

**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 бактерійних інокулянтів для насіння на основі *Rhizobium leguminosarum*. Дільниця підготовки посівного матеріалу»

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-92

Белінська Дарина Олегівна _____

Керівник:

В.о. завідувача кафедри промислової біотехнології та біофармації, к.т.н.

Поліщук Валентина Юріївна _____

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

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

Шибєцький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

Асистент кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Дем'яненко Ірина Володимирівна _____

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

Студент(-ка) _____

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП БТ-9201. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	76	
3	A1	ДП БТ-9201. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП БТ-9201. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП БТ-9201. 03.000 ТК	Інокулятор	1	

				ДП БТ-9201 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Белінська Д.О.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Поліщук В. Ю.				1	76
Консульт.	.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-92	
Н/контр.						
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.					

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

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛІЩУК

« 19 » квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студентці

Белінській Дарині Олегівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва бактерійних інокулянтів для насіння на основі *Rhizobium leguminosarum*. Дільниця підготовки посівного матеріалу», керівник проєкту Поліщук Валентина Юріївна к.т.н., затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1888-с
2. Термін подання студентом проєкту 10.06.2023 р.
3. Вихідні дані до проєкту: кінцевий продукт – інокулянт для передпосівної обробки насіння, рідка форма; ферментер для промислового культивування - об'єм 1,5 м³.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва інокулянту для насіння; 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 інокулятору – 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, біохімічні основи виробництва	19.04.23- 23.04.23 р.	
2.	Методи отримання промислових продуцентів	23.04.23- 26.04.23 р.	
3.	Складання технологічної схеми,	26.04.23- 07.05.23 р.	
4.	Технологічна частина	7.05.23- 14.05.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	15.05.23- 21.05.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу, виконання креслення апарату	22.05.23- 28.05.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки та графічного ілюстративного матеріалу	29.05.23- 31.05.23 р.	
8.	Подання дипломного проєкту на рецензування	31.05.23- 05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проєкту та рецензії до експертної комісії	до 10.06.23 р.	

Студентка

Дарина БЕЛІНСЬКА

Керівник

Валентина ПОЛІЩУК

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва бактерійних
інокулянтів для насіння на основі *Rhizobium*
***leguminosarum*. Дільниця підготовки посівного матеріалу»**

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить 76 с., 11 рис., 4 табл., 57 посилань.

Проект присвячено розробці технології виробництва біологічних насінєвих інокулянтів на основі *Rhizobium leguminosarum* та діляниці підготовки посівного матеріалу.

В якості продуцента було обрано *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* та запропоновано схему його селекції, шляхом штучного добору. Обрано поживне середовище для напрацювання посівного матеріалу та виробничого культивування на основі маніту, глюкози та дріжджового екстракту.

Для отримання посівного матеріалу вибрано відповідне обладнання – пробірки, колби та інокулятор та наведено конструктивний та технологічний розрахунки останнього.

В проекті представлені технологічна та апаратурна схеми виробництва інокулянтів на основі *Rhizobium leguminosarum* у пляшках по 1 л. Розроблена технологія відповідає санітарно-гігієнічним та екологічним нормам, а також вимогам техніки безпеки та охорони праці..

НАСІНЕВИЙ ІНОКУЛЯНТ, *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE*, ШТУЧНИЙ ДОБІР, ІНОКУЛЯТОР

					ДП БТ-9201 00.000.00		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ		
Розроб		Белінська					
Конс.							
Кервн.		Полішук В.Ю.					
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						6	76
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

ABSTRACT

The diploma project contains 76 pages, 11 figures, 4 tables and 57 references.

The project is devoted to the development of technology for the production of biological seed inoculants based on *Rhizobium leguminosarum* and the inoculum preparation site.

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* was chosen as the producer and proposed a technology for its preparation through artificial selection. A nutrient medium was selected for the development of inoculum material and production cultivation based on mannitol, glucose and yeast extract.

To obtain inoculum material, appropriate equipment was selected - test tubes, flasks, and an inoculator, and structural and technological calculations of the last were given.

The project presents technological and equipment schemes for the production of inoculants based on *Rhizobium leguminosarum* in 1-liter bottles. The developed technology complies with sanitary, hygienic and environmental standards, as well as safety and occupational health and safety requirements.

SEED INOCULANT, RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICIAE,
ARTIFICIAL SELECTION, INOCULATOR

					ДП БТ-9201 00.000.00		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ABSTRACT		
Розроб	Белінська						
Конс.							
Кервн.	Полішук В.Ю.						
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						7	76
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	10
ВСТУП.....	11
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	13
1.1 Основні промислові продуценти	13
1.2 Систематичне положення.....	14
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	15
1.4 Культуральні ознаки	16
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки	17
1.6 Поширення в природі	19
РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	20
2.1 Характеристика цільового продукту.....	20
2.2 Схема хімічних перетворень.....	20
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	22
РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	27
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту	27
3.2 Загальні методи створення промислового продуценту	29
3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів	29
3.2.2 Використання індукованого мутагенезу	31
3.2.3 Використання гібридизації	32
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	33
РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	35
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	36

					<i>ДП БТ-9201 00.000.00</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ЗМІСТ</i>		
<i>Розроб</i>		Белінська					
<i>Конс.</i>							
<i>Кервн.</i>		Поліщук В.Ю.					
<i>Затв</i>							
					<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
						8	76
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	58
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	58
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	60
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання.....	68
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	69
ВИСНОВКИ.....	71
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	72

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ПС – поживне середовище

ПМ – посівний матеріал

КР – культуральна рідина

КУО – колоніє утворюючі одиниці

					<i>ДП БТ-9201 00.000.00</i>		
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ</i>		
<i>Розроб</i>		Белінська					
<i>Конс.</i>							
<i>Кервн.</i>		Поліщук В.Ю.					
<i>Затв</i>							
					<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
						10	76
					<i>КПІ ім.. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		

ВСТУП

Сільське господарство є однією з найбільш розвинених та перспективних галузей економіки в Україні. На її територіях вирощується велика кількість зернових та зернобобових культур, що використовуються як для експорту так і для внутрішнього використання. На світовому продовольчому ринку все більшого значення набувають однорічні бобові культури, оскільки вміст білку в ньому у кілька разів перевищує цей показник у зернових культур. Білок у складі бобових є повноцінним за амінокислотним складом і значно краще засвоюється за білок зернових культур, тому зернобобові культури широко використовуються як у харчовій сфері, так і у кормових цілях[1].

Таким чином, агросфера України, як одного з найбільших постачальників продовольчих ресурсів у Європі, розвивається дуже стрімкими темпами та дедалі більше потребує застосування сучасних, в тому числі і біотехнологічних методів.

Серед зернобобових культур, що вирощуються в Україні найбільшу частину складають соя та горох. Відповідно до даних державної служби статистики України, у 2021 році було вирощено понад 5600 тис.ц гороху [2]. Особливістю бобових є їх здатність до засвоєння атмосферного азоту за допомогою симбіотичних бактерій, що утворюють бульбочки у їх кореневій системі. Азот відіграє дуже важливу роль у рості та розвитку рослин: він входить до складу білків та інших органічних сполук і безпосередньо впливає на процеси накопичення біомаси формування пагонів. Проте у ґрунті, азот переважно міститься в органічній формі, яка є важкодоступною для рослин, а мінеральні форми нітрогену наявні у дуже незначних кількостях.

Для задоволення потреб рослин у нітрогені широко використовуються мінеральні добрива, проте їх синтез є дорого вартісним і енергомістким, і їх виробництво набуло тенденції до скорочення [3], тому все більшого

					<i>ДП БТ-9201 00.000.00</i>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>		
Розроб	Белінська						
Конс.							
Кервн.	Поліщук В.Ю.						
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						11	76
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

розповсюдження набувають саме біологічні добрива, які сприяють кращому засвоєнню рослинами азоту, за рахунок інтенсифікації процесу його біологічної фіксації.

Rhizobium leguminosarum – це азот фіксуючі симбіотичні бактерії гороху. Це доволі поширені мікроорганізми, що набули широкого використання як компоненти рослинних біопрепаратів. Було доведено ефективність використання препаратів на основі ризобії для бактеризації рослин гороху та інших бобових культур[4].

Використання інокулянтів з *Rh. leguminosarum* для передпосівної обробки гороху може не тільки підвищити врожайність культури, а й зменшити рівень використання азотних добрив. Крім того, ризобії доволі прості для культивування мікроорганізми і не потребують дорогої сировини чи жорстких умов (надмірного тиску критичних температур, значного рівня кислотності), тому виробництво подібних біопрепаратів є дешевим і вигідним.

Метою проекту є вдосконалення технології виробництва бактерійних інокулянтів на основі *Rh. leguminosarum* для застосування у сільському господарстві.

Для виконання мети поставлені завдання:

- ознайомитися з особливостями культивування азотфіксуючих мікроорганізмів зокрема ризобій гороху;
- обґрунтувати вибір технології виробництва та продуценту;
- охарактеризувати ризобії гороху як промислові продуценти для виробництва насінєвих інокулянтів;
- визначити біохімічні основи зв'язку продуцента з горохом та біологічної фіксації азоту;
- проаналізувати методи створення промислових продуцентів;
- скласти апаратурну та технологічну схеми біотехнологічного виробництва інокулянтів для насіння гороху;
- розрахувати обладнання для ділянки підготовки посівного матеріалу.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						12
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Основною метою виробництва насінєвих інокулянтів для бобових рослин є покращення їх азотного живлення, не застосовуючи при цьому мінеральні азотні добрива. Для цього використовуються природні симбіонти бобових – бульбочкові бактерії.

Бульбочкові бактерії широко поширені в природі і є однією зі складових ґрунтової мікрофлори. Хоча бульбочкові бактерії здатні доволі тривалий час існувати у ґрунті без рослин (за рахунок сапрофітного способу живлення), їх чисельність за відсутності бобових знижується і вони поступово зникають. Через необхідність для бульбочкових бактерій рослини-носія при вирощуванні бобових на ділянках де тривалий час не вирощувалися представники бобових або зернобобових культур вони можуть бути відсутні у ґрунті, в наслідок чого симбіотичний зв'язок не сформується [5].

Найчисленнішими серед симбіонтів бобових є роди *Rhizobium* і *Bradyrhizobium*. Важливу роль у формуванні видового різноманіття ризобії відіграє процес перенесення плазмід між штамми. Завдяки здатності ризобіальних плазмід переносити хромосомні гени, популяції бульбочкових бактерій налічують величезну кількість різноманітних генотипів [5].

Для використання у промислових цілях, важливу роль відіграють вірулентність конкретного виду та штаму, високий рівень нітратредуктазної активності та спорідненість штаму з цільовою рослиною. Взаємодія бобових рослин та бульбочкових бактерій в першу чергу зумовлена тим, що рослини кореневою системою здатні виділяти екsudати, що викликають позитивний хемотаксис ризобії. Крім того, у формуванні бобово-ризобіального симбіозу важливу роль відіграють фітогормони, які сприяють формуванню симбіотичних

					ДП БТ-9201 00.000.00		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розроб	Белінська						
Конс.							
Кервн.	Поліщук В.Ю.						
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						13	76
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

зв'язків лише з певними мікроорганізмами [6]. Таким чином вибір продуценту для біопрепарату в першу чергу залежить від цільової культури.

Цільовою культурою було обрано горох. Симбіотичні зв'язки з горохом здатні формувати представники кількох родів – *Rhizobium*, *Sinorhizobium* та *Bradyrhizobium*, проте найбільшу спорідненість, і як наслідок, більшу ефективність симбіозу має мікроорганізм роду *Rhizobium* – *Rhizobium leguminosarum*. Крім того, *Rh. leguminosarum* проявляють симбіотичну активність по відношенню до деяких інших бобових, зокрема сочевиці, бобів та чини. Тому продуцентом було обрано саме *Rh. leguminosarum*.

Rh. leguminosarum широко застосовується в якості основного компонента інокулянтів для гороху. Препарати на основі еталонного штаму *Rh. leguminosarum* bv. *viceae* 250a підвищують врожайність гороху майже на 5% [7]. Деякі штами того ж біовару здатні підвищити цей показник більше ніж 20% відсотків та показують суттєве підвищення рівню азотфіксувальної активності та позитивно впливають на формування біомаси рослини [7, 8,9].

Перевагами *Rh. leguminosarum* також є їх висока конкурентоспроможність (представники цього виду здатні формувати бульбочки у присутності інших вірулентних штамів), а також володіють високою спорідненістю з рослинам гороху, що дозволяє використовувати препарат на більшості сучасних промислових сортів. При взаємодії рослин з ризобіями даного виду також спостерігається підвищення рівня стресостійкості рослин та поліпшення протікання хвороб грибного та бактеріального походження.

1.2 Систематичне положення

Домен:	<i>Bacteria</i>
Тип:	<i>Pseudomonadota</i>
Клас:	<i>Alphaproteobacteria</i>
Порядок:	<i>Hyphomicrobiales</i>
Родина	<i>Rhizobiaceae</i>
Рід	<i>Rhizobium</i>
Вид	<i>Rh. leguminosarum</i> [10]

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						14
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відповідно до визначника Берджи [12], ризобії відносяться до четвертої групи – грамнегативні аеробні/мікроаерофільні палички та коки, підгрупа 4А (аероби).

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Rh. leguminosarum – це грамнегативні аеробні паличкоподібні організми. Клітини дрібні. В довжину вони сягають 1,2 - 3,0 мкм, а в ширину 0,5 - 0,9 мкм.

Не формують ланцюгів або скупчень, клітини поодинокі.

Морфологія клітин наведена на рисунках 1 та 2. На першому рисунку наведено картину, що отримана у оптичному мікроскопі (барвник – фуксин, збільшення - 1000), на другому наведено зображення, отримане в шляхом трансмісійної електронної мікроскопії.

У вільноживучому стані клітини здатні рухатися з допомогою одного полярного джгутика, проте при потраплянні до кореневої системи гороху всередині бульбочок бактерії присутні у плеоморфному вигляді. Всередині бульбочок клітини ризобії збільшуються у розмірах (у 2-3 рази) та активно діляться. Оскільки *Rh. leguminosarum* діляться шляхом бінарного поділу у середині бульбочки можна спостерігати Т-подібні та Y-подібні форми (клітини в процесі поділу).

Також клітини набувають плеоморфної форми у разі перебування у несприятливих для росту умовах. Не формують спор.

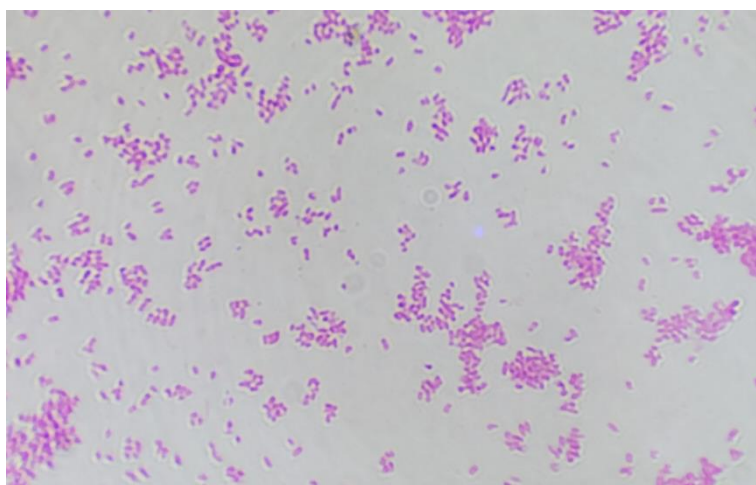


Рисунок 1.1 Морфологія *Rh.leguminosarum* (фуксин, збільшення - 1000)

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

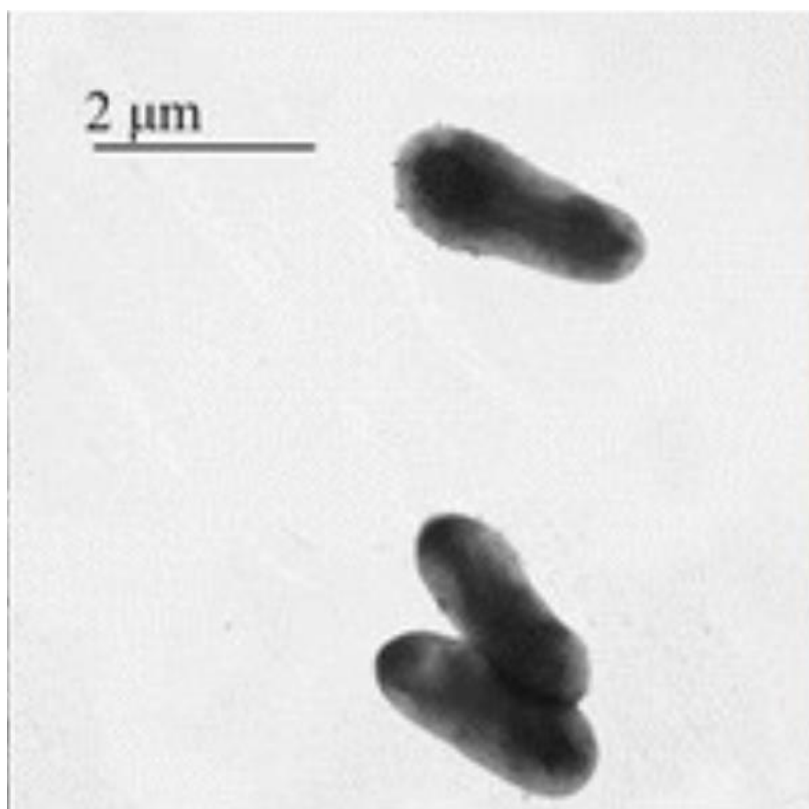


Рисунок 1.2 Морфологія *Rh.leguminosarum*
під електронним мікроскопом[11]

При культивуванні на середовищах з високим вмістом вуглеводів, ріст супроводжується виробленням великої кількості позаклітинного слизу полісахаридної природи. Клітини *Rh. leguminosarum* містять гранули полі-β-гідроксibuтирату, який здатен заломлювати світло за фазово-контрастної мікроскопії [12].

1.4 Культуральні ознаки

Ризобії здатні рости як на щільних (поверхнево) та і на рідких (глибинно, за умови достатньої аерації) поживних середовищах.

На щільних середовищах, до складу яких входять вуглеводи та дріжджі *Rh. leguminosarum* формує округлі випуклі слизисті колонії близько 2-4 мм в діаметрі після 3-5 діб культивування. Колонії напівпрозорі, бежево-молочного кольору, з рівним краєм (рис.3).

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						16
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

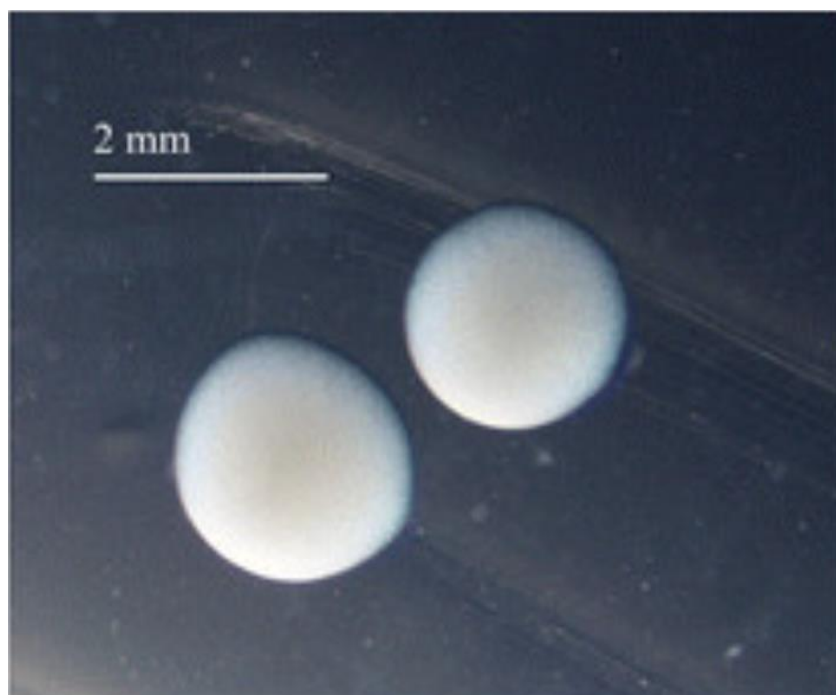


Рисунок 1.3 Колонії *Rh. leguminosarum* на щільному поживному середовищі[11]

При культивування на рідких середовищах аналогічного складу з постійним перемішуванням значної щільності культура набуває на 2-3 добу. Клітини розподіляються рівномірно, не формуючи грудочок чи інших скупчень. За тривалої відсутності перемішування клітини осаджуються утворюючи щільний шар осаду, що добре розміщується знову формуючи завись. Колір культуральної рідини подібний до кольору колоній на щільних середовищах – молочно-бежевий.

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Ризобії є хемоорганотрофами. В залежності від зовнішніх умов ризобії можуть вести гетеротрофний або симбіотичний способи життя. При сапрофітному існуванні (незалежно від рослини) основним енергетичним шляхом є дихання з киснем в якості кінцевого акцептора електронів. При існуванні *in planta* (у симбіозі з горохом) здатні до фіксації атмосферного азоту з перетворенням його у амонійну форму, що здатна засвоюватися рослиною-хазяїном [12].

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						17
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

За відсутності рослини-носія джерелами азоту слугують солі амонію та інші мінеральні солі, що містять у своєму складі нітроген. Майже не розкладають пептон та не засвоюють казеїн та агар-агар.

Більшість штамів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* здатні рости на мінімальних та синтетичних середовищах.

В якості джерела карбону можуть використовувати різноманітні вуглеводи та солі органічних кислот, проте не здатні розкласти целюлозу та крохмаль [12]. Під час культивування на вуглеводмісних середовищах *Rh. leguminosarum* підкислюють середовище, проте вони є нестійкими до низьких рівнів рН. Зниження рівня рН зазвичай призводить до зниження активності та вірулентності клітин, а також сповільнення ростових процесів культури. Оптимальна кислотність ґрунту для формування симбіотичних зв'язків 6,5-7,0 [5].

Для повноцінного розвитку ризобії та нормального формування бульбочок окрім вуглецю та азоту необхідні калій та фосфор. Основним джерелом цих елементів є мінеральні солі. У складі поживних середовищ переважно використовуються фосфати калію – одно та двозаміщений калій фосфат, які окрім безпосередньо живлення клітин відіграють роль буферу для підтримки стабільного рівня рН [1].

Ризобії є мезофілами. Оптимальна температура їх росту становить 25-30°C [12]. При цьому дані мікроорганізми є стійкими до низьких температур проте гинуть при температурі вищій за 50°C.

Вважається що на ріст *Rh. leguminosarum*, як і інших бульбочкових бактерій, суттєво впливає рівень аерації середовища культивування. При недостатньому рівні кисню настає кисневе голодування. В таких умовах в якості кінцевого акцептора електронів можуть використовуватися оксиди азоту, та кількість кореневих бульбочок та здатність до їх формування різко знижується.

Важливу роль у формування симбіотичних зв'язків відіграє вологість. Як надмірне зволоження так і пересихання негативно впливає як на симбіотичні

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

мікроорганізми так і на рослини гороху. Оптимальним рівнем вологості для формування корневих бульбочок вважається 60-70% повної вологоємності [5].

1.6 Поширення в природі

Rhizobium leguminosarum – це поширені у природі ґрунтові бактерії. Хоча основною екологічною нішею для ризобії є безпосередньо коренева система гороху, вони можуть також зустрічатися і на інших бобових рослинах, а також вільноживучими в ґрунті.

Симбіонти гороху зустрічаються у помірному та іноді тропічному поясі в нейтральних ґрунтах (чорноземах, окультурених дерево-підзолистих)[5,12]. Їх основною біологічною роллю є участь у колообізі нітрогену. Фіксуючи азот у симбіозі з бобовими ризобії не тільки забезпечують рослину нітрогеном, а ще й (хоча і в меншому ступені) збагачують ним ґрунти, що покращує ростову показники культур, що вирощуються на цих земельних ділянках

Rh. leguminosarum є нетоксичним для навколишнього середовища та не шкідливим для людини тварин та рослин.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика цільового продукту

Основною діючою речовиною препаратів для передпосівної обробки насіння є безпосередньо клітини азотфіксуючих мікроорганізмів. Переважно для здешевлення виробництва та збільшення зручності використання насінєвих інокулянтів вони випускаються у рідкій формі.

По суті готовим продуктом є безпосередньо культуральна рідина з клітинами та всіма продуктами їх життєдіяльності. Для підвищення ефективності препарату до його складу можуть бути додані різноманітні адьюванти, в тому числі і прилипачі, що сприяють кращому утриманню ризобіїв на насінні, проте це не є обов'язковим етапом виробництва.

Цільовий продукт являє собою непрозору рідину світло-бежевого кольору, що містить не менше ніж $1 \cdot 10^9$ клітин/мл.

Препарат має приємний, властивий ризобіям, запах подібний до запаху гороху або хлібу, без різкого чи кислого присмаку. Рідина однорідна, не в'язка, за фізичними характеристиками подібна до води.

Термін зберігання препарату (без втрати активності) – не більше 6 місяців.

2.2 Схема хімічних перетворень

В процесі напрацювання мікробної біомаси що і є основним продуктом біосинтезу важливо задовольнити всі потреби продуценту у поживних речовинах та створити оптимальні умови культивування для нормального росту та розвитку клітин.

Культивування здійснюється періодичним методом. Оптимальними умовами для *Rhizobium leguminosarum* є температура в діапазоні $28 \pm 2^\circ\text{C}$ та $\text{pH} = 6,8-7,2$.

					<i>ДП БТ-9201 00.000.00</i>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб	Белінська						
Конс.							
Кервн.	Поліщук В.Ю.						
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						20	76
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Джерелом карбону для цих мікроорганізмів виступають вуглеводи. Безпосередньо до складу середовища входять маніт та глюкоза, що катаболізуються за шляхом Ентнера-Дудорова (рис. 2.4).

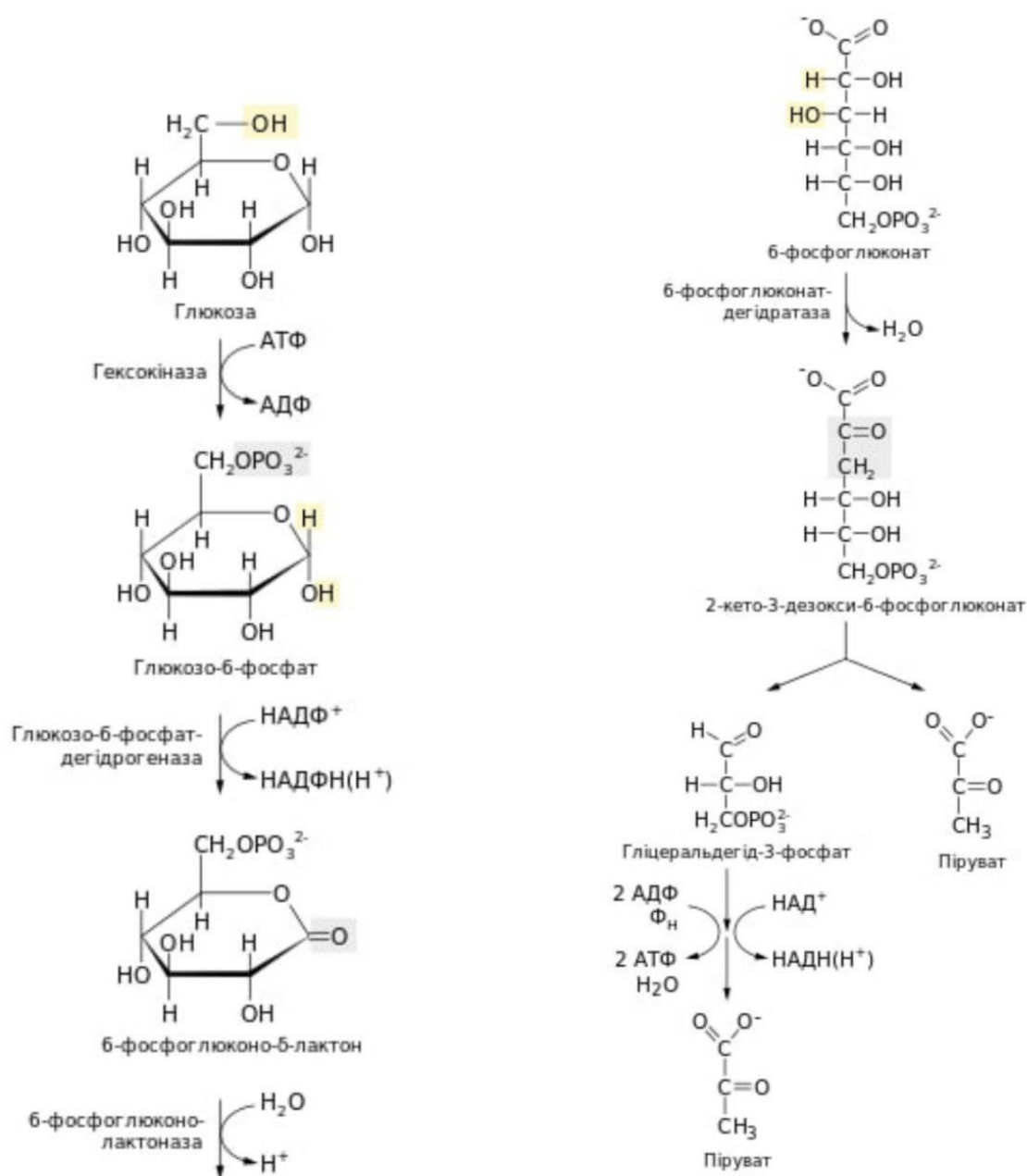


Рисунок 2.4 Схема реакцій шляху Ентнера-Дудорова

КДФГ-шлях починається з фосфорилування глюкози з перетворенням її на глюкозо-6-фосфат під вплив гексокінази. Після цього під дією глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та альдолази відбувається окислення глюкозо-6-фосфату до 6-фосфоглюконату. Далі відбувається розщеплення 6-фосфоглюконату на

піруват та гліцеральдегід-3-фосфат, який може піддаватися дії ферментів гліколітичного шляху та перетворюватися на другу молекулу пірувату з відновленням однієї молекули НАД та утворенням двох молекул АТФ [13].

Утворені молекули піровиноградної кислоти через Ацетил-КоА включаються у цикл трикарбонових кислот.

Нітроген засвоюється *Rh. leguminosarum* як у органічній так і у мінеральній формі. Амінокислоти безпосередньо транспортуються в клітину та включаються у біосинтез білків клітини. Мінеральний азот у формі амонійних іонів, що входять до складу поживного середовища переважно засвоюється під дією глутаматдегідрогенази та бере участь у синтезі глутамінової кислоти.

Для повноцінного розвитку клітинам ризобії необхідний кисень який є кінцевим акцептором електронів у електронно-транспортному ланцюзі. Крім того, дихання забезпечує організм енергією, що акумулюється у вигляді АТФ.

Ланцюг перенесення електронів починається з перенесення на хінон (кофермент Q), який був отриманий від різноманітних сполук, таких як НАДН, сукцинат та ін., та в ході біохімічних реакцій, наприклад дегідруванні жирних кислот. Таким чином, за допомогою специфічних дегідрогеназ формується пул хінонів. Відновлені хінони окислюються за допомогою системи цитохромів і таким чином електрони передаються на кисень з утворенням води [14].

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

Готова форма рідкого препарату містить $1 \cdot 10^9$ життєздатних клітин бактерій *Rh. leguminosarum bv. viciae* на 1 мл (число сторонніх мікроорганізмів від числа ризобії не перевищує 5%). До складу препарату входять також екзополісахариди, що синтезуються ризобіями, та всі продукти їх життєдіяльності. У готовій формі також можуть бути присутні сліди компонентів поживного середовища.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						22
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.4 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Основною екологічною та біохімічною нішею бульбочкових бактерій є кореневі бульбочки (рисунок 2.5).

Завдяки цим структурам відбувається обмін поживними речовинами: бактерії надають рослині відновлений азот у амонійній формі, а рослини надають бактеріям вуглеводи.



Рисунок 2.5 Кореневі бульбочки на молодих рослинах гороху [15]

Для інфікування рослин та формування корневих бульбочок необхідна наявність доволі великої кількості життєздатних бактерій у прикореневій зоні (аж до 70 000 клітин на одну насінину, проте не менше кількох сотень).

Розмноження і утримання бульбочкових бактерій на поверхні кореня стимулюється специфічними виділеннями рослини. Велика кількість органічних речовин, здатні слугувати сигналами для позитивного хемотаксису ризобії до поверхні кореня [16] та найбільшу роль у перших етапах формування бобово-ризобіальної взаємодії належить амінокислотам та фітогормонам [6, 16]. На поверхні кореня утворюється слизистий чохлик, в якому і накопичуються бактерійні клітини.

Після генетичних змін та сигнальних процесів за участі рослинних флавоноїдів та бактеріальних Nod-факторів бактерії проникають у кореневі волоски через ново синтезовані специфічні рослинні структури – інфекційні нитки, завдяки чому відбувається ініціація меристематичної активності кортикальних клітинах кореня і утворенням примодію бульбочки.

У розвитку бобово-ризобіального симбіозу можна виділити 3 етапи.

- попередня інфекція (відбувається розпізнавання партнерів на молекулярному рівні та підготовка до формування симбіотичної системи)
- власне інфекція (бактерії проникають всередину рослини інфекційними нитками)
- ендцитоз ризобій з інфекційної нитки (в цитоплазмі рослинної клітини бактерії оточуються прибактероїдними мембранами. Клітини ризобіїв збільшуються у розмірах, що і сприяє утворенню бульбочки на корені) [17, 18].

На рослинах гороху формуються недетерміновані бульбочки. Вони складаються з чотирьох зон: мерестиматичної, інфекційної, фіксуючої та старіючої (тільки у повністю сформованих дорослих бульбочках) [18].

Будова кореневої бульбочки та її зв'язок з коренем наведено на рисунку 6. Бактерії, оточені при бактерійними мембранами розташовуються у бактероїдній зоні бульбочки 3. Для захисту від механічних подразнень бульбочка вкрита кіркою 4, під якою знаходиться мерестематична зона, що складається з меристеми 8 та верхівкової меристеми 9. Для забезпечення обміну речовин бактероїдна зона оточена, бульбочковою ендодермою 7 в якій знаходяться судинні пучки 5 бульбочки, оточені ендодермою судинних пучків 6. З судин бульбочки поживні речовини транспортуються у рослину через судинну тканину кореня 1, яка розташована в кореневій ендодермі 2.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						24
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

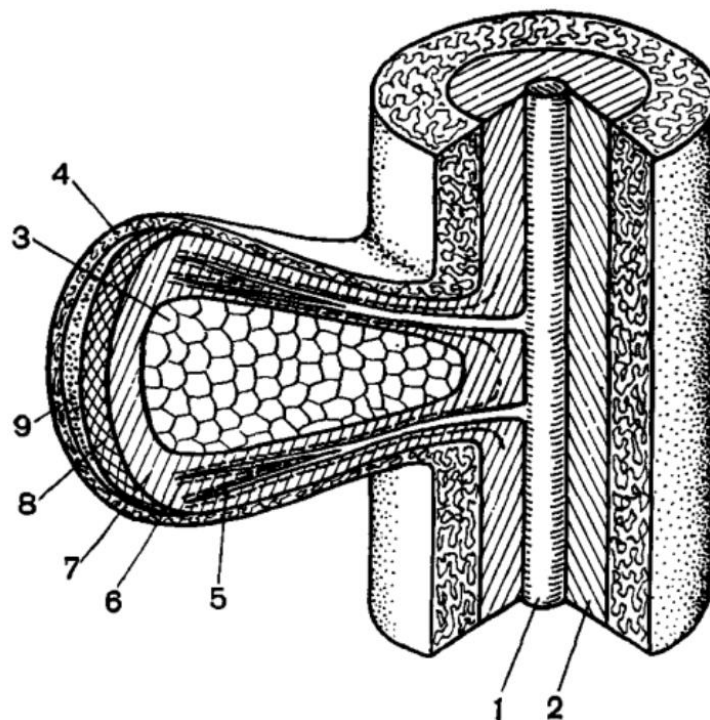
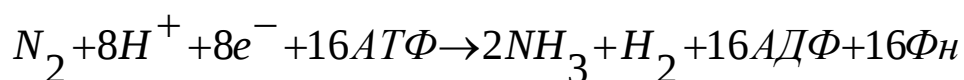


Рисунок 2.6 Схеми будови кореневої бульбочки та її зв'язку з коренем

Створення бульбочок – доволі енергозатратний процес як для рослини так і для мікроорганізмів. Основна її функція – це азотфіксація, тому в умовах достатньої кількості мінерального азоту в середовищі бобово-ризобіальні зв'язки не формуються. Якщо кількість доступного нітрогену у ґрунті збільшується вже після формування бульбочок, вони розпадаються, а ризобії повертаються до вільноживучої форми існування.

Азотфіксація – це процес відновлення молекулярного азоту N_2 до іонів NH_4^+ . Це перетворення каталізується нітрогеназою що виробляється клітинами бульбочкових бактерій. Процес азотфіксації у загальному вигляді описується рівнянням:



Біологічна фіксація азоту є дуже енергозатратним процесом. За деякими розрахунками на фіксацію 1г азоту, включно з усіма необхідними ферментами, необхідна енергія, що може бути отримана з 100-200 г глюкози [19].

Нітрогеназний комплекс складається з пептидних послідовностей трьох типів, а також двох кофакторів – залізовміщуючого та молібден-залізовміщуючого. Нітрогеназа складається з двох субодиниць. Одна з них (більша субодиниця) – динітрогеназа. Це Мо-Fe-білок, який відповідає за протікання реакції азотфіксації. Мо-Fe-субодиниця володіє всіма необхідними структурами для забезпечення окиснення азоту, проте для цього вона потребує стороннє джерело електронів.

Функцію подачі електронів до Мо-Fe-білка виконує Fe-білок – редуктаза нітрогенази. Ця субодиниця перекачує електрони до активного центру ферменту використовуючи енергію АТФ.

Завдяки низькій субстратній специфічності нітрогеназа здатна відновлювати сполуки з потрібним зв'язком, такі як ацетилен, метилацетилен, ціанід та інші а також йони H^+ до водню [19, 20].

Важливою особливістю нітрогенази є її чутливість до кисню. Наявність кисню навіть у малих концентраціях інактивує нітроген азу та інгібує процес фіксації азоту. У вільноживучій формі ризобії не здійснюють фіксацію азоту, оскільки основним шляхом отримання енергії для них є кисневе дихання, проте у симбіозі з горохом рослина відіграє роль захисника нітрогенази від кисню [19].

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						26
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Геном *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* складається з однієї кільцевої хромосоми та 6 нехромосомних ділянок ДНК – плазмід. Загальна кількість нуклеотидів в усьому геномі складає близько $7,75 \cdot 10^6$ нуклеотидних пар, 65% з яких розташовуються у хромосомі.

Філогенетично *Rh. leguminosarum* є найбільш спорідненими з *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* та *Mesorhizobium loti* (філогенія повністю секвенованих геномів окремих α -протеобактерій, заснована на зчеплених послідовностях 648 ортологічних білків наведено на рисунку 3.7).

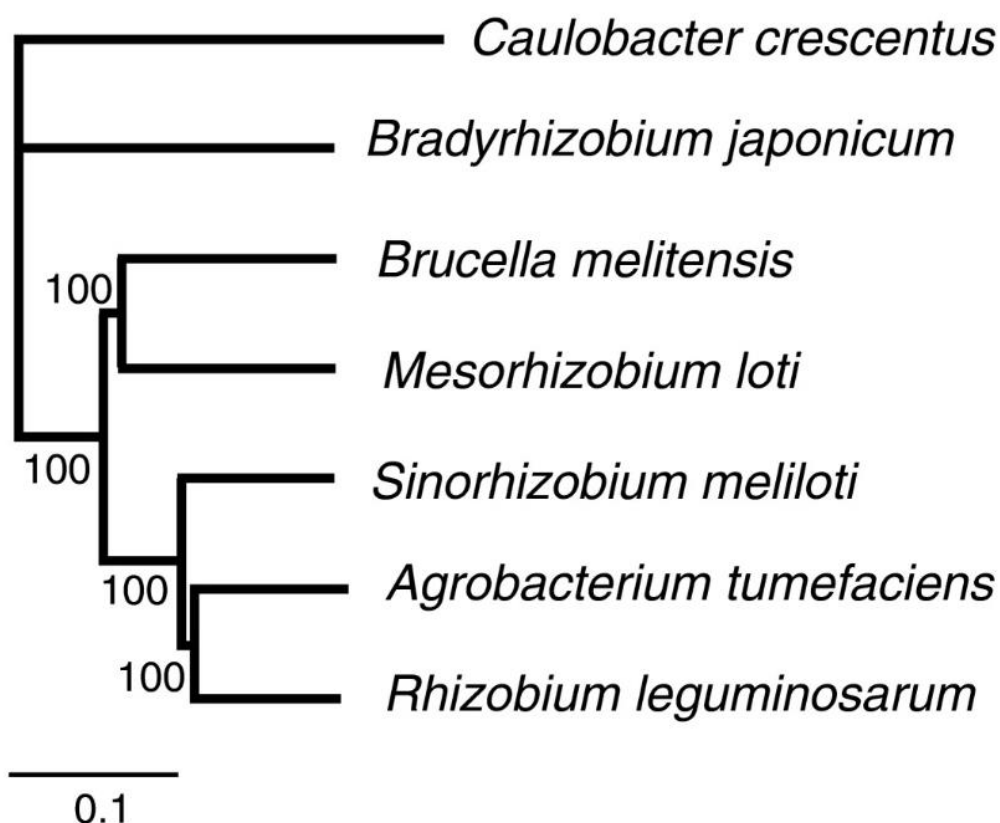


Рисунок 3.7 Філогенез *Rh. leguminosarum*

					ДП БТ-9201 00.000.00				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб		Белінська			РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ	Літ.	Арк.	Акрушів	
Конс.							27	76	
						КПІ ім.. Ігоря Сікорського ФБТ			
Кервн.		Полішук В.Ю.							
Затв									

При цьому, хромосомна ДНК усіх перерахованих видів максимально подібна, проте плазмідний набір генів значно різниться. Найбільша спорідненість у плазмідах спостерігається серед трьох штамів ризобіїв, проте їх позахромосомна ДНК суттєво відрізняється від плазмід *A. tumefaciens*.

Розподілення генів за їх функціональним призначенням наведено на рисунку 3.8.

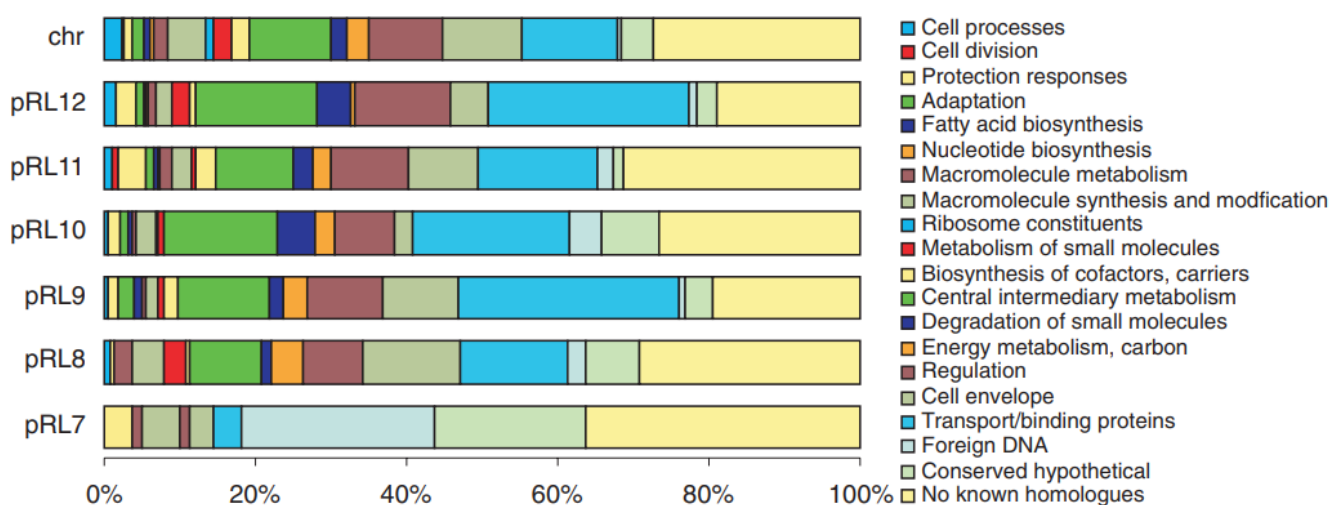


Рисунок 3.8 Розміщення функціональних класів генів у геномі

Більшу частину (61%) нуклеотидних пар складають гуанін-цитозинові У хромосомній послідовності містяться всі три рРНК-оперони та 52 гени, що кодують тРНК. Більшість протеїн-кодуючих генів також хромосомні, хоча незначна їх частина локалізується у плазмідах. [21]. Центральні метаболічні гени, що кодують ферменти циклу Кребса, дихального ланцюга, пентозофосфатного шляху, а також ферменти метаболічних шляхів перетворення нуклеотидів та вуглеводів (в тому числі і КДФГ-шляху) локалізовані у хромосомі. Ці гени відповідають за ріст та повноцінний розвиток організму [22].

Гени симбіотичної азотфіксації можна поділити на три великі групи: *nod*, *nif* та *fix* гени. Продукти експресії *nod*-генів – фактори, що необхідні на початкових стадіях формування бульбочок. *Nif*-гени – гени, що відповідають за

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						28
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

синтез та функціонування нітрогеназного комплексу Fix-гени – гетерогенна група генів що включають фактори азотфіксації, що не відповідають за нодуляцію та функціонування нітрогенази. До цієї групи відносяться гени, що беруть участь у розвитку та метаболізмі бактероїдів, та інші гени [24].

Механізм регуляції азотфіксації локалізовано у позахромосомній ДНК. 13 генів що кодують Nod-фактори щільно згруповані на одній з плазміді pRL10 поруч з якими розташовані допоміжні гени, що також беруть участь у формуванні вузликів у кореневій системі бобових. Гени нодуляції у плазмідах оточені генами, що регулюють фіксацію азоту. Кластер регуляції азотфіксації займає близько 66-76% плазміді. Лише менше 30% нуклеотидних пар відносяться до некодуючих ділянок [21, 23].

Експресія генів азотфіксації регулюється групою ієрархічно організованих регуляторних генів. Відчуваючи оптимальні для азотфіксації умови зовнішнього середовища вони передають цю інформацію до рівня експресії генів. Подібний механізм регуляції відповідає за спороутворення у багатьох бактерій, наприклад *Bacillus subtilis*. Концентрація кисню є критичним сигналом для регуляції експресії nif-генів. Цей процес опосередковується через загальну регуляторну систему азоту та специфічні регуляторні гени [24].

3.2 Загальні методи створення промислового продуценту

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Однією з важливих властивостей бульбочкових бактерій є їх здатність до передачі генетичної інформації під час кон'югації (як в середині одного виду, так і міжвидово). В наслідок цього, при виділенні бульбочкових бактерій з навколишнього середовища в суспензії будуть присутні не тільки різні види, а ще й різні штами цільового мікроорганізму, що робить необхідним застосування природного та штучного добору.

Першим етапом відбору промислових штамів *Rh. leguminosarum* є перевірка їх вірулентності по відношенню до цільової культури та

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

конкурентноздатності. Для цього насіння гороху інфікується культурою ризобій і для подальшої селекції використовуються лише ті штами, які здатні до формування бульбочок.

Оскільки насінні гороху наявний доволі великий запас поживних речовин, що дозволяє рослинам пережити недостатність нітрогенного живлення на ранніх етапах без залучення ризобіального симбіозу, для визначення ефективних штамів проводяться вегетаційні дослід.

Лабораторне дослідження проводиться наступним чином. Насіння гороху стерилізується у 70% розчині етилового спирту протягом 15 хв. та промивається проточною водою, після чого насіння інокулюється суспензією *Rh. leguminosarum* із вмістом клітин приблизно $1 \cdot 10^7$ клітин/мл (суспензії різних розчинів готуються за стандартом каламутності).

Рослини культивуються у пластиковому посуді (стерилізація 20% розчином перекису водню) у ґрунтозамінниках, таких як річковий пісок, вермикуліт або їх суміш при постійному штучному освітленні (або за умов природного освітлення). Відносну вологість ґрунту підтримують на рівні 60%. У середовище вносять усі необхідні макро- та мікроелементи в нормі окрім нітрогену. Джерелом азотного живлення слугує розчин Гельригена, в якому міститься 25% від норми внесення нітрогену.

Дослід проводиться у чотирьох або п'ятикратній повторності по 5-10 рослин у кожній. В якості контролю використовуються не інокульовані рослини.

Аналогічні досліді проводять і в польових умовах на невеликих площах. Рослини гороху культивуються на сірих супіщаних ґрунтах з негативним контролем на ризобії гороху.

Як у польових так і у лабораторних дослідженнях. Визначається кількість та масу корневих бульбочок, надземну масу дослідних рослин, а також азотфіксувальну зданість бактерій (визначається ацетиленовим методом Харді) на двох контрольних точках – початок утворення 3-го справжнього листка та фаза бутонізації (початок цвітіння).[25-28]

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						30
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

Для підвищення ефективності ризобії для використання у агросфері може використовуватися спрямований мутагенез. В такому випадку чинниками мутагенезу можуть бути як хімічні і фізичні фактори так і їх комбінація. До хімічних мутагенів відносять вадкі метали, деякі антибіотики (колхіцин та ін), а також хімічні сполуки органічної природи, такі як нітрозометилсечовина, диметилсульфат та нітнотозогуанідин. Фізичним мутагеном, що також широко використовується для індукування генетичних змін у мікроорганізмах є ультрафіолетове випромінювання, яке може комбінуватися з будь-яким хімічним мутагеном.

Вплив фізичних та хімічних мутагенів призводить до утворення мутантів, що є ауксотрофами по незнаних групах речовин. Також хімічні фактори мутагенезу здатні впливати на вірулентність клітин та їх стійкість о антибіотиків.

Найчастіше для проведення мутагенезу використовують УФ-випромінювання та нітнотозогуанідин.

Обробці мутагеном піддається суспензія клітин. У випадку використання УФ-випромінювання використовуються дози до 2000 ерг/мм² з часом експозиції 5-60 хвилин в залежності від щільності бактерійної суспензії.

Хімічні мутагени також використовуються безпосередньо на суспензії клітин в середовищі буферу. Кількість мутагену може коливатися від 0,1мкл до 1мл з аналогічним часом експозиції.

Використання хімічних і особливо хімічних методів мутагенезу є доволі простим та дешевим і може показувати значне підвищення ефективності штамів ризобій, проте частота отримання ефективних мутацій низька (близько 2-3%) і в результаті мутації виникають пошкодження геному, що ускладнює їх подальший генетичний аналіз [29].

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						31
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2.3 Використання гібридизації

Останнім часом все більшого поширення набуває використання гібридизації, а саме транспозонового мутагенезу, для отримання промислових штамів бульбочкових бактерій.

Представники родини Rhizobiaceae здатні піддаватися генетичним трансформаціям трьома методами – трансформацією, трансдукцією (перенесення фрагментів ДНК за допомогою фагів) та кон'югацією (перенесення плазмід між бактеріальними клітинами). Найбільш ефективним методом створення мутантів виявилось перенесення транспозонів за допомогою кон'югації [29].

Транспозоновий мутагенез – це метод індукування за допомогою транспозонів інерційних мутацій у випадкових ділянках ДНК-мішеней. Транспозони – це фрагменти ДНК, які здатні переміщуватися між молекулами ДНК або в середині однієї молекули. Транспозони здатні переносити фрагменти генетичного матеріалу та викликати різноманітні мутації в тому числі інверсії та делеції. Крім того вони проявляють здатність активувати або інгібувати експресію сусідніх генів завдяки наявним промоторам і термінаторам транскрипції.

Перевагами застосування транспозонового мутагенезу є можливість отримання поодиноких та нерeverсивних мутацій, що полегшує подальше вивчення отриманих мутантів. Крім того, при вбудовуванні транспозону у ген-мішень, клітина набуває стійкості до антибіотику, що дозволяє легко відділити селекцію не зумовлену транспозоном.

Для проведення транспозонового мутагенезу використовують R-плазмідні з широким колом господарів та не здатні реплікуватися у клітинах ризобіїв. Саме перенесення відбувається так званими векторами-«самогубцями», які після перенесення фрагменту у клітину-реципієнта втрачають свою життєздатність та елімінуються [29].

Ще однією перевагою застосування транспозонової мутації є можливість маркування генів симбіотичної дії, які є неактивними у чистій культурі. Це

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						32
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

дозволяє виділяти специфічні ділянки плазмід, що відповідають за процеси ефективної азотфіксації та вже спрямовано індукувати їх у геном інших бульбочкових бактерій. Такий підхід до отримання сільськогосподарських штамів ризобії може значно перевищити ефективність спрямованого мутагенезу та гібридизації.

Найчастіше за цього методу трансформації в якості векторів використовуються клітини *E. coli* S17-1 з плазмідами pSUP, що містять у своєму складі транспозон Tn5 [27, 28, 30].

Переважно для підготовки промислового штаму *Rh. leguminosarum* використовується поєднання мутагенезу (спрямованого або гібридизації) а також штучного добору.

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Для підготовки промислових штамів використовуються методи селекції. Селективний відбір проводиться у лабораторних та польових умовах. Всі досліді проводяться не менше ніж у чотирьох повторностях.



Рисунок 3.9 Схема отримання промислового продуцента

Rhizobium leguminosarum

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

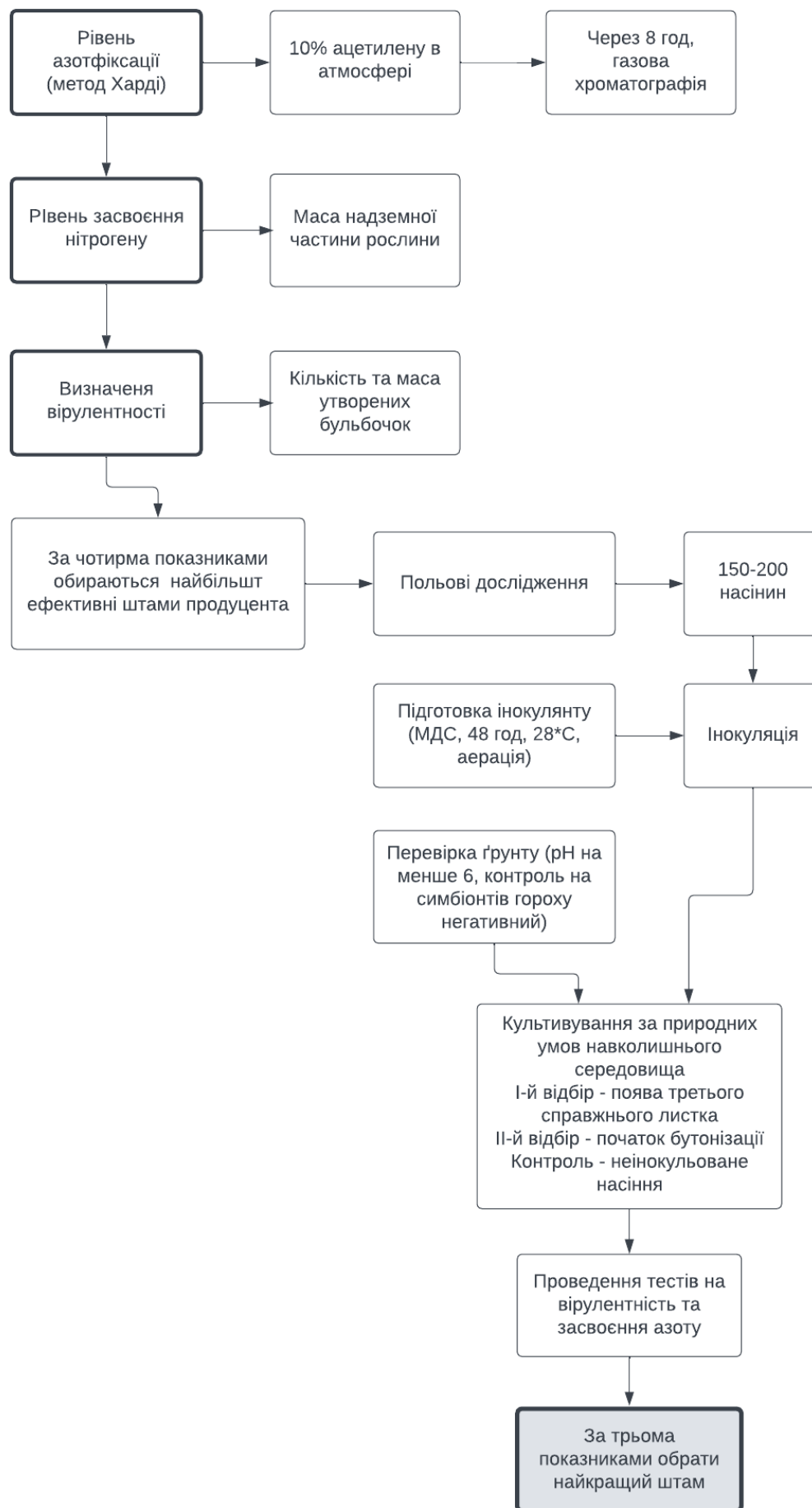


Рисунок 3.9 Аркуш 2

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9201 00.000.00

Арк.

34

При культивуванні рослин у лабораторних умовах, для отримання більш достовірних даних про здатність мікроорганізму до азотфіксації та здатність рослини до засвоєння азоту в якості джерела нітрогену, що вноситься у ґрунт використовують суміш Гельригеля, в якій міститься 0.25 норми внесення нітрогену для повноцінного розвитку рослин.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						35
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Кінцевим продуктом виробництва є інокулянт для передпосівної обробки насіння гороху.

Назва: інокулянт для насіння

Нормативно-технічний документ на продукцію: якість інокулянту регламентується внутрішніми технічними вимогами підприємства

Призначення: інокулянт використовується для передпосівної обробки насіння гороху та інших бобових, таких як сочевиця, чина, боби та ін.. Препарат призначений для покращення азотного живлення бобових рослин. Завдяки високому вмісту у препарати симбіотичних азатфіксуючих організмів підвищується продуктивність бобових культур та кількість білків у них. Пришвидшується ріст та розвиток рослини, пагони та коніння збагачуються нітрогеном, збільшується надземна маса рослини.

Діяча речовина: клітини *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* у кількості не менше $1 \cdot 10^9$ КУО/мл

Опис: препарат являє собою непрозору рідину молочно-бежевого кольору, без різкого запаху

Упаковка: препарат фасується по одному літру у тару, виготовлену з поліетилену високого тиску відповідно до ГОСТ 16337-77 [31].

Кожна одиниця товару має бути маркована відповідною етикеткою, на якій має міститися:

- назва продукту та титр клітин;
- назва та повна адреса і телефон виробника, адреса потужностей виробництва;
- об'єм;
- кінцеву дату споживання «Вжити до» або дату виробництва та строк

					<i>ДП БТ-9201 00.000.00</i>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4 ТЕХННОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розроб		Белінська					
Конс.							
Кервн.		Полішук В.Ю.					
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						36	76
					КПІ ім.. Ігоря Сікорського ФБТ		

придатності;

— умови зберігання.

Умови зберігання: препарат повинен зберігатися в оригінальній упаковці при температур $+5 - +18^{\circ}\text{C}$.

Термін зберігання: 6 місяців

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

Таблиця 4.1 Сировина, матеріали та напівпродукти виробництва

Найменування	Категорія і номер НТ, 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.Маніт	ГОСТ 8321-74	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища
1.2 Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища
1.3 Дріжджовий екст.	Сертифікат якості виробника	Вміст загального азоту(не менше 10%); Вміст амінного (не менше 4%) азоту	Для приготування поживного середовища
1.4 Амоній сульфат	ДСТУ ISO 2992:2008 Амонію сульфат технічний	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища
1.5 Калій фосфат однозаміщений	ГОСТ 4198-75	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища
1.6 Калій фосфат двозаміщений	ГОСТ 2493-75	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища
1.7 Сульфат магнію	ГОСТ 4523-77	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища
1.8 Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Мікробіологічна чистота Загальна жорсткість (1,5-7 ммоль/дм ³) рН(6,7-7,0)	Для приготування поживного середовища, робочих розчинів, забезпечення теплообміну

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Продовження таблиці 4.1

2.Допоміжна сировина:			
2.1. Соляна кислота	ДСТУ 2904-94 (ГОСТ 857-95)	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища, підготовки обладнання та знешкодження відходів
2.2. Гідроксид натрію	ДСТУ ISO 979-2001	Істиність реактиву	Для приготування поживного середовища, підготовки обладнання та знешкодження відходів
2.3. Агар-агар	ГОСТ 16280-2002	Не підлягає контролю	Для приготування агаризованого середовища на етапі підготовки посівного матеріалу
2.4. Вода стерильна	ДСТУ ISO 3696:2003	Мікробіологічна чистота (контаміанти відсутні)	Для контролю якості продукту
2.5. Лимона кислота	ДСТУ ГОСТ 908:2006	Не підлягає контролю	Для підготовки посуду
2.6. Перекис водню	ГОСТ 177-88	Не підлягає контролю	Для підготовки посуду
2.7. Хлорамін	ГОСТ 14193-78	Не підлягає контролю	Дезінфікуючий агент
2.8. Мийні засоби	Сертифікат якості виробника	Не підлягають контролю	Для забезпечення чистоти приміщень, обладнання та посуду
3.Матеріали			
3.1. Тара	Сертифікат якості виробника	Цілісність та справність кришок	Для етапу пакування та маркування
3.2. Фільтрувальні матеріали	Сертифікат якості виробника	Не підлягає контролю	Для етапів водо та повітряпідготовки, а також знешкодження відходів
3.3. Етикетка	Сертифікат якості виробника	Відсутність браку	Для маркування продукції
3.4. Коробки	ДСТУ 8401:2015	Не підлягає контролю	Для пакування
4. Напівпродукти			
4.1. Культуральна рідина	Внутрішні ТУ	Титр (не менше 10^8 КУО/мл), мікробіологічна чистота (стороння мікрофлора < 3%)	Готовий продукт

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9201 00.000.00

Арк.

38

Продовження таблиці 4.2			
4.2. Препарат у тарі	Внутрішні ТУ	Якість запайки Відповідність етикетки	Готовий продукт

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1 Санітарно-гігієнічна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

Підготовка персоналу заключається в першу чергу у навчаннях з техніки безпеки життєдіяльності, індивідуального захисту та підтримки санітарно-гігієнічного стану виробництва. Всі співробітники мають прослухати відповідні лекції та пройти навчання з техніки пожежної безпеки. Також працівники (за необхідності) забезпечуються засобами індивідуального захисту – масками, рукавичками і тд.

Персонал що працює з обладнанням під тиском та іншими апаратами, що потребують спеціальних знань та умінь, повинні пройти відповідне навчання та отримати дозвіл на експлуатацію відповідних апаратів (відповідно до статті 21 Закону України «Про охорону праці» [46]).

Для персоналу, що працює у виробничих приміщеннях готується змінні одяг та взуття, для підтримки чистоти на виробництві. Крім того, для персоналу що працює на лабораторних та напівлабораторних ділянках виробництва готується спеціальний стерильний одяг, для зменшення ризику контамінації посівного матеріалу.

ДР 1.2 Підготовка робочих розчинів

Для підготовки приміщень, обладнання та посуду готуються розчини майних та дезінфікуючих засобів. Для миття використовують комерційні засоби на основі гіпохлориду натрію, аніонних ПАР та мила. Мийні розчини готуються у реакторі-змішувачі Р-8. Необхідна кількість води та миючого засобу (відповідно до інструкції виробника) подаються у реактор за допомогою об'ємно-вагових дозаторів Д-7 та Д-9. Для миття обладнання та посуду також можуть застосовуватися розчини кислоти. Для виведення стійких забруднень, а

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

також для контролю рівня рН у виробничих процесах, які цього потребують, використовують слабкий розчин соляної кислоти, яка накуповується уже готовими розчинами. Також для виведення забруднень зі скляного посуду (колб, пробірок і тд) готують розчини лимонної кислоти. Оскільки потреби виробництва у цих розчинах незначі, спеціальне обладнання для їх приготування не застосовується.

Основним дезінфікуючим агентом виступає хлорамін, у концентрації 5%. Розчин готується з сухого порошку хлораміну та питної води (подаються дозаторами Д-4 і Д-6 відповідно) у реакторі змішувачі Р-5.

Для коригування рівня рН у поживному середовищі та на інших технологічних етапах готується також 40% розчин гідроксиду натрію. Приготування відбувається у реакторі-змішувачі Р-2. Для розчинення гранул гідроксиду натрію (подається у реактор за допомогою вагового дозатора Д-1) використовують виключно холодну воду (за допомогою об'ємного дозатора Д-3), оскільки реакція розчинення лугу є екзотермічною.

ДР 1.3 Підготовка приміщень

Для зниження ризику контамінації та підтримки чистоти на виробництві здійснюються щоденні та генеральні прибирання. Стіни, підлога та поверхні обладнання та комунікацій, що контактують з поживним середовищем або культуральною рідиною протирають дезінфікуючим розчином.

Усе повітря що поступає на виробничі приміщення проходить через фільтри, вбудовані у вентиляцію, які очищують повітря від механічних забруднювачів.

Як додаткова міра для уникнення контамінації у виробничих приміщеннях, в яких відбуваються процеси культивування використовують кварцеві (бактерицидні) лампи.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1 Мийка обладнання

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						40
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Підготовка обладнання починається з його миття. Обладнання ополіскується мийним розчином та теплою водою (40-50°C) протягом 30хв. За необхідності для миття використовуються розчини кислоти.

ДР 1.4.2 Ополіскування

Залишки миючих засобів змиваються гарячою водою ($T=80^{\circ}\text{C}$) протягом 10 хвилин.

ДР 1.4.3 Дезінфекція

Для дезінфекції, обладнання витримують у 5% розчині хлораміну при температурі 40-50%.

ДР 1.4.4 Ополіскування

Залишки дезінфікуючих розчинів змиваються гарячою водою ($T=80^{\circ}\text{C}$) протягом 10 хвилин.

ДР 1.4.5 Стерилізація

Основним методом стерилізації є термічна обробка. Обладнання стерилізується гострою парою ($p=0,2\text{МПа}$) з температурою 140°C протягом 1 години. Перед використанням, обладнання охолоджується (витримування за кімнатної температури протягом 3,5-4 годин).

ДР 2 Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1 Попередня очистка

Для аерації використовується підготоване атмосферне повітря. Повітря забирається через спеціальні шахти, заввишки 8-10 м (ПЗ-10), що розташовані у найменш забруднених ділянках виробництва. Воно одразу подається на фільтри Рекка (Ф-11), які звільняють повітря від очищують повітря від забруднюючих частинок великого розміру та аерозольних часток (коефіцієнт

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

очищення становить близько 10%). В якості фільтрувального матеріалу використовуються набивні волокнисті матеріали.

ДР 2.2 Стиснення та охолодження

Після попередньої очистки повітря надходить на турбокомпресор К-12, за допомогою якого стискається до тиску не менше 0,2 МПа після чого надходить на теплообмінник Т-14, де охолоджується. Зі зниженням температури волога з повітря конденсується у вигляді мікрокрапель.

ДР 2.3 Відділення конденсату

Охолоджене повітря подається на ресивер Р-14, у якому відбувається уловлення крапель рідини з повітря. Завдяки багаторазовій зміні напрямку руху повітря та його швидкості мікрокраплі зливаються між собою і утворений конденсат виводиться з апарата.

ДР 2.4 Нагрівання повітря

Звільнене від вологи повітря знову нагрівають до температури, близької до температури ферментації (25-28°C).

ДР 2.5 Фінальна очистка

Нагріте повітря проходить через систему фільтрів, що забезпечують чистоту та стерильність повітря. Спочатку повітря очищується на головному набивному фільтрі Ф-15, після чого подається на індивідуальний фільтр Ф-16. Для підвищення якості очистки повітря перед інокулятором та ферментом також встановлені індивідуальні фільтри Ф-21 та Ф-23 [47].

ДР 3 Підготовка води

Основними параметрами, що контролюються у питній воді є її рН, жорсткість та кількість мікроорганізмів, наявних у одиниці об'єму води. Наразі основним методом очищення води на виробництвах різні системи мембранної

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

очистки, які являють собою каскад автоматичних фільтрів. Після очищення води на таких системах вона має наступні показники: рН = 6,7 – 7,0; середній рівень жорсткості 3,8-4,0 мг/екв-л.

ДР 3.1 Очищення від механічних включень

Першим етапом водопідготовки є фільтри тонкого очищення Ф-32, в яких використовують фільтр-масу полідисперсного кварцевого піску. Вода на них подається за допомогою насоса Н-31. На даному етапі вода проходить через фільтрувальний матеріал з порогом затримки 0,2 - 100 мкм і очищується від дрібного піску, глини, домішок та інших завислих механічних забруднень.

ДР 3.2 Сорбційне фільтрування

Для відділення неприємних запахів та звільнення води від продуктів хлорування вода направляється на вугільний фільтр Ф-33. Окрім того, що вугільний фільтр має дехлоруючу дію, він також затримує і органічні забрудники.

ДР 3.3 Пом'якшення

Одними з вагомих забруднювачів є катіони кальцію та магнію, що обумовлюють жорсткість води. Для їх видалення використовуються пом'якшуючі фільтри Ф-34, де в якості фільтруючого матеріалу використовуються катіонобмінні смоли [47].

ДР 4 Підготовка поживного середовища

Для культивування ризобії гороху використовується манірно-дріжджове середовище склад якого наведено в таблиці 4.2.

Склад агаризованого та рідкого середовища ідентичний.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 4.2 Склад поживного середовища

Назва компоненту	Концентрація, г/л
Маніт	8
Глюкоза	2
Дріжджовий екстракт	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5
KH_2PO_4	0,35
K_2HPO_4	0,35
MgSO_4	0,2

ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища

ДР 4.1.1 Змішування компонентів поживного середовища

Для лабораторних етапів напрацювання посівного матеріалу готується щільне поживне середовище, за складом аналогічне до рідкого, в якому відбуваються всі ферментаційні процеси. Для загущення середовища додається агар-агар в розрахунку 20 г/л. рН доводиться до рівня 7,2-7,4. Оскільки кількість агаризованого середовища, що необхідна для виробництва незначна, для його приготування не потрібні спеціальні апарати або обладнання.

ДР 4.1.2 Стерилізація середовища

Пробірки з середовищем стерилізуються у автоклаві Р-26 при $p = 0,75$ атм та температурі 110°C протягом 30 хвилин. Після стерилізації пробірки викладаються на похилу поверхню з кутом близько 15° для формування скошеної поверхні. Після застигання середовища пробірки витримуються 2-3 доби за кімнатної температури для сходження конденсату.

ДР 4.2 Підготовка рідкого середовища

ДР 4.2.1 Змішування компонентів середовища

Рідке середовище готується для заповнення інокулятора/ферментера, а також у колбах, для підготовки посівного матеріалу. Змішування компонентів

					ДП БТ-9201 00.000.00	А
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

поживного середовища відбувається у реакторі-змішувачі Р-25 у пропорціях, наведених у таблиці 4.2. Для приготування середовища використовують питну воду, підготовану на етапі ДР3 та для коригування рН додають розчин лугу, приготований на етапі ДР 1.2 (рН доводиться до рівня 7,2 – 7,4).

ДР 4.2.2 Стерилізація рідкого середовища

Рідке середовище в колбах, подібно до середовища у пробірках стерилізується у автоклаві. Все інше середовище стерилізується безпосередньо в реакторі змішувачі гострою парою, після чого охолоджується і передається на етапи ДР 5.3 та ТП.

Режим стерилізації – 0,75 атм (110°C), 40 хв.

ДР 5 Підготовка посівного матеріалу

ДР 5.1 Відновлення музейної культури на пробірках з щільним ПС

Напрацювання посівного матеріалу починається на пробірках П-17 з щільним середовищем. Метою цього етапу є відновлення та активізація музейної культури.

Засіяні пробірки витримуються у термостаті протягом 7 діб при температурі 28°C.

ДР 5.2 Напрацювання ПМ в колбах

Наступним етапом напрацювання посівного матеріалу є його розмноження у колбах К-18. У одну колбу переноситься посівний матеріал з однієї пробірки. Культивування відбувається у термостаті з шейкером, який забезпечує перемішування культуральної рідини в колбах. Тривалість культивування – 3 доби, температура підтримується на рівні 28°C.

ДР 5.3 Напрацювання ПМ в інокуляторі

Для напрацювання посівного матеріалу в інокуляторі до стерильного поживного середовища вноситься інокулянт, в кількості 10% від об'єму

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						45
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

середовища. Культивування відбувається у інокуляторі Р-20. Забезпечується перемішування та аерація культуральної рідини. рН підтримується на рівні 6,8-7,0. Культивування відбувається протягом 3 діб за температури 28°C.

ТП 6 Виробниче культивування

Основний етап культивування відбувається у ферментері Р-22, за умов, аналогічних до культивування в інокуляторі: перемішування, аерація, рН = 6,8 – 7,0, t = 28°C. Трималість культивування – 72 години.

Після закінчення культивування, культуральна рідина передається на пакування

ПМВ 7 Пакування та маркування

Готовий препарат являє собою культуральну рідину, з титром не менше $1 \cdot 10^9$ клітин/мл. Препарат розливається у тару на пакувально-фасувальних апаратах ФП-27 та ФП-28 по 1 літру, з коефіцієнтом заповнення 95%.

ЗВ 8 Знешкодження відходів

Основним типом відходів виробництва є рідкі відходи. Некондиційний посівний матеріал чи некондиційна культуральна рідина збираються у збірнику Р-29, піддається термічній обробці гострою парою при температурі більше 120°C протягом 45-60 хвилин, з подальшим охолодженням, розбавленням водою та доведенням рН середовища до рівня 7,0 соляною кислотою або розчином гідроксиду натрію та зливом в загальну каналізаційну систему.

Промивні дезінфікуючі розчини, залишки розчинів після санітарної обробки виробництва та відпрацьовану воду направляють до збірник нейтралізації стічних вод Р-30, де розводять водою до рН на рівні 7,0 за допомогою соляної кислоти або розчину гідроксиду натрію та зливають в загальну систему каналізації. В цей же збірник зливають промивні води після мийки виробничого ферментера та інокулятора.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						46
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відпрацьоване повітря знешкоджується пропусканням через стерилізуючий фільтр та випускається в атмосферу.

ПВ 9 Переробка відходів

Конденсат, що утворюється на різних етапах виробництва повертається у систему водо забезпечення виробництва, знову очищується на системі фільтрації та може бути використаний повторно.

Відпрацьована пара, що утворюється під час процесів стерилізації переходить у вентиляцію, де перетворюється на конденсат. Конденсат з вентиляції затримується волого уловлювачами та піддається повторному очищенню.

Тверді відходи виробництва, такі як слобит, використані засоби індивідуального захисту та інші збираються окремо та відправляються на переробку.

Фільтрувальні матеріали, що придатні до повторного використання відновлюються та повертаються у виробництво.

4.4 Матеріальний баланс

Матеріальний баланс розраховується на одну партію готового продукту. Готовим продуктом є суспензія мікроорганізмів, тому доцільно розраховувати партію безпосередньо для одиниці об'єму культуральної рідини.

Оскільки культивування відбувається у ферментерах об'ємом 1,5 м³, то одна парті культуральної рідини буде складати дві третини робочого об'єму ферментера, тобто 1000 літрів.

Необхідна кількість посівного матеріалу для інокуляції ферментера при нормі внесення 5% складає 50 літрів. Необхідна кількість посівного матеріалу для внесення в інокулятор при нормі витрати в 10% складає 5 літрів.

Загальна потреба в поживному середовищі – 5 л (колби) + 45 л (інокулятор) + 950л (ферментер) – 1000 л.

Матеріальний баланс виробництва наведено у таблиці 4.3

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

Таблиця 4.3 Матеріальний баланс виробничої серії

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напівпродукту	Кількість		
		г	шт	л			кг	шт	л
Підготовка агаризованого ПС	Маніт	8			Підготовка агаризованого ПС	Агаризоване середовище у пробірках		50	
	Глюкоза	2							
	Дріжджовий ек.	2							
	(NH4)SO4	0,5							
	K2HPO4	0,35							
	KH2PO4	0,35							
	MgSO4	0,2							
	Вода питна			1					
	Агар-агар	20							
	Пробірки		50						
Всього		50 пробірок по 20мл = 1л			Всього		50 пробірок по 20мл		
Стадія	Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напівпродукту	Кількість		
		г	шт	л			кг	шт	л
Підготовка рідкого середовища у колбах	Маніт	48			Підготовка агаризованого ПС	Рідке середовище в колбах		12	
	Глюкоза	12							
	Дріжджовий ек.	12							
	(NH4)SO4	3							
	K2HPO4	2,1							
	KH2PO4	2,1							
	MgSO4	1,2							

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9201 00.000.00

Арк.

48

Продовження таблиці 4.3

	Вода питна			6					
	Колби		12						
Всього		12 колб по 500мл = 6л			Всього		12 колб по 500мл		
		кг	шт	л			кг	шт	л
Підготовка рідкого середовища до ДР5.3 та ТП6	Маніт	8			Підготовка рідкого середовища до ДР5.3 та ТП6	Рідке ПС для культивування			1000л
	Глюкоза	2							
	Дріжджовий ек.	2							
	(NH4)SO4	0,5							
	K2HPO4	0,35							
	KH2PO4	0,35							
	MgSO4	0,2							
	Вода питна			1000					
Всього		1000л+соли			Всього		1000л		
Підготовка посівного матеріалу	Музейна культура		1		Підготовка посівного матеріалу	Посівний матеріал			50л
	Пробірки з середовищем		12						
	Колби з середовищем		15	7,5					
	Відбраковані колби		3	1,5					
	Інокулятор з середовищем			45					
	Втрати при перекачуванні			1					
Всього		45+7,5-1-1,5 = = 50л ПМ			Всього		50л ПМ		
Виробниче культивування	Посівний матеріал			50	Виробниче культивування	Культуральна рідина			1000л
	Поживне середовище у ерментері			950					
Всього		1000л культ. Рід			Всього		1000л культ. Рід		

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

Продовження таблиці 4.3									
Розлив по тарі	Культуральна рідина			1000	Виробниче культивування	Культуральна рідина		980	
	Пляшки		980						
	Кришки		980						
	Втрати при розливі			20					
Всього		Готовий препарат у тарі -980шт + втрати			Всього		Готовий препарат у тарі -980шт		

4.5 Контроль виробництва

Таблиця 4.4 Методи контролю виробництва

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю, та показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Норматична характеристика показника
ДР1.2 Підготовка робочих розчинів Кх1.2.1	Розчин NaOH, кількість NaOH	Ваги, міний посуд, візуально	Кожну операцію	40%
ДР1.2 Підготовка робочих розчинів Кх1.2.2	Розчин хлораміну, кількість хлораміну	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	5%
ДР1.3 Підготовка приміщень Кмб13.1	Повітря, мікробіологічна чистота	Чашки з різними ПС, термостат, візуально	Раз на 2 тижні	Кількість клітин не більше ніж 10 КУО/м ³
ДР1.3 Підготовка приміщень Кмб13.2	Поверхня обладнання, мікробіологічна чистота	Чашки з різними ПС, термостат, візуально	Раз на два тижні	Кількість клітин не більше ніж 100 КУО/м ²
ДР1.4.1 Мийка обладнання Кт 1.4.1.1	Час, тривалість обробки	Годинник	Кожну операцію	30 хв

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						50
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Продовження таблиці 4.4

ДР1.4.1 Мийка обладнання Кт 1.4.1.2	Миючий розчин, температура	Термопара	Кожну операцію	35-40°C
ДР1.4.1 Мийка обладнання Кх 1.4.1.3	Обладнання, чистота	Візуально	Кожну операцію	Відсутність забруднень
ДР1.4.2 Ополіскуванн я Кх 1.4.2.1	Час, тривалість обробки	Годинник	Кожну операцію	10 хв
ДР1.4.2 Ополіскуванн я Кх 1.4.2.2	Ополіскуюча вода, температура	Термопара	Кожну операцію	80°C
ДР1.4.3 Дезінфекція Кт 1.4.3.1	Час, тривалість обробки	Годинник	Кожну операцію	30 хв
ДР1.4.3 Дезінфекція Кт 1.4.3.2	Дезінфікуючий розчин, температура	Термопара	Кожну операцію	40-50°C
ДР1.4.3 Дезінфекція Кмб 1.4.3.3	Обладнання, мікробіол. чистота	Одноразові індикатори, візуально	Кожну операцію	Контамінуючі компоненти відсутні
ДР1.4.4 Ополіскуванн я Кх 1.4.4.1	Час, тривалість обробки	Годинник	Кожну операцію	10 хв
ДР1.4.4 Ополіскуванн я Кх 1.4.4.2	Ополіскуюча вода, температура	Термопара	Кожну операцію	80°C
ДР 1.4.5 Стерилізація Кт 1.4.5.1	Час, тривалість обробки	Годинник	Кожну операцію	1 год
ДР 1.4.5 Стерилізація Кт 1.4.5.2	Стерилізуюча пара, тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2Мпа
ДР 1.4.5 Стерилізація Кт 1.4.5.3	Стерилізуюча пара, температура	Термопара	Кожну операцію	140°C

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

Продовження таблиці 4.4

ДР 1.4.5 Стерилізація Кт 1.4.5.4	Обладнання, якість стерилізації	Одноразові індикатори, візуально	Кожну операцію	Будь-які мікроорганізми відсутні
ДР 2.1 Попередня очистка Кт 2.1.1	Повітря, механічні забруднювачі	Візуально	Раз на тиждень	Механічні забруднювач відсутні
ДР 2.2 Стиснення і охолодження Кт 2.2.1	Повітря, тиск	Манометр	Весь час роботи обладнання	0,2Мпа
ДР 2.2 Стиснення і охолодження Кт 2.2.2	Повітря, температура	Термопара	Весь час роботи обладнання	10-15°C
ДР 2.3 Відділення конденсату Кт 2.3.1	Повітря, вологість	Гігрометр	Раз на 2 тижні	Не більше 10%
ДР 2.3 Відділення конденсату Кмб 2.3.2	Повітря, мікробіологічн а чистота	Чашки з ПС, візуально	Раз на 3 дні (перед початком виробничої серії)	Мікроорганізм и відсутні
ДР 2.4 Нагрівання повітря Кт 2.4.1	Повітря, температура	Термопара	Весь час роботи обладнання	28°C
ДР 2.5 Фінальна очистка Кт 2.5.1	Повітря, якість очищення	Одноразові індикатори	Раз на 3 дні (перед початком виробничої серії)	Всі забруднювачі відсутні
ДР 3 Підготовка води Кх 3.1	Підготована вода, рН	рН-метр	Раз на 2 тижні	6,7-7,0
ДР 3 Підготовка води Кх 3.2	Підготована вода, жорсткість	Хімічний посуд, реактиви	Раз на 2 тижні	1,5-7 ммоль/дм ³

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9201 00.000.00

Арк.

52

Продовження таблиці 4.4

ДР 3 Підготовка води Кмб 3.3	Підготована вода, мікробіологічн а чистота	Чашки з ПС, візуально	Раз на 3 дні (перед початком виробничої серії)	Не більше ніж 100 КУО/мл
ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища Кх 4.1.1	Поживне середовище, вміст компонентів	Ваги, міний посуд, візуально	Кожну операцію	Відповідно до таблиці 4.2
ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища Кх 4.1.2	Поживне середовище, рН	рН-метр	Кожну операцію	7,2-7,4
ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища Кт 4.1.3	Режим стерилізації, температура	Термопара	Кожну операцію	110°C
ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища Кт 4.1.4	Режим стерилізації, тиск	Манометр	Кожну операцію	0,075МПа
ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища Кт 4.1.5	Режим стерилізації, час	Годинник	Кожну операцію	30хв
ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища Кмб 4.1.6	Стерильне середовище, якість стерилізації	Візуально	Кожну операцію	Відсутність росту на середовищі
ДР 4.2 Підготовка рідкого середовища Кх 4.2.1	Поживне середовище, вміст компонентів	Ваги, міний посуд, візуально	Кожну операцію	Відповідно до таблиці 4.2

Продовження таблиці 4.4

ДР 4.2 Підготовка рідкого середовища Кх 4.2.2	Поживне середовище, рН	рН-метр	Кожну операцію	7,2-7,4
ДР 4.2 Підготовка рідкого середовища Кт 4.2.3	Режим стерилізації, температура	Термопара	Кожну операцію	110°C
ДР 4.2 Підготовка рідкого середовища Кт 4.2.4	Режим стерилізації, тиск	Манометр	Кожну операцію	0,075МПа
ДР 4.2 Підготовка рідкого середовища Кт 4.2.5	Режим стерилізації, час	Годинник	Кожну операцію	40хв
ДР 4.1 Підготовка агаризованого середовища Кмб 4.2.6	Стерильне середовище, якість стерилізації	Візуально	Кожну операцію	Відсутність росту на середовищі
ДР 5.1 Відновлення музейної культури на побірках з щільним ПС Кт 5.1.1	Режим культивування, температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
ДР 5.1 Відновлення музейної культури на побірках з щільним ПС Кт 5.1.2	Режим культивування, тривалість	Годинник	Кожну операцію	7 діб

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9201 00.000.00

Арк.

54

Продовження таблиці 4.4

ДР 5.1 Відновлення музейної культури на побірках з щільним ПС Кмб 5.1.3	Нарощена культура, мікробіол. чистота	Мікроскоп	Кожну операцію	Контаміанти відсутні
ДР 5.2 Напрацюванн я ПМ в колбах Кт 5.2.1	Режим культивування, температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
ДР 5.2 Напрацюванн я ПМ в колбах Кт 5.2.2	Режим культивування, тривалість	Годинник	Кожну операцію	72 год
ДР 5.2 Напрацюванн я ПМ в колбах Кт 5.2.3	Режим культивування, перемішування	За показникам и приладів	Кожну операцію	200 об/хв
ДР 5.2 Напрацюванн я ПМ в колбах Кмб 5.2.4	Нарощена культура, мікробіол. чистота	Мікроскоп	Кожну операцію	Контаміанти відсутні
ДР 5.2 Напрацюванн я ПМ в колбах Кмб 5.2.5	Нарощена культура, титр	Спектро- фотометр, чашки з ПС	Кожну операцію	Не менше ніж 10 ⁹ КУО/мл
ДР 5.3 Напрацюванн я ПМ в інкуляторі Кт 5.3.1	Режим культивування, температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
ДР 5.3 Напрацюванн я ПМ в інокуляторі Кт 5.3.2	Режим культивування, тривалість	Годинник	Кожну операцію	72 год

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9201 00.000.00

Арк.

55

Продовження таблиці 4.4

ДР 5.3 Напрацювання ПМ в інокуляторі Кт 5.3.3	Режим культивування, перемішування	За показникам и приладів	Кожну операцію	200 об/хв
ДР 5.3 Напрацювання ПМ в інокуляторі Кт 5.3.4	Режим культивування, аерація	За показникам и приладів	Кожну операцію	1 м ³ повітря на м ³ середовища
ДР 5.3 Напрацювання ПМ в інокуляторі Кмб 5.3.5	Нарощена культура, мікробіологічна чистота	Мікроскоп	Кожну операцію	Контаміанти відсутні
ДР 5.3 Напрацювання ПМ в інокуляторі Кмб 5.3.6	Нарощена культура, титр	Спектро-фотометр, чашки з ПС	Кожну операцію	Не менше ніж 10 ⁹ КУО/мл
ТП 6 Виробниче культивування Кт 6.1	Режим культивування, температура	Термометр	Кожну операцію	28°C
ТП 6 Виробниче культивування Кт 6.2	Режим культивування, тривалість	Годинник	Кожну операцію	72 год
ТП 6 Виробниче культивування Кт 6.3	Режим культивування, перемішування	За показникам и приладів	Кожну операцію	200 об/хв
ТП 6 Виробниче культивування Кт 6.4	Режим культивування, аерація	За показникам и приладів	Кожну операцію	1 м ³ повітря на м ³ середовища

Продовження таблиці 4.4

ТП 6 Виробниче культивуванн я Кмб 6.5	Нарощена культура, мікробіол. чистота	Мікроскоп	Кожну операцію	Контаміанти відсутні
ТП 6 Виробниче культивуванн я Кмб 6.6	Нарощена культура, титр	Спектро- фотометр, чашки з ПС	Кожну операцію	Не менше ніж 10 ⁹ КУО/мл
ПМВ 7 Пакування та маркування Кт 7.1	Готовий препарат, об'єм	Ваги, мірне обладнання	Кожну операцію	1 л
ЗВ 8 Знешкодженн я відходів Кт 8.1	Режим знешкодження, тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2Мпа
ЗВ 8 Знешкодженн я відходів Кт 8.2	Режим знешкодження, температура	Термопара	Кожну операцію	140°C
ЗВ 8 Знешкодженн я відходів Кх 8.3	Рідкі відходи, рН	рН-метр	Кожну операцію	7,0

РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Основним завданням етапу підготовки посівного матеріалу є напрацювання біомаси цільового мікроорганізму. Для забезпечення росту та розвитку клітин необхідно створити оптимальні для росту та розвитку клітин умови: рН, температура, перемішування та аерація.

Типовим обладнанням, яке застосовується для культивування мікроорганізмів та здатне забезпечити відповідні умови є ферментер з комбінованим відведенням енергії, обладнаний сорочкою та керуючим пристроєм. Схематичну будову інокулятора наведено на рисунку 5.10.

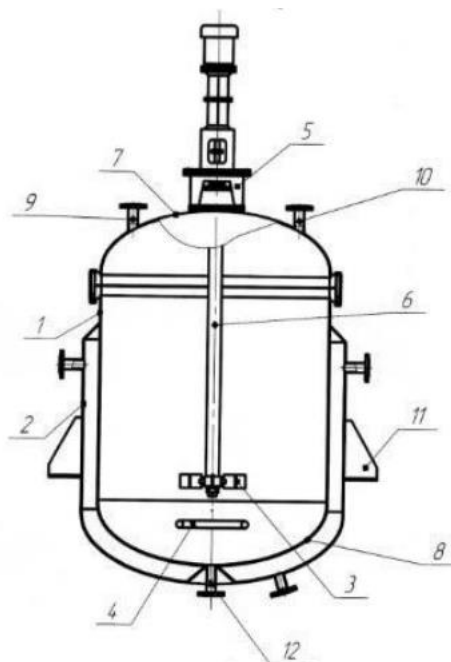


Рисунок 5.10. Будова інокулятора

1 – корпус; 2 – сорочка; 3 – перемішувачий пристрій; 4 – барботер; 5 – привод мішалки; 6 – вал мішалки; 7 -кришка; 8 – еліптичне днище; 9, 10 – штуцери; 11 – опора; 12 – штуцер для зливу культуральної рідини

					<i>ДП БТ-9201 00.000.00</i>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5 ТОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ		
Розроб		Белінська					
Конс.		Шибєцький В.Ю.					
Кервн.		Полішук В.Ю.					
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						58	76
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Основними перевагами даних апаратів є простота та надійність конструкції, простота керування, а також герметичність, що дозволяє забезпечити герметичність. Для забезпечення культуральної рідини киснем у ферментерах можуть використовуватися різні керуючі прилади: дифузори, форсунки та інші, проте найбільшого розповсюдження набули барботери, тому перевага у конструкції віддається саме їм. Безпосередньо у ферментері також може проводитися стерилізація поживного середовища. Оскільки його об'єм невеликий, використання установки безперервної стерилізації є недоцільним.

Апарат виготовляється зі сталі марки 12X18H10T. Оскільки ферментер буде застосовуватися для нетоксичних і не вибухонебезпечних середовищ, його виготовляють з сальниковим ущільненням, що працює при атмосферному тиску та з торцевим ущільненням типу ТДМ.

Основною перевагою барботера є можливість регулювання ступеню подрібнення повітря та отримання максимального ступеню диспергування повітря. Недоліком, в свою чергу є поступове збільшення поверхні контакту фаз, в наслідок збільшення розмірів бульбашок повітря, і як наслідок необхідно збільшувати витрату повітря.

Оскільки кисень є погано розчинним газом, для покращення його сорбції необхідно забезпечити інтенсивне перемішування культуральної рідини. Крім того, перемішування необхідне для рівномірного розподілу компонентів поживного середовища та біомаси по всій товщі культуральної рідини. Перемішування, що забезпечується барботером в такому разі є недостатнім тому необхідне встановлення мішалки [52].

Оптимальна конструкція і параметри роботи перемішуючого пристрою обираються виходячи з характеристик середовища, що перемішується. Крім того, вагомим фактором, що впливає на вибір перемішуючого пристрою є простота конструкції, надійність та довгий час роботи. Поживне середовище, за рахунок невисокого вмісту компонентів, та культуральна рідина (оскільки ризобії в процесі життєдіяльності не утворюють сполук, що впливають на

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						59
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

в'язкість середовища) відносяться до малов'язких рідин, для перемішування яких переважно використовують швидкісні мішалки (турбінні або винтові).

Для кожного типу мішалок є перелік процесів, для яких дана конструкція підходить найбільше. Основним процесом, що має забезпечити мішалка є перемішування газо-рідинної системи. Для забезпечення якісного розчинення кисню у воді необхідна висока швидкість (інтенсивність) перемішування, а також циркуляція потоків рідини. Необхідна швидкість перемішування – 200 об/хв. ($3-3,33 \text{ с}^{-1}$). Для таких процесів переважно застосовують саме турбінні мішалки (рис 5.11) оскільки вони найбільше підходять для диспергування газів у рідині.

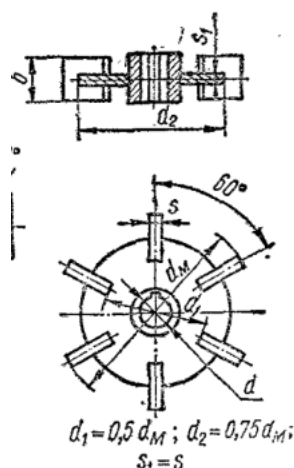


Рисунок 5.11 Турбінна мішалка

Однією з важливих вимог до ферментера є збереження асептичності культивування, необхідно забезпечити герметичність апарату. Для цього використовують торцеві ущільнення, які попереджають втрату робочого середовища та потрапляння стороннього повітря в апарат. Вибір типу ущільнення обумовлюється умовами роботи. Оскільки сфера застосування апарату, що проектується - стерильні біологічні процеси обирається подвійне ущільнення з термічним затвором.

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Вихідні дані:

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						60
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- $q_{vc} = 1 \times 10^{-3} \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{с})$ – питома швидкість поглинання кисню мікроорганізмом;
- $q_{vt} = 15 \text{ кВт}/\text{м}^3$ – питома швидкість виділення теплоти в результаті біохімічних процесів;
- $V_p = 50 \text{ л}$ – об'єм культуральної рідини, що не аерується (робочий об'єм апарата);
- $W_T = 1 \text{ м}^3 / (1 \text{ м}^3 \text{ хв})$;
- $t = 28^\circ\text{C}$ – температура культивування
- $C = 0,1C_p$ – концентрація кисню у поживному середовищі (C_p – концентрація насичення культуральної рідини киснем з повітря).

Теплофізичні параметри для культуральної рідини розраховуються за компонентом вміст якого у середовищі найбільший. Основним компонентом середовища для культивування ризобіїв є маніт вміст якого складає 8 г/л (0,8%). Оскільки вміст розчинених речовин у середовищі незначний і для спрощення розрахунків, значення основних теплофізичних параметрів для культуральної рідини при 28°C приймається рівним відповідним параметрам води при даній температурі.

$$\rho_p = \rho_{30} - \frac{\rho_{30} - \rho_{20}}{10} \cdot 8 = 998,2 - \frac{998,2 - 995,7}{10} \cdot 8 = 996,2 \text{ кг}/\text{м}^3,$$

$$\mu_p = \mu_{30} - \frac{\mu_{30} - \mu_{20}}{10} \cdot 8 = 1004 - \frac{1004 - 801,5}{10} \cdot 8 = 842 \cdot 10^{-6} \text{ Па} \cdot \text{с},$$

$$c_p = c_{30} - \frac{c_{30} - c_{20}}{10} \cdot 8 = 4,183 - \frac{4,183 - 4,174}{10} \cdot 8 = 4,176 \cdot 10^3 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}},$$

$$\lambda_p = \lambda_{30} + \frac{\lambda_{30} - \lambda_{20}}{10} \cdot 8 = 59,9 + \frac{61,8 - 59,9}{10} \cdot 8 = 61,42 \cdot 10^{-2} \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}},$$

$$\text{Pr} = \text{Pr}_{30} - \frac{\text{Pr}_{30} - \text{Pr}_{20}}{10} \cdot 8 = 7,02 - \frac{7,02 - 5,42}{10} \cdot 8 = 5,74.$$

Втратами тепла в навколишнє середовище можна знехтувати, оскільки вони є незначними.

Конструктивний розрахунок

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						61
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Необхідна кількість посівного матеріалу – 50 л, отже

$$V_p = 0,05 \text{ м}^3 - \text{робочий об'єм апарата}$$

Стандартний коефіцієнт заповнення $K_3 = 2/3$, отже номінальний об'єм інокулятора

$$V_n = \frac{V_p}{K_3} = \frac{0,05 \cdot 3}{2} = 0,075 \text{ м}^3$$

Найближчий за об'ємом ферментер зі стандартного ряду – реактор об'ємом 100 л ($0,1 \text{ м}^3$), отже основні параметри обраного інокулятора наступні:

- $D = 500 \text{ мм}$ – внутрішній діаметр;
- $F_p = 0,7 \text{ м}^2$ – площа поверхні теплообміну рубашки
- $H_a = 550 \text{ мм}$ – висота апарата [49].

Для забезпечення достатньої інтенсивності перемішування для розчинення кисню вибирається стандартна відкрита турбінна мішалка. Діаметр мішалки обирається за співвідношенням $D/d_m = 3$, звідки

$$d_m = \frac{D}{3} = \frac{500}{3} = 166,7,$$

За стандартними значеннями діаметру мішалки відповідно до ГОСТ 20680-75 [49] обирається $d_m = 160 \text{ мм}$ ($\Gamma_D = 2 \div 6$). Обирається частота перемішування 3 с^{-1} . Інші параметри мішалки наступні: $\Gamma_{D0} = \Gamma_{H0} = 3$; $\Gamma_{n0} = 1$; $\Gamma_{b0} = 0,2$. Також, для подальших розрахунків визначаються

$$\Gamma_D = \frac{D}{d_m} = \frac{0,5}{0,16} = 3,125;$$

$$\Gamma_H = \frac{H}{d_m} = \frac{0,55}{0,16} = 3,44;$$

$$\Gamma_B = \frac{B}{d_m} = \frac{0,1D}{d_m} = \frac{0,1 \cdot 0,5}{0,16} = 0,31.$$

Відповідно до ГОСТ 6533-78 [48] вибираються розміри еліптичного днища ферментера:

$$V_{\text{дн}} = 26,4 \cdot 10^{-3} \text{ м}^3 - \text{об'єм рідини в днищі};$$

$$h_1 = 25 \text{ мм} - \text{висота відбортаної частини днища};$$

$$h_b = 125 \text{ мм} - \text{висота еліптичної частини днища}.$$

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

Відстань від дна реактора до мішалки $h'_m = 0,4d_m = 0,4 \cdot 0,16 = 0,064м$

Приймаємо це значення як $h_m = 0,2h'_m = 0,2 \cdot 0,064 = 12,8мм$

Довжина лопатей

$$l = 0,25d_m = 0,25 \cdot 160 = 40мм$$

$$b = 0,1d_m = 0,1 \cdot 160 = 16мм$$

Висота рівня рідини в реакторі

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D} + h_1 + h_6 = \frac{4(0,05 - 0,0264)}{3,14 \cdot 0,5} + 0,025 + 0,125 = 0,21м$$

Відстань від дна до верхньої точки мішалки:

$$h_3 = h_1 + h_m = 0,025 + 0,0128 = 0,0378м [50]$$

Розрахунок перемішуючих пристроїв

Визначається критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{nd_m^2}{\nu_p} = \frac{3 \cdot 0,16^2}{8,45 \cdot 10^{-7}} = 0,9 \cdot 10^5, \text{ де}$$

$$\nu_p = \frac{\mu_p}{\rho_p} = \frac{0,842 \cdot 10^{-3}}{996,2} = 8,45 \cdot 10^{-7} м^2 / с - \text{ коефіцієнт кінематичної в'язкості.}$$

Для турбінної мішалки з графіком визначається $K_N = 6$.

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 6 \cdot 996,2 \cdot 3^3 \cdot 0,16^5 = 17 Вт$$

Для ущільнення валу мішалки обираємо торцьове ущільнення.

Потужність, що витрачається на тертя а ущільненні:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_g^{1,3} = 6020 \cdot 0,019^{1,3} = 34,8 Вт$$

де $d_g = C \cdot d_m = 0,117 \cdot 0,16 = 0,019$ - діаметр валу мішалки

В інокуляторі додатково встановлюються гільзи ($K_1=1,1$). На перемішування також будуть впливати наявність перегородок ($K_n=1$) та рівень рідини. Коефіцієнт рівня рідини:

$$K_H = \sqrt{\frac{H_p}{D}} = \sqrt{\frac{0,21}{0,5}} = 0,648$$

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						63
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Відповідно розрахункова потужність електродвигуна:

$$N_{el} = \frac{K_n K_H K_1 N + N_{уц}}{\eta} = \frac{1 \cdot 0,648 \cdot 1,1 \cdot 17 + 34,8}{0,85} = 39,8 \text{ Вт}$$

Отже обирається двигун з номінальною потужністю $N_H = 0,05$ кВт.

Розрахунок воронки

Необхідність встановлення перегородок в апараті визначається за допомогою розрахунку воронки. Для цього розраховується параметр висоти завантаження апарата:

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \frac{0,21}{0,5} + 1 = 4,36$$

Параметр гідравлічного опору мішалки:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_m \text{Re}^{0,25}} = \frac{4,36}{8,4 \cdot 1 \cdot (0,9 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,03$$

За графіком, $\psi_1 = 1,2$; $B = 6$.

Таким чином, глибина воронки

$$h_g = \frac{B n^2 d_m^2}{2} = \frac{6 \cdot 27 \cdot 0,16^2}{2} = 2,07 \text{ м}$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{gp} = H_p - h = 0,21 - 0,064 = 0,146 \text{ м}$$

Оскільки глибина воронки більша за гранично допустиму, в апараті необхідно встановлювати відбивні перегородки [50].

Розрахунок барботера

Для розрахунку витрати кисню приймемо приведену швидкість кисню в апараті як $\omega_p = 0,04$ м/с. Тоді витрата:

$$V_p = \left(\frac{3,14}{0,1} \right) \cdot 0,5^2 \cdot 0,04 = 0,0314 \text{ м}^3 / \text{с}$$

Діаметр труби барботера при швидкості повітря в ній $\omega_p = 25$ м/с

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						64
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$d_{\sigma} = \sqrt{\frac{4V_p}{\pi\omega_{\sigma}}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,0314}{3,14 \cdot 25}} = 0,04 \text{ м}$$

Середній діаметр барботеру:

$$D_{cp} = 1,75d_{\sigma} = 1,75 \cdot 0,160 = 280 \text{ мм} [51]$$

Густина повітря при температурі 28°C складає

$$\rho_n = 1,185 - \frac{1,185 - 1,165}{5} 3 = 1,173 \text{ кг / м}^3$$

Тоді швидкість газу в отворах барботеру

$$\omega_0 = 3,4 \sqrt{\frac{d_{\sigma} 1000}{\rho_n}} = 3,4 \sqrt{\frac{0,04 \cdot 1000}{1,173}} = 19,85 \text{ м / с}$$

Діаметр отворів барботер приймається як 5 мм. Їх загальна кількість:

$$z_0 = \frac{4V_p}{\pi d^2 \omega_0} = \frac{4 \cdot 0,0314}{3,14 \cdot 0,005^2 \cdot 19,85} = 80$$

Отвори розміщуються по колу діаметром D_{cp} в два ряди. Кок між отворами становить:

$$t = \pi D_{cp} (2 / z_0) = 3,14 \cdot 280 \cdot (2 / 80) = 22 \text{ мм}$$

Тепловий розрахунок

Для підтримки необхідної температури протікання процесу ($t=28^\circ\text{C}$) необхідно відводити теплоту, що утворюється в ході біохімічних процесів росту та розвитку клітини, а також тепло що виділяється в результаті перемішування, з питомою потужністю 0,53 кВт.

$$Q = (q_{vt} + N_v) V_p = (15 + 0,53) 0,05 = 0,8 \cdot 10^3 \text{ Дж}$$

Для відведення теплоти, що утворюється в наслідок біохімічних реакцій і в результаті інтенсивного перемішування, необхідно встановити поверхню рубашки реактора зі спіральною перегородкою, що утворює канали з кроком в 0,25 м та перерізом 0,25 м $\times$ 0,03 м.

В якості холодного теплоносія використовується вода, з початковою температурою 18°C і кінцевою - 22°C. Теплофізичні параметри холодного теплоносія обирається по середній температурі води:

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						65
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$t_{cp} = \frac{t_n + t_k}{2} = \frac{18 + 22}{2} = 20^\circ C$$

Основні теплофізичні параметри води при даній температурі наступні:

$$\rho_B = 998,2 \text{ кг/м}^3$$

$$\mu_B = 1004 \cdot 10^{-6} \text{ Па}\cdot\text{с}$$

$$c_B = 4,183 \text{ кДж/кг}\cdot\text{К}$$

$$\lambda_B = 59,9 \cdot 10^{-2} \text{ Вт/м}\cdot\text{К}$$

$$Pr_B = 7,02.$$

При обраних параметрах охолоджуючої води, середній температурний напір

$$\Delta t_{cp} = \frac{\Delta t_{\delta} - \Delta t_m}{2,3g} = \frac{10 - 6}{2,3 \lg \frac{10}{6}} = 7,9^\circ C$$

Для розрахунку поверхні охолодження необхідно знайти коефіцієнт теплопередачі:

$$K_0 = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_{cm}}{\lambda_{cm}} + \frac{1}{\alpha_2}}$$

де α_1 – коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що перемішується до стінки апарату, Вт/(м²·К);

α_2 – коефіцієнт тепловіддачі від стінки до охолоджуючої води, Вт/(м²·К);

δ_{cm} – товщина стінок апарату (0,01 м);

λ_{cm} – теплопровідність стінки (для нержавіючої сталі марки 12х18Н10Т $\lambda_{cm} = 17,5$ Вт/(м·К).

Для розрахунку α_1 :

$$\begin{aligned} Nu &= 0,76 Re_m^{0,67} Pr^{0,33} \left(\frac{\mu_h}{\mu_{cm}} \right)^{0,14} \psi_D \psi_H = 0,76 \left(\frac{nd_m^2 \rho_p}{\mu_p} \right)^{0,67} Pr_p^{0,33} \left(\frac{\mu_p}{\mu_{cm}} \right)^{0,14} \left(\frac{\Gamma_D}{\Gamma_{D_0}} \right)^{-0,13} \left(\frac{\Gamma_H}{\Gamma_{H_0}} \right)^{-0,56} = \\ &= 0,76 \left(\frac{3 \cdot 0,16^2 \cdot 998,2}{842 \cdot 10^{-6}} \right)^{0,67} 5,74^{0,33} \left(\frac{0,73 \cdot 10^{-3}}{0,86 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,14} 1,04^{-0,13} 1,14^{-0,56} = 546,22. \end{aligned}$$

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

За значенням Nu визначається $\alpha_1 = \frac{Nu \lambda_p}{D} = \frac{546,22 \cdot 0,6142}{0,5} = 670 \text{ Вт} / \text{м}^2 \cdot \text{К}$ При

розрахунку температури стінки вона умовно приймається середньою між температурою середовища, що перемішується та температурою охолоджуючої води ($t_{cm} = (20+28)/2 = 24^\circ\text{C}$). Охолоджуюча вода протікає по спіральному каналу прямокутного перерізу ($n_{cn} \times b_{cn} = 0,25 \text{ м} \times 0,03 \text{ м}$), площа якого $f = 0,0075 \text{ м}^2$, а еквівалентний діаметр

$$d_{екв} = \frac{4f}{\Pi} = \frac{4 \cdot 0,0075}{2(0,25 + 0,03)} = 0,0536 \text{ м.}$$

Витрата охолоджуючої води розраховується з рівняння теплового балансу,

$$G_B = \frac{Q}{c_B(t_k - t_n)} = \frac{0,8 \cdot 10^3}{4183(22 - 18)} = 0,05 \text{ кг} / \text{с}$$

а швидкість води в каналі

$$w_г = \frac{G_г}{f \rho_г} = \frac{0,05}{0,0075 \cdot 997,6} = 0,0067 \text{ м} / \text{с}$$

За такої швидкості критерій Рейнольдса

$$\text{Re} = \frac{w_г d_{екв}}{\nu_г} = \frac{0,0067 \cdot 0,0536}{1,01 \cdot 10^{-6}} = 326,47$$

режим руху – турбулентний. Для розрахунку α_2 використовуємо критеріальне рівняння:

$$Nu = 0,021 \xi_1 \text{Re}^{0,8} \text{Pr}^{0,4} \left(\frac{\text{Pr}}{\text{Pr}_{cn}} \right)^{0,25} X,$$

де X – коефіцієнт кривизни спіралі.

$$X = 1 + 3,54 \frac{d_{екв}}{D} = 1 + 3,54 \frac{0,0536}{0,5} = 1,38$$

Критерій $\text{Pr}_{ст}$ приймається при $t_{ст} = 24^\circ\text{C}$, $\text{Pr}_{ст} = 6,22$. Визначається критерій Нусельта:

$$Nu = 0,021 \cdot (326,47)^{0,8} 6,62^{0,4} \left(\frac{6,62}{6,22} \right)^{0,25} 1,38 = 6,42$$

а також коефіцієнт α_2 :

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						67
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$\alpha_2 = \frac{Nu\lambda_{\text{екв}}}{d_{\text{екв}}} = \frac{6,42 \cdot 60,4 \cdot 10^{-2}}{0,0536} = 72,34 \text{ Вт/м}^2 \text{ К}$$

Визначається коефіцієнт теплопередачі K_0 :

$$K_0 = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_{\text{см}}}{\lambda_{\text{см}}} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{670} + \frac{0,01}{17,5} + \frac{1}{72,34}} = 63,01 \text{ Вт/(м}^2 \cdot \text{К)}$$

З урахуванням забрудненості поверхні, коефіцієнт теплопередачі $K=0,9$
 $K_0=56,7$.

Поверхня охолодження

$$F = \frac{Q}{K\Delta t_{\text{cp}}} = \frac{800}{56,7 \cdot 7,9} = 1,79 \text{ м}^2$$

І розміщується на висоті

$$H = \frac{F}{\pi D} = \frac{1,79}{3,14 \cdot 0,5} = 1,14 \text{ м [53]}$$

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

На виробництві насінєвих інокулянтів, як і на будь-яких інших біотехнологічних виробництва велику увагу слід приділяти стадії допоміжних робіт, адже від успішності та якості виконання цих етапів напряду залежить якість продукції. В першу чергу, важливо слідкувати за компонентним вмістом поживного середовища. Також необхідно готувати робочі розчини відповідних концентрацій. Для цього обирається відповідна апаратура.

Оскільки культивування відбувається періодично, для приготування розчинів та поживних середовищ використовують апарати дискретного дозування. Для дозування сипких речовин використовуються вагові дозатори, а також електронні дозатори рідких компонентів.

Рідинні дозатори виконують функцію контролю та дозування води за допомогою електромагнітного лічильника та клапана. Перед подачею у дозатор змішуються холодна та гаряча вода, що дозволяє встановлювати не тільки необхідний об'єм, а й потрібну температуру води. Можлива установка на труби діаметром 6 - 50 мм, робочий тиск – 0,5 – 10 атм, робоча напруга – 220 В.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						68
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Діапазон встановлення доз від 10 мл до 10 000 літрів, похибка дозування не більше 0,5% [54].

Переважно для транспортування рідин на виробництві використовують самоплив рідин трубопроводами під дією гравітації та пере тискання рідини з одного апарата в інший стисненим повітрям. Для транспортування поживного середовища та культуральної рідини між відповідними апаратами, а також для транспортування води застосовуються лопатеві насоси [57].

Насоси типу КМ (центробіжні, горизонтальні з опорою на корпусі насоса) призначені для перекачування рідин з густиною 1800 кг/м^3 із вмістом абразивних домішок до 0,1% та $\text{pH}=6-9$. Робоча температура від 0°C до $+140^\circ\text{C}$. Потужність двигуна – 0,5 кВт. [55] Основною перевагою таких насосів є їх мало шумність, легкість, надійність та висока продуктивність.

На етапі отримання посівного матеріалу окрім інокулятора використовують також хімічні пробірки ПБ-2-21x200 номінальним об'ємом 50 мл та конічні колби на 1 л КН-2-1000-42 [56].

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Загалом біотехнологічні виробництва є значно безпечнішими для людини та навколишнього середовища ніж хімічні виробництва, проте робота на підприємствах все одно може нести загрозу для працівників.

В ході виробництва співробітники контактують з агресивними розчинами (лугами, кислотами, миючими та дезінфікуючими засобами). Також джерелом небезпеки можуть слугувати апарати, трубопроводи та ін, що працюють під тиском або при високих температурах.

Для уникнення ризику від вище вказаних чинників, до роботи мають допускатися лише працівники, що пройшли відповідний інструктаж і ознайомилися з технікою безпеки на відповідній ділянці виробництва. Крім того, працівники повинні забезпечуватися засобами індивідуального захисту – рукавичками, масками, змінним одягом, окулярами, тощо.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

Особливу увагу на виробництві необхідно приділяти чистоті повітря у виробничих приміщеннях. У кімнатах, де відбувається приготування розчинів, поживних середовищ чи одразу після прибирання дезінфікуючими засобами в повітрі можуть міститися сліди хімічних сполук, що негативно впливають на здоров'я людей. Через це, на підприємстві необхідно забезпечувати вентиляцію втяжного типу, а перед подачею повітря до виробничих приміщень воно повинно проходити відповідну очистку.

Крім того, для уникнення ризику зараження та появи забруднюючої мікрофлори на виробництві необхідно ретельно проводити прибирання та миття обладнання, особливо від залишків поживного середовища або культуральної рідини.

На відміну від хімічних виробництв, біотехнологічні виробництва не продукують токсичних відходів. Основними типами відходів є відпрацьовані мийні та дезінфікуючі засоби, а також відпрацьована вода. До відходів також відноситься відпрацьоване повітря, некондиційний посівний матеріал чи культуральна рідина.

Всі відходи виробництва повинні знешкоджуватися, а також, за можливості перероблятися, і використовуватися повторно.

На переробку перенаправляються засоби використані засоби індивідуального захисту, склобит. Повторно у виробництво можуть включатися конденсат та повітря.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						70
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. Застосування інокулянтів для передпосівної обробки насіння на основі симбіотичних азот фіксуючих мікроорганізмів дозволяє покращити азотне живлення рослин і зменшити споживання азотних добрив та набуває ве більшої популярності ;
2. Досліджено та вдосконалено технологію виробництва інокулянтів на основі ризобії гороху;
3. Обрано технологію періодичного глибинного культивування без подальшої очистки культуральної рідини;
4. Обрано продуцента *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* який є конкурентоздатним симбіонтом гороху та деяких інших бобових, і показує високий рівень нодуляції та нітрогеназної активності ;
5. Запропоновано схему отримання промислового продуцента шляхом штучного добору
6. Обрано склад поживного середовища для всіх етапів культивування на основі маніту та дріжджового екстракту
7. Складено технологічну та апаратурну схеми виробництва.
8. Обрано та розраховано інокулятор для отримання посівного матеріалу номінальним об'ємом 0,1 м³ з барботером та турбінною мішалкою відкритого типу.

					ДП БТ-9201 00.000.00		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ		
Розроб		Белінська					
Конс.							
Кервн.		Полішук В.Ю.					
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						71	76
					КПІ ім.. Ігоря Сікорського ФБТ		

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Мазур В.Ф., Поліщук І.С., Телекало Н.В., Мордванюк М.О. Рослинництво навчальний посібник. Вінниця: видавництво ТОВ «Друк». 2020. 284с.
2. Державна служба статистики. Площі валові збори та урожайність сільськогосподарських культур за їх видами та по регіонах (<https://www.ukrstat.gov.ua/>)
3. Роль біологічного азоту в азотному живленні рослин / В.В. Моргун, С. Я. Коць // Вісник національної академії наук України. — 2018. — № 1. — с. 62-74. — бібліогр.: 30 назв. — укр.
4. Коць С.Я. Сучасний стан досліджень біологічної фіксації азоту. Физиология и биохимия культ. растений. 2011. Т. 43. № 3
5. Бульбочкові бактерії – гетеротрофний та симбіотрофний способи життя / Д.В. Крутило // Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. — Чернігів, 2008. — Вип. 7. — С. 147-161. — Бібліогр.: 70 назв. — укр.
6. С.Я. КОЦЬ, О.О. ГРИЩУК ФІТОГОРМОНАЛЬНА РЕГУЛЯЦІЯ БОБОВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ// ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ГЕНЕТИКА. 2019. Т. 51. № 1
7. Надкернична О.В., Ковалевська Т.М., Крутило Д.В., Горбань В.П., Воробей В.С. ВПЛИВ АКТИВНИХ ШТАМІВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ НА ПРОДУКТИВНІСТЬ БОБОВИХ РОСЛИН
8. Мандровська Н М., Кругова О.Д., Коць С.Я. Ефективність симбіозу рослин гороху із транспозантами *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 263б. Вісник ХНАУ. Серія : Біологія. 2007. №1(10). С.65-71.
9. А.С. Левішко¹, І.І. Гуменюк¹, Є.Д. Ткач¹, Ю.В. Терновий², Ю.А. Кравчук² ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ НОВИХ ШТАМІВ RHIZOBIUM НА ПОСІВАХ БОБОВИХ КУЛЬТУР agroecological journal • No. 1 • 2022
10. Bacterial Diversity Metadatabase <https://bacdiv.dsmz.de/strain/138443>

					<i>ДП БТ-9201 00.000.00</i>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ		
Розроб		Белінська					
Конс.							
Кервн.		Поліщук В.Ю.					
Затв							
					Літ.	Арк.	Акрушів
						72	76
					КПІ ім.. Ігоря Сікорського ФБТ		

11. Mazur, A., De Meyer, S. E., Tian, R., Wielbo, J., Zebracki, K., Seshadri, R., Reddy, T., Markowitz, V., Ivanova, N. N., Pati, A., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Reeve, W. High-quality permanent draft genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain GB30; an effective microsymbiont of *Pisum sativum* growing in Poland. *Standards in genomic sciences*, 2015, 10, 36. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0029-6>
12. Определитель бактерий Берджи /Под. ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса.-М.:Мир.-1997. –Т.1.-С.185.
13. Конспект лекцій з дисципліни „Біохімічні основи мікробного синтезу» для студентів напряму 6.051401 „Біотехнологія»/ Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю., – Дніпродзержинськ, ДДТУ, 2016. – 183 с.
14. ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ - Т.П. Пирог – 2004
15. Science photo library. Pink nodules of *Rhizobium leguminosarum* (<https://www.sciencephoto.com/media/13072/view/pink-nodules-of-rhizobium-leguminosarum>)
16. Стамбульська У. Я. Хемотаксис *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* до органічних речовин / У. Я. Стамбульська, В. І. Лушак // Мікробіологічний журнал. - 2009. - Т. 71, № 3. - С. 47-54.
17. Бондаренко А.П., Ведерникова А.А., Вайшля О.Б. Микроорганизмы ризосферы: учебно-методическое пособие. — Павлодар, 2008. — 237 с.
18. А. К. Глянько, А. А. Ищенко, Н. В. Филинова БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНЫЙ СИМБИОЗ: НЕКОТОРЫЕ СОВРЕМЕННЫЕ ЗНАНИЯ // ВІСНИК ХАРКІВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО АГРАРНОГО УНІВЕРСИТЕТУ СЕРІЯ БІОЛОГІЯ, 2017, вип. 3 (42), с. 6-22
19. Іуланська Г.О. Ґрунтова мікробіологія: Навчальний посібник. - К.: Арістей, 2006. -2 8 4 с.
20. RCSB Protein Data Bank. Nitrogenase <https://pdb101.rcsb.org/motm/26>
21. J Peter W Young*, Lisa C Crossman†, Andrew WB The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components / *Genome Biology* 2006, 7:R34

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

22. Juan Liang† , Anne Hoffrichter† , Andreas Brachmann and Macarena Marín
Complete genome of Rhizobium leguminosarum Norway, an ineffective Lotus
micro-symbiont / . Standards in Genomic Sciences (2018) 13:36
23. Gidle Laguerre, Sylvie Isabelle Mazurier ' and Noelle Amarger Plasmid
profiles and restriction fragment length polymorphism of Rhizobium
leguminosarum bv. viciae in field populations / FEMS Microbiology Ecology
101 (1992) 17-26
24. HANS-MARTIN FISCHER Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia /
MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Sept. 1994, p. 352-386
25. Н.А. ВОРОБЕЙ СЕЛЕКЦІЯ ГЕНЕТИЧНО МАРКОВАНИХ
БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM ЗА
СИМБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ / ФИЗИОЛОГИЯ И
БИОХИМИЯ КУЛЬТ. РАСТЕНИЙ. 2013. Т. 45. № 2
26. Н.А. ВОРОБЕЙ, С.Я. КОЦЬ СТРАТЕГІЯ ДОБОРУ БУЛЬБОЧКОВИХ
БАКТЕРІЙ BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM ЗА ПОЛІПШЕННЯМ
СИМБІОТИЧНИМ ФЕНОТИПОМ // ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И
ГЕНЕТИКА. 2018. Т. 50. № 4
27. Мандровська Н. М., Кругова О.Д., Коць С.Я. Ефективність симбіозу
рослин гороху із транспозантами Rhizobium leguminosarum bv. viciae 2636.
Вісник ХНАУ. Серія : Біологія. 2007. № 1(10). С.65-71.
28. Кругова О.Д., Мандровська Н.М. Нодуляційна конкурентна здатність
Tn5–мутантів Rhizobium leguminosarum bv. viciae
29. С. Я. Коць, В. М. Мельник, В. К. Даценко ТРАНСПОЗОНОВИЙ
МУТАГЕНЕЗ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ НОВИХ
ШТАМІВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ / ВІСНИК ХАРКІВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОГО АГРАРНОГО УНІВЕРСИТЕТУ СЕРІЯ БІОЛОГІЯ,
2009, вип. 1 (16), с. 6-18
30. Воробей Н. А. Біотехнологія створення ефективних TN5-мутантів
бульбочкових бактерій конюшини Rhizobium leguminosarum bv. trifolii / Н.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

- А. Воробей, В. М. Заєць, С. Я. Коць // Biotechnology. - 2012. - Vol. 5, № 3. - С. 53-61. - Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2012_5_3_7.
31. ГОСТ 16337-77 Поліетилен високого тиску. Технічні умови. Зі змінами № 1, 2, 3 [Чинний від 2019-08-12]. Москва 2008
 32. ГОСТ 8321-74 Реактивы. Д(-) маннит. Технические условия
 33. ДСТУ 4464:2005. Глюкоза кристалічна гідратна [Чинний від 2007-01-01]. Київ 2007
 34. ДСТУ ISO 2992:2008 Амонію сульфат технічний [Чинний від 2010-01-01].
 35. ГОСТ 4198-75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия. [Чинний від 1976-07-01].
 36. ГОСТ 2493-75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия. [Чинний від 1976-07-01].
 37. ГОСТ 4523-77 Магний серно-кислый 7-водный. Технические условия. [Чинний від 1979-07-01].
 38. ДСТУ 7525:2014 Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості [Чинний від 2015-02-01]. Київ 2014
 39. ДСТУ ISO 979-2001 Натрію гідроксид технічний [Чинний від 2002-01-01]. Київ 2001 [Чинний від 1996-07-01]. Київ 1995
 40. ДСТУ 2904-94 (ГОСТ 857-95) Кислота соляна синтетична технічна. Технічні умови. З Поправкою [Чинний від 1996-07-01]. Київ 1995
 41. ГОСТ 16280-2002 Агар харчовий [Чинний від 2004-01-01]
 42. ДСТУ ГОСТ 908:2006 Кислота лимонна моногідрат харчова. Технічні умови (ГОСТ 908-2004, IDT) [Чинний від 2007-01-01]. Київ 2006
 43. ГОСТ 177-88 Водорода перекись. Технические условия [Чинний від 1989-07-01]
 44. ГОСТ 14193-78 Монохлорамин ХБ технический [Чинний від 1980-01-01]
 45. ДСТУ 8401:2015 Картон. Пакування, маркування, транспортування і зберігання [Чинний від 2017-07-01]. Київ 2016
 46. Про охорону праці: Закон України від 14 жовтня 1992 №49

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						75
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

47. Сидоров Ю.І. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості: навчальний посібник. / Ю.І.Сидоров, Р.Й. Влязло. В.П.Новіков. – Львів: Інтелект-Захід, 2008. – 736 с.
48. ГОСТ 6533-78 Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов [Чинний від 1978-10-26].
49. ГОСТ 20680-75 Аппараты с механическим перемешивающим устройствами вертикальные [Чинний від 1977-01-01].
50. Ружинська Л.І. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв. Навч. посібник/ Укладачі: Л.І. Ружинська, І А Буртна, В.М.Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: НТУУ «КПІ», 2014 – 130 с.
51. Учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности «Машины и аппараты химических производств и предприятий строительных материалов» / И.В. Доманский, В.П. Исаков, Г.М. Островский, А.С. Решанов, В.Н. Соколов. / Под общ. ред. В.Н. Соколова. - 2-е изд., перераб. и доп. - СПб.: Политехника, 1992. - 327 с.
52. Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 “Промислова біотехнологія” та 6.092902 “Біотехнологія біологічно активних речовин”, напряму 0929 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005. – ... с.
53. Проектирование процессов и аппаратов пищевых производств. Под ред. В.Н. Стабникова. – Киев: Вища школа. Гоговие изд-во, 1982.. – 199 с.
54. Агро-тех. Каталог обладнання. (<https://agro-teh.com.ua/ua/g14660788-doziruyuschee-oborudovanie>)
55. TS Engineering. Каталог продукції
56. EximLab. Каталог продукції <https://shop.eximlab.ua/laboratornii-posud/>
57. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

					ДП БТ-9201 00.000.00	Арк.
						76
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		