенню стійкості рослин до патогенів. Охарактеризовано його морфологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні ознаки.

2. З урахуванням фізіолого-біохімічних особливостей продуценту *Trichoderma harzianum* MSB1211 обрано склад поживного середовища для виробничого культивування на основі меляси та кукурудзяного екстракту, визначено оптимальні параметри культивування: температура $25 \pm ^\circ\text{C}$, pH 6,0, тривалість 3-4 доби.

3. Проаналізовано методи отримання високоефективних промислових штамів-продуцентів (включаючи відбір, індукований мутагенез та методи генетичної та клітинної інженерії) та наведено схему отримання обраного штаму шляхом штучного відбору, що передбачає виділення гриба із природного середовища його існування (грунту), оцінку його ефективності проти ряду патогенів рослин та відбір штаму з найвищою біологічною активністю.

4. У відповідності до фізико-хімічних, біохімічних та біологічних характеристик готового препарату та з урахуванням культуральних особливостей продуцента *Trichoderma harzianum* MSB1211 обрано конструкцію ферментеру номінальним об'ємом 5 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6, суцільною сорочкою, механічним перемішуючим пристроєм, представленим відкритою турбінною мішалкою, та барботером; здійснено технологічний, конструктивний та гідравлічний розрахунок ферментеру, обрано загальнозаводське обладнання.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ		
Розроб.		Корачева А.О.					
Конс.		Шидецький В.Ю.					
Керівн.		Сироїд О.О.					
Затв.							
					Стадія	Аркуш	Архів
					Д	127	143
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ, БТ-92		

5. Відповідно до вимог до форми та якості готового продукту розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва біопрепарату для захисту рослин у рідкій формі, розфасованого у флакони об'ємом 1 л, з титром життєздатних клітин 1×10^9 КУО/см³.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ	Арк. 128
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jan van der Wolf, Boer S. H. D. Phytopathogenic Bacteria. Principles of Plant-Microbe Interactions. 2015. P. 65–77. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_9.
2. Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? / P. M. M. Martins et al. Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01099>.
3. Knogge W. Fungal Infection of Plants. The Plant Cell. 1996. P. 1711–1722. URL: <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1711>.
4. Kumar S., Singh A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. Journal of Biofertilizers & Biopesticides. 2015. Vol. 06, no. 02. URL: <https://doi.org/10.4172/jbfbp.1000e129>.
5. Schuster A., Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010. Vol. 87, no. 3. P. 787–799. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
6. Ozbay N., Newman S. E. Biological Control with *Trichoderma* Spp. With Emphasis on *T. harzianum*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2004. Vol. 7 (4). P. 478-484. URL: https://www.researchgate.net/profile/Steven-Newman-3/publication/45726593_Biological_Control_with_Trichoderma_Spp_With_Emphasis_on_T_harzianum/links/53d034d40cf25dc05cfe38a9/Biological-Control-with-Trichoderma-Spp-With-Emphasis-on-T-harzianum.pdf.
7. *Trichoderma harzianum* strain for controlling plant fungus diseases and application thereof : patent 103146586B China : C12N 1/14, A01P 3/00, A01P 21/00, C05G 3/00, C12R 1/885. No. 201310075968.6 ; applied on 11.03.2013 ; published on 09.07.2014, Bulletin no. 05. 11 p
8. Бровдій В. М., Гулий В. В., Федоренко В. П. Біологічний захист рослин. Київ : Світ, 2004. 352 с.

					ДП БТ-9212. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Корачева А.О.			СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ		
Конс.		Шидецький В.Ю.					
Керівн.		Сироїд О.О.					
Затв.							
						Стадія	Аркуш
						Д	129
						Аркушів	
						143	
						КПІ ім. Ігоря Сікорського	
						ФБТ, БТ-92	

9. Алексеева К. Л. Biofungicides in vegetable crops of open field protection (Биофунгициды в системе защиты овощных культур открытого грунта). Картофель и овощи. 2022. No. 5. P. 12–14. URL: <https://doi.org/10.25630/pav.2022.34.66.001>.

10. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (Botrytis cinerea) – prospects and challenges / J. A. Abbey et al. Biocontrol Science and Technology. 2018. Vol. 29, no. 3. P. 207–228. URL: <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>.

11. Біофунгіцид Фітоцид-р 500 мл БТУ-Центр "Agroretail.com.ua" - 520749649. Агро Ритейл. URL: <https://agroretail.com.ua/ua/p520749649-biofungitsid-fitotsid-500.html>.

12. Біофунгіцид Фітоспорин-М універсальний "Agroretail.com.ua" - 1765982317. Агро Ритейл. URL: <https://agroretail.com.ua/ua/p1765982317-biofungitsid-fitosporin-universalnyj.html>.

13. Псевдобактерін-2 (Респекта), в.р. - опис, норми застосування, аналоги. Інформаційно-аналітична система "Аграрії разом". URL: [https://agrarii-razom.com.ua/preparations/psevdobakterin-2-\(respekta\)](https://agrarii-razom.com.ua/preparations/psevdobakterin-2-(respekta)).

14. Агат 25К, т.пс. - опис, норми застосування, аналоги. Інформаційно-аналітична система "Аграрії разом". URL: <https://agrarii-razom.com.ua/preparations/agat-25k>.

15. Планриз 1 л – биофунгицид контактно-системного действия. Sezon. URL: https://sezon.com.ua/product/planriz-1-l-biofungitsid-kontaktno-sistemnogo-deystviya-biotekhnika/?gad=1&gclid=Cj0KCQjwjryjBhD0ARIsAMLvnF8w6B74uVcAoQzohJ22Ls-1ZTUcZMlmytXx36tS6P3o7mYf7-jhFjQaAqh7EALw_wcB.

16. Фунгіцид ФІТОЛАВІН, РК - опис, норми застосування, аналоги. Інформаційно-аналітична система "Аграрії разом". URL: <https://agrarii-razom.com.ua/preparations/fitolavin>.

17. Стрептофунгін, що має протигрибкову дію : пат. 88595 Україна : C12P 1/00, C12NR 1/465. № 11433 ; заявл. 27.09.2013 ; опубл. 25.03.2014, Бюл. № 6. 5 с.
18. Біологічний захист рослин / за ред. Дядечка М. П. та Падія М. М. Біла Церква, 2001. 312 с.
19. Алимова Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Казань: Казанский государственный университет, 2006. 209 с
20. Бондарь П. Н. Штаммы грибов рода *Trichoderma* (Pers.: Fr.) как основа для создания биопрепаратов защиты растений и получения кормовых добавок. Кр. : РХТУ, 2011. 220 с.
21. Гнеушева И. А., Павловская Н. Е., Яковлева И. В. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение. Вестник Орел ГАУ. 2010. Т. 3, № 24. С. 36–39.
22. Триходермин | Фунгициды. Агромагазин Сад-Огород. URL: https://sad-ogorod.biz.ua/catalog/fungitsidy/trikhodermin_20_g/.
23. Kind of *Trichoderma harzianum* JSNL1404 and its application : patent 104988079B China : C12N 1/14, A01N 63/04, A01P 1/00, A01P 3/00, C12R 1/885. No. 201510490193.8 ; applied on 11.08.2015 ; published on 19.12.2017, Bulletin no. 16. 15 p.
24. Species Fungorum - GSD Species. Species Fungorum Home Page. URL: <https://www.speciesfungorum.org/Names/GSDSpecies.asp?RecordID=340299>.
25. Taxonomy browser (*Trichoderma harzianum*). National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5544&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
26. Siddiquee S. Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of *Trichoderma* Species from Tropical Regions. Cham : Springer International Publishing, 2017. URL: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7>.
27. Phylogeny and Taxonomical Investigation of *Trichoderma* spp. from Indian Region of Indo-Burma Biodiversity Hot Spot Region with Special Reference

to Manipur / T. Kamala et al. BioMed Research International. 2015. Vol. 2015. P. 1–21. URL: <https://doi.org/10.1155/2015/285261>.

28. Zin N. A., Badaluddin N. A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences. 2020. Vol. 65, no. 2. P. 168–178. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>.

29. ШТАММ *Trichoderma harzianum* Rifai - ПРОДУЦЕНТ ИНГИБИТОРА ВИРУСА КОЛЬЦЕВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТАБАКА (Tobacco ringspot virus) : пат. 2 475 528 росія : C12N 1/14, A01N 63/04, C12R 1/885. № 2011111098/10 ; заявл. 24.03.2011 ; опубл. 20.02.2013, Бюл. № 5. 7 с.

30. Штамм мікромицета *Trichoderma harzianum* Rifai для отримання препарату проти возбудителя сірої гнилі винограду : пат. 2010527 росія : A01N 63/04, C12N 1/14. № 5014492/13 ; заявл. 11.07.1991 ; опубл. 15.04.1994.

31. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* / N. N. Kobori et al. Fungal Biology. 2015. Vol. 119, no. 4. P. 179–190. URL: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>.

32. Зиганшин Д. Д., Сироткин А. С. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба. Вестник технологического университета. 2017 Т. 20. №10. С. 155-158

33. Штамм гриба *Trichoderma lignorum* для производства триходермина : пат. 1717052 срсп : A01N 63/04, C12N 1/14. № 4602970/13 ; заявл. 22.08.1988 ; опубл. 07.03.1992, Бюл. № 9. 3 с.

34. *Trichoderma harzianum* HN-2 : patent 101928673 China : C12N 1/14, A01N 63/04, A01P 3/00, C12R 1/885. No. 201010226129.6 ; applied on 14.07.2010 ; published on 29.12.2010. 5 p.

35. MORPHOLOGICAL AND CULTURAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PECULIARITIES OF MICROMYCETES STRAINS INCLUDING IN THE COMPOSITION OF *TRICHODERMA HARZIANUM* 128

ASSOCIATION / S. M. Derkach et al. Agricultural microbiology. 2018. Vol. 28. P. 17–26. URL: <https://doi.org/10.35868/1997-3004.28.17-26>.

36. Study of *Trichoderma viride* metabolism under conditions of the restriction of oxidative processes / P. Chovanec et al. Canadian Journal of Microbiology. 2005. Vol. 51, no. 10. P. 853–862. URL: <https://doi.org/10.1139/w05-075>.

37. Nemovic M., Farkas V. Cell-wall composition and polysaccharide synthase activity changes following photoinduction in *Trichoderma viride*. Acta Biologica Hungarica. 2001. Vol. 52, no. 2-3. P 281-288.

38. Benítez T., Villa T. G., Acha I. G. Some chemical and structural features of the conidial wall of *Trichoderma viride*. Canadian Journal of Microbiology. 1976. Vol. 22, no. 2. P. 318–321. URL: <https://doi.org/10.1139/m76-046>.

39. Билай В. И. Основы общей микологии: Учеб. пособие для вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. 360 с.

40. Complete DNA Sequence and Analysis of a Mitochondrial Plasmid in the Mycoparasitic *Trichoderma harzianum* Strain T95 / Z. Antal et al. Plasmid. 2002. Vol. 47, no. 2. P. 148–152. URL: <https://doi.org/10.1006/plas.2001.1559>.

41. Elad Y., Chet I., Henis Y. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica. 1981. Vol. 9. P 59–67.

42. Kubicek C. P., Harman G. E. *Trichoderma* and Gliocladium. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis Group, 2002. 300 p.

43. Алимова, Ф. К. Современная система *Trichoderma*/Нупосреа. Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2005. Т. 147, №2. С. 28-57.

44. Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : материалы конференции. Киров : Вятский государственный университет, 2021. – 400 с.

45. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi / R. A. A. Khan et al. Microorganisms. 2020. Vol. 8, no. 6. P. 817. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>.

46. 2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-. NIST WebBook. URL:
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=27593-23-3>.
47. 6-Pentyl-2H-pyran-2-one. PubChem. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Pentyl-2H-pyran-2-one>.
48. Secondary metabolism in Trichoderma – Chemistry meets genomics / S. Zeilinger et al. Fungal Biology Reviews. 2016. Vol. 30, no. 2. P. 74–90. URL:
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>.
49. Trichoviridin. American Chemical Society (ACS). URL:
<https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/t/trichoviridin.html>.
50. Isonitrin A. PubChem. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isonitrin-A>.
51. Isonitrin B. PubChem. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isonitrin-B>
52. Trichoviridin. PubChem. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isonitrin-C>
53. Isonitrin D. PubChem. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isonitrin-D>
54. Isonitrinic acid E. PubChem. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6448162>.
55. Isonitrinic acid F. PubChem. URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24839722>.
56. Trichoderma viride bioactive peptaibol induces apoptosis in Aspergillus niger infecting tilapia in fish farms / M. Gamal et al. Aquaculture. 2021. P. 737474. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737474>.
57. Chugh J. K., Wallace B. A. Peptaibols: models for ion channels. Biochemical Society Transactions. 2001. Vol. 29, no. 4. P. 565–570. URL:
<https://doi.org/10.1042/bst0290565>.
58. Alamethicin. Fermentek. URL:
<https://www.fermentek.com/product/alamethicin>.

59. Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection / B.-S. Yun et al. Tetrahedron Letters. 2000. Vol. 41, no. 9. P. 1429–1431. URL: [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(99\)02308-4](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(99)02308-4).

60. Corey R. B. The Crystal Structure of Diketopiperazine. Journal of the American Chemical Society. 1938. Vol. 60, no. 7. P. 1598–1604. URL: <https://doi.org/10.1021/ja01274a023>.

61. Borthwick A. D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. Chemical Reviews. 2012. Vol. 112, no. 7. P. 3641–3716. URL: <https://doi.org/10.1021/cr200398y>.

62. 2,5-Piperazinedione. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7817>.

63. Disulfide- and Multisulfide-Containing Metabolites from Marine Organisms / C.-S. Jiang et al. Chemical Reviews. 2011. Vol. 112, no. 4. P. 2179–2207. URL: <https://doi.org/10.1021/cr200173z>.

64. Gliotoxin. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6223>.

65. Breitmaier E. Terpenes: Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Chapter 3: Sesquiterpenes. Weinheim. Germany : WILEY-VCH, 2006. URL: <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch3>.

66. Heptelidic acid (Koningic acid), GAPDH inhibitor (CAS 74310-84-2) (ab144269). Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science | Abcam. URL: <https://www.abcam.com/products/biochemicals/heptelidic-acid-koningic-acid-gapdh-inhibitor-ab144269.html>.

67. Heptelidic acid. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heptelidic-acid>.

68. Moss G. P. Nomenclature Of Steroids. Pure and Applied Chemistry. 1989. Vol. 61, no. 10. P. 1783-1822. URL: <https://publications.iupac.org/pac/pdf/1989/pdf/6110x1783.pdf>.

69. Brian P. W., mcgowan J. G. Viridin: a Highly Fungistatic Substance Produced by Trichoderma viride. Nature. 1945. Vol. 156, no. 3953. P. 144–145. URL: <https://doi.org/10.1038/156144a0>.

70. Viridin. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/94257>.

71. Jollès P., Muzzarelli R.A. Chitin and Chitinases. Basel : Birkhäuser, 1999. ISBN 978-3-7643-5815-0.

72. Frohwein Y. Z., Gatt S. Isolation of β -N-Acetylhexosaminidase, β -N-Acetylglucosaminidase, and β -N-Acetylgalactosaminidase from Calf Brain*. Biochemistry. 1967. T. 6, № 9. C. 2775–2782. URL: <https://doi.org/10.1021/bi00861a018>.

73. KEGG ENZYME: 3.2.1.52. GenomeNet. URL: <https://www.genome.jp/entry/3.2.1.52>.

74. Planas A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 2000. T. 1543, № 2. C. 361–382. URL: [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00231-4](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00231-4).

75. Marco J. L. d., Felix C. R. Purification and characterization of a beta-Glucanase produced by Trichoderma harzianum showing biocontrol potential. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2007. Vol. 50, no. 1. P. 21–29. URL: <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000100003>.

76. KEGG ENZYME: 3.2.1.39. GenomeNet. URL: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.2.1.39.

77. Reese E. T., Mandels M. β -D-1, 3 GLUCANASES IN FUNGI. Canadian Journal of Microbiology. 1959. T. 5, № 2. C. 173–185. URL: <https://doi.org/10.1139/m59-022>.

78. KEGG ENZYME: 3.2.1.58. GenomeNet. URL: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.2.1.58.

79. Метаболізм вуглеводів : лекції з біохімії. Миколаїв : ПВНЗ «Медико-Природничий Університет», 2019. URL: http://vnz-mpu.com.ua/images/pdf/Лекції/Біохімія/Біохімія_Лекція_6.pdf

80. Гарибова Л. В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов : учебное пособие. М. : Товарищество научных изд. КМК, 2005. 220 с.

81. Molecular Evolution of Lysine Biosynthesis in Agaricomycetes / Z. Song et al. Journal of Fungi. 2021. Vol. 8, no. 1. P. 37. URL: <https://doi.org/10.3390/jof8010037>.

82. Salwan R., Rialch N., Sharma V. Bioactive Volatile Metabolites of Trichoderma: An overview. Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms. 2019. P. 87–111. URL: https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_5.

83. Biosynthesis of 3-(3'-isocyanocyclopent-2-enylidene) propionic acid by (bon.) bain. aggr. / J. E. Baldwin et al. Tetrahedron. 1985. Vol. 41, no. 10. P. 1931–1938. URL: [https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(01\)96556-1](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(01)96556-1).

84. Fungal Isocyanide Synthases and Xanthocillin Biosynthesis in Aspergillus fumigatus / F. Y. Lim et al. mBio. 2018. Vol. 9, no. 3. URL: <https://doi.org/10.1128/mbio.00785-18>.

85. Rindfleisch H., Kleinkauf H. Biosynthesis of alamethicin. FEBS Letters. 1976. Vol. 62, no. 3. P. 276–280. URL: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80074-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80074-9).

86. Mohr H., Kleinkauf H. Alamethicin biosynthesis. Acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology. 1978. Vol. 526, no. 2. P. 375–386. URL: [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(78\)90129-8](https://doi.org/10.1016/0005-2744(78)90129-8).

87. Fischbach M. A., Walsh C. T. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. Chemical Reviews. 2006. Vol. 106, no. 8. P. 3468–3496. URL: <https://doi.org/10.1021/cr0503097>.

88. Turner S. R., Voit B. I., Mourey T. H. All-aromatic hyperbranched polyesters with phenol and acetate end groups: synthesis and characterization. *Macromolecules*. 1993. Vol. 26, no. 17. P. 4617–4623. URL: <https://doi.org/10.1021/ma00069a031>.

89. Gliotoxin Biosynthesis: Structure, Mechanism, and Metal Promiscuity of Carboxypeptidase GliJ / A. Marion et al. *ACS Chemical Biology*. 2017. Vol. 12, no. 7. P. 1874–1882. URL: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00847>.

90. Blight M. M., Coppen J. J. W., Grove J. F. The biogenesis, from mevalonic acid, of the steroidal antifungal metabolite viridin. *Chemical Communications* (London). 1968. No. 18. P. 1117. URL: <https://doi.org/10.1039/c19680001117>.

91. Golder W. S., Watson T. R. Lanosterol derivatives as precursors in the biosynthesis of viridin. Part 1. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1980. P. 422. URL: <https://doi.org/10.1039/p19800000422>.

92. Hanson J. R., O'Leary M. A., Wadsworth H. J. Studies in terpenoid biosynthesis. Part 28. The acetate and mevalonate labelling patterns of the steroid, demethoxyviridin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1983. P. 867. URL: <https://doi.org/10.1039/p19830000867>.

93. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains / T. Benítez et al. *Int Microbiol*. 2004. Vol. 4, no. 7. P. 249-60.

94. Стариков П. А. Грибы рода *Trichoderma* как антагонисты фитопатогенов (обзор). Материалы XIX всероссийской научно-практической конференции с международным участием. К. : ВятГУ, 2021. С. 188-191.

95. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants / H. A. Contreras-Cornejo et al. *FEMS Microbiology Ecology*. 2016. Vol. 92, no. 4. P. fiw036. URL: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>.

96. Srivastava M., Shahid M. *Trichoderma* Genome to Genomics: A Review. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*. 2014. Vol. 05, no. 03. URL: <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000162>.

97. *Trichoderma harzianum* (ID 2441) - Genome - NCBI. National Center for Biotechnology Information. URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Trichoderma%20harzianum\[Organism\]&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Trichoderma%20harzianum[Organism]&cmd=DetailsSearch).
98. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species / C. P. Kubicek et al. BMC Genomics. 2019. Vol. 20, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>.
99. Draft Whole-Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* T6776 / R. Baroncelli et al. Genome Announcements. 2015. Vol. 3, no. 3. URL: <https://doi.org/10.1128/genomea.00647-15>.
100. Exploring the Relationship Among Divergence Time and Coding and Non-coding Elements in the Shaping of Fungal Mitochondrial Genomes / P. L. C. Fonseca et al. Frontiers in Microbiology. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00765>.
101. Lorito M., Kubicek C.P., Harman G.E. Chitinolytic enzymes and their genes. *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2. 1998. P. 73-99.
102. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. / C.P. Kubicek et al. Journal of Plant Pathology. 2001. Vol. 83, no 2. P. 11-23.
103. Limón M. C., Pintor-Toro J. A., Benítez T. Increased Antifungal Activity of *Trichoderma harzianum* Transformants That Overexpress a 33-kDa Chitinase. Phytopathology. 1999. Vol. 89, no. 3. P. 254–261. URL: <https://doi.org/10.1094/phyto.1999.89.3.254>.
104. Secretion of an enzymatically active *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Saccharomyces cerevisiae* / H. Draborg et al. Current Genetics. 1996. Vol. 29, no. 4. P. 404–409. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02208622>.
105. Strain improvement of *Trichoderma harzianum* for enhanced biocontrol capacity: Strategies and prospects / Z. Xiao et al. Frontiers in Microbiology. 2023. Vol. 14. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1146210>.

106. Биотехнология / Н. Егоров и др. М. : Высшая шк., 1988. Кн. 2 : Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. 208 с.

107. Штамм гриба *Trichoderma lignorum*, используемый против фитопатогенных грибов и бактерий : пат. 212793 росія : A01N 63/04, C12N 1/14. № 96119019/13 ; заявл. 25.09.1996 ; опубл. 20.11.1998. 5 с.

108. Rashmi S., Maurya S., Upadhyay R. S. The improvement of competitive saprophytic capabilities of *Trichoderma* species through the use of chemical mutagens. Brazilian Journal of Microbiology. 2016. Vol. 47, no. 1. P. 10–17. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.003>.

109. Haggag, W. M., Mohamed, H. A. A. Enhancement of antifungal metabolite production from gamma-ray induced mutants of some *Trichoderma* species for control onion white disease. Plant Pathology Bulletin. 2002. Vol. 11. P. 45-56.

110. Kowsari M., Motallebi M., Zamani M. Protein Engineering of Chit42 Towards Improvement of Chitinase and Antifungal Activities. Current Microbiology. 2013. Vol. 68, no. 4. P. 495–502. URL: <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0494-3>.

111. The profile change of defense pathways in phaseouls vulgaris L. by biochemical and molecular interactions of *Trichoderma harzianum* transformants overexpressing a chimeric chitinase / N. Eslahi et al. Biological Control. 2021. Vol. 152. P. 104304. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104304>.

112. Cai F., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2021). Genetic transformation of *Trichoderma* spp. Methods Mol. Biol. 2021. Vol. 2290. P. 171–185. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34009590/>.

113. Generation of *Trichoderma harzianum* with pyr4 auxotrophic marker by using the CRISPR/Cas9 system / A. A. Vieira et al. Scientific Reports. 2021. Vol. 11, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80186-4>.

114. Тодосійчук Т. С. Загальна біотехнологія : презентації до лекцій. Київ : КПІ, 2022.

115. Правила безопасности, производственной санитарии, охранно-карантинного и ветеринарно-санитарного режимов на предприятиях биологической промышленности / под ред. Главного управления биологической промышленности Госагропрома СССР. 1989. 94 с.

116. Мосичев М.С., Складнев А. А., Котов В. Б. Общая технология микробиологических производств. М. : Легкая и пищевая пром-сть, 1982. 264 с.

117. Грачева И. Технология ферментных препаратов. 2-е изд., перераб и доп. М. : Агропромиздат, 1987. 335 с.

118. TIONofficial. Что такое НЕРА-фильтр: принципы работы и неочевидные факты. Хабр. URL: <https://habr.com/ru/company/tion/blog/385461/>.

119. Цитович И. К. Химия с сельскохозяйственным анализом. 2-е изд. М. : «Колос», 1974. 527 с.

120. Гурвич Я. А. Химический анализ : Учеб. для сред. ПТУ. М. : Высшая школа, 1985. 295 с.

121. Использование препарата на основе низкомолекулярных веществ сои для повышения активности ксиланазы и эндоглюканазы мутантного штамма *Trichoderma reesei* Co-44 /Е. В. Костылева и др. Биотехнология. 2019. Т. 35, №5. С. 70–79. URL: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-70-79>.

122. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудование микробиологических производств : Учебник для студентов вузов / ред. К. А. Калунянц. М. : Агропромиздат, 1987. 398 с.

123. Поводзинський В. М. Проектування біотехнологічних виробництв : конспект лекцій. Київ : КПІ, 2022.

124. Ружинська Л. І. Процеси, апарати та устаткування біотехнологічних виробництв-2 : конспект лекцій. Київ : КПІ, 2022.

125. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников. СПб. : Издательская фирма «Наука», 1995. 600 с.

126. Процеси та обладнання хімічної технології, ч. 2 : підручник / Я. М. Корнієнко та ін. Київ : НТУУ "КПІ", 2011. 416 с.

127. Брагинский Л.Н. Перемешивание в жидких средах: Физические основы и инженерные методы расчета. СПб. : Химия, 1984. 336 с.

128. Ружинська Л. І., Кузьменко К. В. Вибір конструкції апарату з перемішуючим пристроєм. Химия и химические технологии / 4. Химико-фармацевтическое производство. 2011. URL: http://www.rusnauka.com/8_NND_2011/Chimia/4_81580.doc.htm.

129. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв : навч. посібник / Л.І. Ружинська та ін. Київ : НТУУ «КПІ», 2014. – 130 с.

130. ТОВАЖНЯНСЬКИЙ Л., НОВИКОВ В., БУХКАЛО С. Расчеты по технологии органических веществ : учебн. пособие. Харьков : НТУ «ХПИ», 2006. 84 с.

131. 14. Гапонов К.П. Процессы и аппараты микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. 240 с.

132. Тимонин А.С. Основы конструирования и расчета химико-технологического и природоохранного оборудования. Изд. 2-е. Калуга: Издательство Н. Бочкаревой, 2002. Т. 2. 560 с.

133. Ружинська Л. І., Шафаренко М. В., Воробйова О. В. Процеси, апарати та устаткування біотехнологічних виробництв-2. Лабораторний практикум : навч. посіб. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. 66 с.

134. Проць С. Ю. Виробництво біоетанолу з бурякової меляси : дипломний проєкт. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. 105 с.

135. Майофис А.С. Химия и технология химико-фармацевтических препаратов. 2 изд, перераб. и дополн. СПб. : Медицина, 1984. 378 с.

136. Соколов В. Н., Яблокова М. А. Аппаратура микробиологической промышленности. СПб. : Машиностроение, 1988. 278 с.

137. Машины и аппараты химических производств: Примеры и задачи : учебн. пособие / под ред. В. Н. Соколова. 2-е изд., перераб. и доп. СПб. : Политехника, 1992. 327 с.

138. Насос консольний К 8/18 | Ventilator. ТОВ «Промислові вентилятори » - інтернет магазин промислової вентиляції і електродвигунів,

Україна. Ventilator. URL: <https://ventilator.ua/product/nasos-konsolnyj-k-8-18-1-5-3000/#techincal>.

139. Вентилятор ВР 287-46 (ВЦ 14-46) №5 ел/дв 30,0/1500. Вентиляторний завод «Горизонт». URL: <https://www.vent.com.ua/ventilyator-vr-287-46-vc-14-46-5-ehldv-30-1500/>.

140. Single-stage VPM (VFD+PM) Screw Air Compressor | UCS. United Compressor Systems. URL: https://www.united-compressor.com/singlestage-vpm-vfdpm-screw-air-compressor_product52.html.

141. Соосный цилиндрический редуктор MR102, NR102. Редукторы, мотор-редукторы: ООО "Приводные технологии". URL: <https://tech-privod.com/index.pl?act=PRODUCT&id=240>.

142. J.P. SELECTA ROTABIT Шейкер лабораторный (Испания). Bimedis. URL: <https://bimedis.net/a-item/sheykeri-laboratorni-jp-selecta-rotabit-1637990>.

143. Весовой дозатор FlexW15S. Flexmash. URL: <https://flexmash.com/vesovoj-dozator-flexw15s/>

144. pH-метр промышленный pH-101П. Proflab: Лабораторное оборудование. URL: <http://proflab.com.ua/produkt/product-details/1600-rn-metr-promyshlennyj-rn-101p.html>.

145. Манометри ДМ 05-07. Склоприлад. URL: <https://steklopribor.com/catalog/measuring-instruments/pressure/5ff55ef5a50345425e7fd056>.

146. Термометр біметалічний ТБ-100-100 (0...+150)-1,5-О Склоприлад. RES.UA. URL: <https://res.ua/termometr-bimetalichniy-tb-100-100-0-150-15-o-skloprilad.html>.

147. Сацюк Н. П.. Инструкция по охране труда для работающих на автоклавах К. : Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН, 2008. 5 с.

148. Ковальчук В. А. Очистка стічних вод. Рівне : ВАТ «Рівненська друкарня», 2002. 622 с.