

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

« ___ » _____ 20__ р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« ___ » _____ 20__ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми : Біотехнології: фармацевтична, промисло-
ва, харчова, природоохоронна

на тему: «Біосинтез гелану *Sphingomonas yabuuchiae*»

Виконала: здобувачка 4 курсу, групи 1

Парфенюк Марія Андріївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Пирог Тетяна Павлівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

Рецензент

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична

промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПАРФЕНЮК Марії Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез гелану *Sphingomonas yabuuchiae*

керівник роботи ПИРОГ Тетяна Павлівна, д.т.н., проф.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-к

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Sphingomonas yabuuchiae*, цільовий продукт: гелан

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту, РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента, РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту, РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми, РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми процесу отримання гелану, РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва гелану – 2 аркуші формату А1. Апаратурна схема виробництва гелану – 2 аркуші формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання ви- дав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання _____ 04 квітня 2022 року _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільовго продукту	04.04.22 - 11.04.22	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.22 - 18.04.22	
3	Техніко-економічне обґрунтування	18.04.22 - 25.04.22	
4	Біосинтез цільового продукту	25.04.22 - 02.05.22	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	02.05.22 - 10.05.22	
6	Специфікація обладнання	02.04.22 - 10.05.22	
7	Виконання графічної частини проекту	10.05.22 - 17.05.22	
8	Опис технологічної схеми процесу	17.05.22 - 24.05.22	
9	Контроль виробництва	24.05.22 - 01.06.22	
10	Оформлення пояснювальної записки	17.05.22 - 01.06.22	

Здобувачка _____

(підпис)

Марія ПАРФЕНЮК _____

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____

(підпис)

Тетяна ПИРОГ _____

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробці технологічної та апаратурної схем біосинтезу екзополісахариду (ЕПС) гелану *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388, який на середовищі з технічним гліцерином – відходом виробництва біодизелю синтезує 52,6 г/л даного полісахариду. Гелан пропонується використовувати як компонент косметичного протизапального тонеру для лікування акне та вугрів. Відповідно до даних Державної служби статистики України щодо захворювань населення розрахована потужність виробництва складає 4,14 т гелану за рік (10,3 м³ культуральної рідини).

Технологія виробництва гелану включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів соляної кислоти та натрію гідроксиду, приготування і стерилізація запасного розчину кальцію хлориду, підготовка і стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інкуляторах об'ємом 20, 200 л та 2 м³) та біосинтез у ферментері об'ємом 20 м³ зі змінним коефіцієнтом заповнення (початковий – 0,6, а кінцевий – 0,65, оскільки у процесі культивування двічі здійснюється внесення субстрату)). Розроблено карту постадійного контролю доферментаційних процесів і виробничого біосинтезу та зазначено методики контролю концентрації біомаси, цільового продукту (гелану), амонійного азоту та технічного гліцерину.

Дипломний проект викладений на 97 сторінках, містить 13 таблиць, 6 рисунків, складається зі вступу, восьми розділів, списку використаної літератури (106 найменувань), 7 додатків, технологічної (формат А1, 2 аркуші) та апаратурної (формат А1, 2 аркуші) схем.

Ключові слова: гелан, *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388, акне, лікувальна косметика, біосинтез, відходи виробництва біодизелю, технічний гліцерин.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
1.1. Загальна інформація.....	9
1.2. Хімічний склад	9
1.3. Реологічні властивості	10
1.4. Практичне застосування	11
1.4.1. Харчова промисловість	11
1.4.2. Приготування середовищ для вирощування мікроорганізмів	12
1.4.3. Медицина.....	13
1.4.4. Фармацевтика	14
1.5. Характеристика товарних форм гелану	15
1.5.1. Gelrite™	15
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	18
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	18
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму <i>Sphingomonas yabuuchiae</i> – продуцента гелану.....	23
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	27
2.5. Таксономічний статус біологічного агента	28
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	29
3.1. Потреби населення України у гелані для лікування захворювань шкіри .	29
3.2. Розрахунок потужності виробництва тонерів для лікування захворювань шкіри.....	30
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу полісахариду гелану.....	32

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу полісахариду гелану <i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GI:724472388.....	33
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	37
4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату біологічним агентом	37
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	38
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	43
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. 43	
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	43
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	45
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	46
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	49
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	56
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ГЕЛАНУ	61
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	74
8.1. Мікробіологічний контроль.....	74
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	75
8.2.1. Визначення концентрації біомаси	75
8.2.2. Визначення кількості синтезованого цільового продукту	75
8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену	75
8.3. Карта постадійного контролю	76
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	81
ДОДАТКИ	93

ВСТУП

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) – це велика і важлива група високомолекулярних сполук, які можуть продукуватися бактеріями, грибами та водоростями [1]. Завдяки їх біорозкладаності, нетоксичності, біосумісності, високій в'язкості при низьких концентраціях, здатності до регуляції реологічних властивостей водних систем дані полімери широко використовуються у різних галузях (косметика, харчова промисловість, медицина, нафтохімія та паперова промисловість) [2, 3].

Використання мікробних полісахаридів має низку переваг порівняно з уже відомими синтетичними та рослинними полісахаридами:

1. Виробництво мікробних полісахаридів не залежить від регіональних та кліматичних умов, а відділення полісахаридів від мікроорганізмів є простим процесом.

2. Мікроорганізми демонструють високу швидкість росту, тому виробництво мікробних ЕПС і більш вигідним процесом.

3. Мікроорганізми легко піддаються генетичним модифікаціям задля отриманням полісахариду із бажаними властивостями [4].

Акне – запальне захворювання волосяних фолікулів і сальних залоз шкіри, що проявляється відкритими або закритими комедонами та запальними ураженнями шкіри у вигляді папул, вузлів, що з часом переходять у пустули. При акне, як правило, уражаються ділянки з підвищеним вмістом сальних залоз: обличчя, груди, спина. Дане захворювання є поліетіологічним захворюванням, на розвиток якого також впливають несприятливий екологічний фон та обтяжена спадковість [5, 6].

Широка розповсюдженість, значний вплив на психоемоційну сферу хворого, соціальний статус і суспільну адаптацію хворих обумовлюють

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>						5	97
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
							7	

актуальність даної проблеми та необхідність розробки нових ефективних засобів лікування та профілактики захворювання [5].

Сучасні схеми лікування акне передбачають тривалі курси перорального прийому антибіотиків. При цьому виникають побічні ефекти, які знижують імунні реакції організму, що, у свою чергу, призводить до ослаблення захисних функцій шкіри, розвитку фототоксичних реакцій, підвищення резистентності до даних препаратів [7]. Важливим є також те, що різні лікарські препарати, що використовуються для лікування акне, можуть змінювати як окремі властивості, так і структуру епідермального бар'єру загалом. Це може провокувати виникнення побічних реакцій та загострення захворювання [0].

Однак при боротьбі з акне можливе щоденне застосування лікувальної косметики. Компонентами даних лікувальних засобів мають бути речовини на водній основі, що не викликають алергійних реакцій та не спричиняють камедогенну дію [9]. Таким компонентом може слугувати низькоацильована форма мікробного екзополісахариду гелану, завдяки його здатності до набухання, утворення міцних і прозорих гелей та безпечності у використанні [10].

Продуцентами мікробного полісахариду гелану можуть бути штами *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388, *S. azotifigens* GL-1, *S. paucimobilis* ATCC 31461 та *S. elodea* ATCC 31461 [11, 12, 13, 14]. *S. yabuuchiae* GI:724472388 має суттєві переваги над іншими, оскільки виявляє найбільшу здатність до синтезу гелану (52,6 г/л) та може використовувати як субстрат відходи виробництва біодизелю.

Мета дипломного проекту – проектування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) гелану бактеріями *S. yabuuchiae* GI:724472388.

Новизною даної роботи є використання як біологічного агента бактеріального штаму *S. yabuuchiae* GI:724472388, що характеризуються високою продуктивністю гелану, на середовищі з використанням як дешевого субстрату – технічного гліцерину (відходу виробництва біодизелю), з метою отримання протизапального косметичного засобу.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1. Загальна інформація

Гелан (геланова камедь) – це лінійний, аніонний, позаклітинний, водорозчинний і не токсичний за своєю природою мікробний екзополісахарид (ЕПС) білого кольору, що має регульовану еластичність і твердість [15, 16].

Уперше гелан був відкритий американськими вченими у 1978 році, а згодом Кан, Ведер та Канеко (1982 р.) успішно одержали гелан із бактерій роду *Pseudomonas* у лабораторних умовах [15]. Мікроорганізм, що продукує полісахарид гелан, був виділений із тканини рослини елодея. Подальші дослідження показали, що ізольований штам бактерій є представником *Pseudomonas elodea*. У 1994 році продуцент гелану був рекласифікований як *Sphingomonas paucimobilis* (*Sphingomonas elodea*), який належить до α -4 підкласу протеобактерій [17]. Нині, окрім природних продуцентів гелану, використовують генно-інженерні штами бактерій *Sphingomonas azotifigens* [12], *Sphingomonas pseudosanguinis*, *Sphingomonas yabuuchiae* [11].

1.2. Хімічний склад

Даний біополімер має високу молекулярну масу та складається з тетрасахаридної основи із повторюваними одиницями однієї молекули L-рамнози [α -1,4-L-рамнози], однієї з D-глюкуронової кислоти [β -1,4- D-глюкуронова кислота], двох молекул D-глюкози [β -1,3-D-глюкози; β -1,3-D-глюкоза] [18].

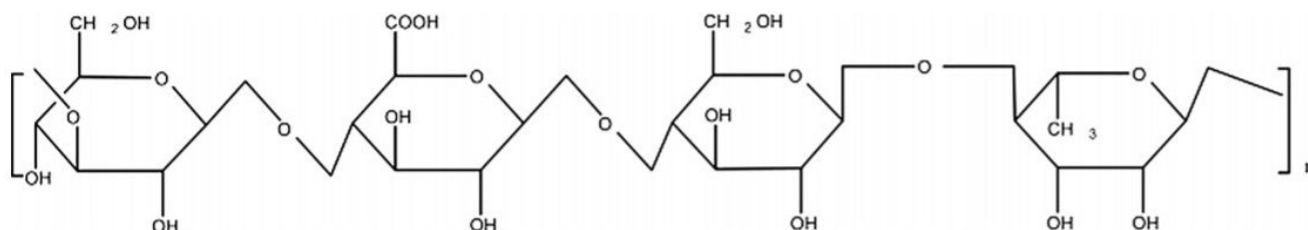


Рис.1.1. Хімічна структура гелану [16]

					НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ		
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробник	Парфенюк М.А.				Літера	Аркш	Аркшів
Керівник	Пирог Т.П.					7	97
Н. конто					Кафедра БТМ 9		
Консульт							
Зав. каф.	Стадніков В.П.						
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ							

Цей лінійний гетерополісахарид має в середньому молекулярну масу 0,5 МДа [19]. У нативному гелані, який також називають високоацетильованим геланом (НА гелан), залишок глюкози-А містить групу L-гліцерину при C₂ і ацетатну групу при C₆ [16, 19]. Низькоацетильований гелан (LA gellan), який утворює тверді та крихкі гелі в присутності катіонів, можна отримати за допомогою сильної лужної обробки гелану НА при високих температурах [20].

1.3. Реологічні властивості

НА добре розчинний в гарячій воді і утворює гнучкий та м'який гель при охолодженні до 65°C, а LA розчиняється в холодній воді і утворює жорсткий і крихкий гель за температури нижче 40°C [21]. Високоацетильований гелан також може утворювати еластичні гелі у присутності одно- і двовалентних катіонів [19].

При збільшенні температури від 25°C до 70°C в'язкість водних розчинів полісахариду гелану різко знижується. Тому можна стверджувати, що макромолекули гелану за підвищених температур існують у вигляді розплетених одиничних клубків. В'язкість водних розчинів гелану (концентрація 0,1 г/дл) збільшується, а згодом і утворюються гелі при додаванні певних концентрацій солей NaCl (0,1 н) та KCl (0,01 н). При додаванні MgCl₂ (0,006 н) в'язкість розчинів рівномірно зростає [22].

Максимальної твердості гелів гелану можна досягти за концентрації полісахариду 1% та 6-8 mM Mg²⁺. При концентраціях вище 8,4 mM Mg²⁺ утворення гелів досягається при температурі вище 50°C [23].

Загальноприйнято, що гелан зазнає конформаційного переходу клубок-спіраль при зміні температури і в присутності низькомолекулярних солей, супроводжуваного утворенням гелю за рахунок подвійної спіралізації. Причому ефективність гелеутворення в ряду однозарядних іонів лужних металів змінюється в ряду: Cs⁺ > Rb⁺ > K⁺ > Na⁺ > Li⁺ і задовільно узгоджується з послідовністю збільшення радіусу іонів. У разі двох- і трьохзарядних іонів металів агрегування подвійних спіралей збільшується в наступному порядку: Al³⁺ > Ba²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ [21].

1.4. Практичне застосування

ЕПС має регульовану еластичність і твердість, а також високий коефіцієнт пропускання, що дозволяє матеріалу легко змінити форму та мати безліч різних застосувань [16].

1.4.1. Харчова промисловість

Гелан використовується, як загусник, сполучна речовина та стабілізатор у різних харчових продуктах. Загалом полісахарид стабілізує гелі на водній основі, такі як десерти та киселі. Гелан навіть замінює желатин у деяких молочних продуктах, таких як йогурт та сметана у веганських продуктах. Крім того, він також використовується у вареннях з низьким вмістом калорій (без цукру), де пектин не проявляє своїх властивостей, фруктових препаратах, йогуртах, соусах, нежирних заправках для салатів та плівках [4].

Геланова камедь (E 418) дозволена в якості харчової добавки в Європейському Союзі (ЄС) відповідно до Додатку II і Додатку III до Регламенту (ЄС) № 1333/2008 про харчові добавки, а конкретні критерії чистоти визначені в Регламенті Комісії. (ЄС) № 231/2012. В ЄС геланова камедь (E 418) була оцінена Науковим комітетом з харчових продуктів в 1990 році. Комітет визначив допустиму добову дозу на основі токсикологічних даних і рівнів використання, зазвичай в діапазоні від 0,1% до 1%, в якості гелеутворюючого, стабілізуючого агента або загусника [24].

E 418 має структуру біло жовтого порошку, що добре розчиняється у воді як в нагрітій, так і в холодній. Вже починаючи з концентрації 0,05% гелі геланової камеді стійкі до розрізу, але дуже схильні до синерезису. Властивості отриманих гелів залежать від наявності в них солей кальцію та інших іонів [25, 26].

Згідно із даними галузі, крім полісахариду гелану, типові зразки містять воду (2-14%), білковий матеріал, який вимірюється за вмістом азоту (% N = 0-3,0%) (документація надана EFSA № 3), і можуть містити полігідроксибутират (ПГБ) до 25 мас.% [24].

Вплив на організм:

1) користь:

- гелановая камедь очищає кишечник людини;
- добавка E 418 зменшує всмоктування цукру в організмі людини, тим самим знижує його рівень в крові.

2) школа:

- якщо вживати у великій кількості продукти харчування з добавкою E 418, то можливе утворення метеоризму і здуття живота [27].

1.4.2. Приготування середовищ для вирощування мікроорганізмів

Агар є одним з найдорожчих і постійно використовуваних реагентів у мікробіологічних лабораторіях. Він використовується як гелеутворювач щільних середовищ для вирощування мікроорганізмів. Агар – це суміш полісахаридів, одержуваних з клітинних стінок водоростей (червоні водорості).

Гелан слугує гідною альтернативою водоростевому агару і застосовується як компонент поживних середовищ для росту мікроорганізмів. Вартість компонентів, необхідних для виробництва гелану становить приблизно одну десяту від вартості агару (\$ 0,58 проти \$ 5,60 за літр у середньому) [28].

Гелан навіть після стерилізації в автоклаві за часу витримки 5 хв і температурі 121°C може утворювати в'язку систему без застосування додаткової гелеутворюючої речовини. Це особливо корисно для культури термофільних мікроорганізмів, оскільки гелі термостабільні і витримують тривалі інкубації при високій температурі [17, 29].

Поживне середовище, у складі якого гелан, є ідеальним не тільки для росту мікроорганізмів, а і для вирощування рослинної тканини.

Висока чистота гелану та водоподібна прозорість гелів є суттєвими додатковими перевагами для використання у складі мікробіологічних середовищ. Гелан надзвичайно ефективний при низьких концентраціях до 0,1%, утворюючи при цьому тверді гелі. Вони готуються шляхом додавання електроліту (наприклад, сіль, кислота або аніонні ПАВ) до гарячого розчину гелану, а потім охолоджуються. Гелан, що використовується як 1 / 5 частина від використання

агару, є стійким до грибної цвілі, легко змивається з тканини рослини для пересадки, і дозволяє чітко спостерігати за розвитком коренів і тканин [17].

1.4.3. Медицина

Гелан використовується у фармацевтичних та біомедичних дослідженнях, таких як ген-терапія та трансфекція генів, тканинна інженерія, адгезія клітин, що загоюють рани. Полісахарид широко застосовується як білок-носії, біологічна сигналізація, керований матеріал для регенерації кісток, біоцид для профілактики поширення мікробних інфекцій [16].

За останнє десятиліття гелан успішно застосовується в ряді тканинної інженерії та регенераційної медицини. Будучи гідрогелем природного походження, а за хімічною будовою високогідратованим полімером, полісахарид є біосумісним, надає здатність імітувати позаклітинний матрикс, роблячи цей біоматеріал перспективним кандидатом для тканинної інженерії [30].

Плазмонна фототермічна терапія (ПФТТ) ракових клітин в даний час є одним з найбільш перспективних напрямків в діагностиці пухлин, лікуванні раку та інфекційних захворювань [21]. Суть її полягає в наступному: наночастинки золота (НЧЗ), що покриті геланом і мають максимум поглинання у видимій або ближній ІЧ-області (БІЧ) локально нагріваються при резонуванні зі світлом певною довжиною хвилі. Якщо НЧЗ розташовані всередині або навколо клітин-мішеней, то ці клітини руйнуються в результаті термічної денатурації [31].

Наностержні золота, покриті геланом, використовуються для внутрішньоклітинного введення ліків. Стратегія синтезу наностержнів золота полягає в тому, що спочатку отримують нанорозмірні сферичні частинки золота, потім їх вирощують у вигляді наностержня у присутності катіонного поверхнево активної речовини, наприклад, цетилтриметиламонію броміда (ЦТМАБ). На останній стадії наностержні покриваються гелем гелану. Показано, що НЧЗ, покриті геланом нетоксичні при культивуванні протягом 14 днів. При випробуваннях на мишах з використанням НЧЗ, оброблених геланом та БІЧ (час опромінення 5 хв) було виявлено, що ракова пухлина може повністю зникнути протягом 2-х місяців [21].

1.4.4. Фармацевтика

Диклофенак – це один із препаратів, який має викликає порушення в організмі людини з боку шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Під час перорального застосування, при проходженні першого етапу метаболізму диклофенак спричинює значні розлади ШКТ, так як має сильний і подразнювальний вплив на слизові оболонки [32].

Тому було проведено аналіз рідких гелей на основі геланової камеді. Реологічний аналіз препаратів показав, що можна отримати гель для місцевого застосування з в'язкістю та механічною міцністю, подібною до комерційної форми Гель Вольтарен® (діюча речовина в якому диклофенак) із використанням 1% (масова частка) суміші низько- і високоацетильованого гелану (LA / HA) 50:50. Змащення гелевих композицій гелану з високою швидкістю втирання були подібними до змащення гелем Вольтарен® [33, 34].

Застосування гелану різко збільшує проникнення шкіри у порівнянні з комерційно доступним складом і може бути контрольоване зміною концентрації полісахариду та / або концентрації іонів натрію. Це дослідження підкреслює потенційне використання рідких гелів, в яких можна легко регулювати фізичні властивості, придатні для місцевих рецептур з додатковою перевагою збільшення проникнення ліків [34].

Низькоацетильований гелан використовується як компонент твердих лікарських форм, як дезінтегруючий агент у таблетках з негайним вивільненням або, в більш високих концентраціях, ґрунтуючись на його здатності до набухання – як матриксоутворюючий наповнювач з уповільненим вивільненням [10].

Завдяки своїй властивості утворювати плівки гелан застосовують також для транспортування лікарських офтальмологічних засобів; як гелеутворювач у стоматологічному та особистому догляді, у загоюванні ран [1].

1.5. Характеристика товарних форм гелану

Полісахарид гелан комерційно доступний у двох формах:

- торгове найменування Gelrite™ (рис.1.2, а), що є відомим як високоацетильований гелан;
- торгова назва Kelcogel™ (рис.1.2, б), яка також відома як низькоацетильований гелан [16].

1.5.1. Gelrite™

Gelrite™ – це високоочищений природний гетерополісахарид, здатний до утворення стабільних агароподібних гелів. Однак у порівнянні з агаром кількості цього гетерополісахариду потрібно вдвічі менше. Gelrite™ був спеціально розроблений як гелеутворюючий агент для мікробіологічних поживних середовищ. Однак він може замінити агар і в інших галузях [35].

Гелі, приготовані за допомогою Gelrite™, більш прозорі у порівнянні з гелями, утвореними за допомогою агару. Gelrite™ не містить забруднюючих речовин (наприклад, фенольних сполук), що є токсичними для деяких чутливих організмів [36].

Переваги перед агаром:

- стабільна якість продукції;
- майже 100% відповідність від партії до партії;
- формує надзвичайно прозорі гелі;
- скорочує час підготовки, оскільки гелі формуються швидше;
- залишається стабільним навіть при високих температурах і тому ідеально підходить для термофільних мікроорганізмів;
- вказує на відсутність токсичних забруднень (наприклад, через феноли, виявлені в агарі);
- хімічно інертний по відношенню до більшості добавок у середовищах;
- стійкий до ферментативної деградації;
- не токсичний (немає ознак токсичності у щурів, які зазнали дози 5.000 мг/кг);

- дуже економічний у використанні [35].



а)



б)

Рис. 1.2. Товарні форми гелану: Gelrite™(а) [35]; Kelcogel™(б) [37].

1.5.2. Kelcogel™

Kelcogel F™ – низькоацильований тип гелану, призначений для виробництва продуктів харчування і засобів особистої гігієни [37]. Його здатність надавати текстуру, гелеутворення, термічна стабільність і утворення рідкого гелю робить його придатним для виготовлення кондитерських виробів і десертів, у тому числі й глазури та начинки, а також напоїв [38].

Kelcogel F™ гідратується у процесі нагрівання в молоці / воді при температурі понад 80°C з подальшим осадженням при охолодженні до температури 41°C. Повторне плавлення сформованого гелю можна здійснити при нагріванні до температури понад 70°C [37]. Дисперсія поліпшується (дозволяє додавати в гарячі розчини) змішуванням з цукром (3-5 разів), гліцерином, спиртом або оліями (3-5 разів); жорстка вода сприяє диспергуванню. Оптимальний рівень рН 4,0-10,0 [39].

Властивості:

- низька норма внесення;

- відмінна термічна стабільність;
- кришталева прозорість;
- відмінне вивільнення аромату;
- тонкий помел для поліпшення властивостей гідратації;
- сполучуваність з іншими гідроколоїдами;
- стабільність суспензій текучих гелів (плинність, перекачування, низька в'язкість в роті);
- високий ступінь сумісності з білком [40].

Галузь застосування:

- холодець;
- начинки для хлібобулочних виробів;
- напої / текучі гелі;
- кондитерські вироби;
- молочні продукти;
- десертні холодці;
- джеми та конфітюри;
- панірування;
- сухі суміші хлібобулочних виробів;
- глазури;
- плодово-ягідні наповнювачі;
- засоби особистої гігієни [37].

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІО-ЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) представляють собою численну і важливу групу сполук, які можуть продукуватися бактеріями, грибами і водоростями. Біотехнологічне виробництво цих речовин є більш швидкою альтернативою у порівнянні з хімічним виробництвом і виробництвом рослинного походження із можливим використанням промислових відходів в якості субстратів, здійсненою стратегією після всебічного вивчення факторів, які можуть вплинути на синтез обраним мікроорганізмом бажаного кінцевого продукту [1].

Утилізація промислових відходів для отримання ЕПС вирішить не лише проблему накопичення вторинної сировини, але також зменшить витрати на біосинтез практично цінних метаболітів. Крім того, деякі види відходів мають ряд переваг порівняно з традиційними вуглеводними субстратами: є корисними для навколишнього середовища і здоров'я, а також можуть містити фактори росту [41].

Дані, наведені у табл. 2.1, свідчать, що найбільшу кількість гелану синтезують *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388 (52,6 г/л), *S. azotifigens* GL-1 (33,75 г/л) та *S. paucimobilis* ATCC 31461 (23,88 г/л), проте тривалість культивування штамів і склад поживних середовищ є різним. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента слід розрахувати вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів гелану (табл. 2.2).

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>		
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>				<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>					16	97
<i>Н. конто</i>					<i>Кафедра БТМ 18</i>		
<i>Консильт</i>							
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>						
					<i>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІО-ЛОГІЧНОГО АГЕНТА</i>		

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, середовище для культивування *S. yabuuchiae* GI:724472388 є майже у 3 та 5 разів дешевшим, ніж для *S. azotifigens* GL-1 і *S. paucimobilis* ATCC 31461 відповідно. Проте тривалість культивування штамів *S. azotifigens* GL-1 є нижчою, ніж *S. paucimobilis* ATCC 31461.

Особливості одержання гелану різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація гелану, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GI:724472388	Гліцерин технічний NH ₄ Cl Na ₂ HPO ₄ NaCl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ CaCl ₂	80 1 6 5 3 0,12 0,011	144	52,6	Культивування у колбах об'ємом 250 мл із 100 мл середовища на качалці (t° = 34°C; n = 200 об/хв, pH = 7,0).	Ragunandan K., Kumar A., Kumar S., Permaul K., Singh S. Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by <i>Sphingomonas spp.</i> <i>3 Biotech.</i> 2018, 8 (1): 71. doi: 10.1007 / s13205-018-1096-3.
<i>Sphingomonas azotifigens</i> GL-1	Сирна сироватка глюкоза Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NH ₄ Cl NaCl MgSO ₄ ·7H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O ZnCl ₂ MnCl ₂ ·4H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O CuCl ₂ ·2H ₂ O	68,34 20 14,58 7,66 1 0,5 0,246 0,015 0,17 0,1 0,06 0,06 0,043	48	33,75	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 50 мл середовища на качалці (t° = 30°C; n = 200 об/хв).	Wang D., Kim H., Lee S., Kim D.-H., Joe M.-H. Improved gellan gum production by a newly-isolated <i>Sphingomonas azotifigens</i> GL-1 in a cheese whey and molasses based medium. <i>Process Biochemistry.</i> 2020: 269–278. doi: 10.1016/j.procbio.2020.02.020.

Закінчення табл. 2.1

<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461	Сахароза дріжджовий екстракт пептон KH ₂ PO ₄ K ₂ SO ₄ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O	30 1 2 3 1 1 1	60	23,88	Культивування у ферментері об'ємом 5 л з робочим об'ємом 3 л (t° = 30°C; n = 200 об/хв). Внесення H ₂ O ₂ через 6 год і 12 год (0,068 г/л), 18 год (0,102 г/л), 24 год (0,136 г/л).	Zhu G., Sheng L., Tong Q. Enhanced gellan gum production by hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) induced oxidative stresses in <i>Sphingomonas paucimobilis</i> . <i>Bioprocess Biosyst Eng.</i> 2013, 37 (4): 743–748. doi: 10.1007 / s00449-013-1030-3.
<i>Sphingomonas elodea</i> ATCC 31461 (pβGN)	Глюкоза дріжджовий екстракт казамінова кислота Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ K ₂ SO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O CaCl ₂ FeSO ₄ ·7H ₂ O	20 1 1 10 3 1 0,2 0,01 0,001	72	17,5	Культивування у колбах об'ємом 500 мл з 100 мл середовища на качалці (t° = 30°C; n = 150 об/хв).	Lee S. Y., Ahn J.-Y., Kim M., Sekhon S. S. Phenotypic and proteomic analysis of positively regulated gellan biosynthesis pathway in <i>Sphingomonas elodea</i> . <i>Animal Cells and Systems.</i> 2017, 21(2): 115–123. doi: 10.1080/19768354.2017.1290678.
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ZJUT 1008	Глюкоза кукурудзяний екстракт сечовина MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ K ₂ SO ₄ Triton X-100	33,75 10 2,5 1,08 3,24 1 0,75	48	14,41	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 50 мл середовища на качалці (t° = 28°C; n = 220 об/хв).	Huang J., Zhu S., Li C., Zhang C., and Ji Y. Cost-effective optimization of gellan gum production by <i>Sphingomonas paucimobilis</i> using corn steep liquor. <i>Preparative Biochemistry & Biotechnology.</i> 2019, 50(2):191–197. doi: 10.1080/10826068.2019.1692215.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів гелану

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GI:724472388	Гліцерин технічний	80 (0,068 л)	5 (грн/л)	0,34	1
	NH ₄ Cl	1	16,5	0,0165	2
	Na ₂ HPO ₄	6	78	0,468	3
	NaCl	5	3,4	0,017	4
	KH ₂ PO ₄	3	50	0,15	4
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12	14	0,00168	4
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,011	48	0,000528	4
Вартість 1 л середовища – 0,994 грн					
<i>Sphingomonas azotifigens</i> GL-1	Сирна сироватка (суха)	68,34	11	0,75174	5
	глюкоза	20	23	0,46	4
	Na ₂ HPO ₄	14,58	78	1,13724	3
	KH ₂ PO ₄	7,66	50	0,383	4
	NH ₄ Cl	1	16,5	0,0165	2
	NaCl	0,5	3,4	0,0017	4
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,246	14	0,003444	4
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,015	9,066	0,00013599	6
	ZnCl ₂	0,17	48	0,00816	4
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,1	128	0,0128	3
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,06	1020	0,0612	4
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,06	788	0,04728	4
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,043	250	0,01075	3
Вартість 1 л середовища – 2,89 грн					
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461	Сахароза	30	66	1,98	4
	дріжджовий екстракт	1	1100	1,1	4
	пептон	2	750	1,5	4
	KH ₂ PO ₄	3	50	0,15	4
	K ₂ SO ₄	1	20	0,02	3
	K ₂ HPO ₄	1	41	0,041	3
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	14	0,014	4
	H ₂ O ₂	0,374	22	0,008228	3
Вартість 1 л середовища – 4,81 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на січень 2021 р. 1 – https://biodizel.at.ua/index/raschet_sebistoimosti_biodizelj/0-13, 2 – <https://snabhim.com.ua/>, 3 – www.kiev.flagma.ua, 4 – <http://prom.ua>, 5 – <https://agro-ukraine.com/ua/>, 6 – <https://russian.alibaba.com/>.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г гелану, синтезованого на різних поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація гелану, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного гелану за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GI:724472388	52,6	144	0,365	0,994	0,019
<i>Sphingomonas azotifigens</i> GL-1	33,75	48	0,703	2,89	0,086
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461	23,88	60	0,398	4,81	0,201

Тому для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розраховуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що кількість утвореного гелану за 1 год є найвищою у *S. azotifigens* GL-1 (0,703 г/год), але умовна вартість гелану, синтезованого штамом *S. yabuuchiae* GI:724472388, є найнижчою (0,019 грн/г).

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування штаму *Sphingomonas yabuuchiae* – продуцента гелану

Тривалість культивування 144 год, концентрація гелану в культуральній рідині становить 52,6 г/л, а концентрація біомаси – 5,8 г/л [11].

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення

Потреби для синтезу гелану. Як джерело вуглецю для одержання гелану використовуються відходи виробництва біодизелю, а саме – гліцерин. Розрахуємо, скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 52,6 г гелану. Молекулярна маса гелану становить близько 500 кДа [16], тому розрахувати точний вміст

Карбону у молекулі цього полісахариду (так само, як і інших полімерів вуглеводної природи) неможливо. Тому приймаємо, що вміст Карбону у гелані становить 50% (як у складі практично всіх органічних сполук) – $52,6 \times 0,5 = 26,3$ г.

Далі розрахуємо, у скількох грамах гліцерину міститься 26,3 г Карбону. Молекулярна маса гліцерину ($C_3H_8O_3$) – 92. У 92 г гліцерину міститься 36 г Карбону, а 26,3 г Карбону міститься у $(26,3 \times 92) / 36 = 67,2$ г гліцерину. Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на гліцерині близько 40% субстрату окислюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст гліцерину у середовищі становитиме $(67,2 \times 0,4) + 67,2 = 94,1$ г/л.

Оскільки вміст гліцерину у відходах виробництва біодизелю становить 64% [42], то для одержання 52,6 г гелану, вміст відходів у середовищі повинен бути $(94,1 \times 100) / 64 = 147$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 5,8 г біомаси [11] становить $5,8 \times 0,5 = 2,9$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(2,9 \times 92) / 36 = 7,4$ г гліцерину. Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 5,8 г біомаси у середовище необхідно внести $(7,4 \times 0,4) + 7,4 = 10,4$ г/л гліцерину.

У перерахунку на відходи виробництва біодизелю одержимо 16,3 г/л.

Отже, загальний вміст відходів виробництва біодизелю, необхідний для синтезу біомаси (5,8 г/л) та гелану (52,6 г/л), становить $147 + 16,3 = 163,3$ г/л.

Згідно [11] концентрація відходів виробництва біодизелю у середовищі культивування продуцента гелану – 80 г/л, тобто удвічі менше за розраховану нами концентрацію. На нашу думку, це може бути зумовлене такими причинами:

1) **завищена концентрація гелану**, оскільки методика визначення передбачала кип'ятіння культуральної рідини, охолодження, доведення до рН 10, центрифугування, осадження ізопропанолом. За таких умов відбувається руйнування клітини, в результаті якого вивільнюються високомолекулярні внутрі-

шньоклітинні полімери (полісахариди, білки, нуклеїнові кислоти), які також осаджуються цим розчинником. Разом з полісахаридом можуть співосаджуватися й солі, що залишилися у культуральній рідині (це близько 10 г/л, див. табл. 2.1, фосфати, хлористий натрій)

2) у статті не наведено склад використовуваних відходів виробництва біодизелю, тому цілком ймовірно, **що вміст гліцерину у відходах був вищим за 64 %**, які було використано у наших розрахунках;

3) у складі відходів виробництва біодизелю, крім гліцерину, містяться **спирти (етанол, метанол), тригліцериди, вільні жирні кислоти, які також можуть використовуватися як ростові субстрати.**

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 5,8 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 0,58 г. Продуцент гелану асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) Нітроген. Для одержання гелану в промислових умовах використовується середовище, яке містить як джерело мінерального Нітрогену хлорид амонію – NH_4Cl .

Розрахуємо кількість хлориду амонію, необхідну для одержання 5,8 г/л біомаси. Молекулярна маса NH_4Cl становить 53,5. Отже, у 53,5 г хлориду амонію міститься 14 г Нітрогену (N), тоді 0,58 г Нітрогену буде міститись у $(53,5 \times 0,58) / 14 = 2,2$ г солі. Для одержання 5,8 г/л біомаси вміст NH_4Cl у середовищі культивування повинен становити 2,2 г/л.

Згідно [11] концентрація хлориду амонію у середовищі культивування *S. uabuiichiae* GI:724472388 становить всього 1 г/л, що недостатньо для синтезу 5,8 г/л біомаси. На нашу думку, причини, що зумовлюють різницю в концентрації джерела азоту у середовищі культивування такі самі, як і причини невідповідності вмісту ростового субстрату.

Розрахунок вмісту Фосфору у середовищі

У біомасі міститься близько 3 % Фосфору (за елементом P). Отже, для синтезу 5,8 г/л біомаси вміст Фосфору у середовищі повинен становити $5,8 \times$

0,03 = 0,174 г/л. Джерелами Фосфору у промисловому виробництві гелану є од-
нозаміщений Калій та двозаміщений Натрій фосфорнокислий – KH_2PO_4 і
 Na_2HPO_4 , які вносяться у середовищі у співвідношенні 1:1.

Вміст Фосфору у Na_2HPO_4 становить $31 / 142 = 22 \%$, а у KH_2PO_4 – $31 / 136 = 23 \%$. Отже, у KH_2PO_4 міститься у $23 / 22 = 1,05$ рази більше Фосфору,
ніж у Na_2HPO_4 . Прийнемо вміст Фосфору (P) у Na_2HPO_4 за 1 (одиницю), тоді
вміст P у KH_2PO_4 буде 1,05. Отже, можемо записати $2,05 \times x = 0,174$, звідки $x \approx$
0,085.

Таким чином, вміст P у вигляді Na_2HPO_4 становить 0,085 г/л, а у вигляді
 KH_2PO_4 – $0,085 \times 1,05 \approx 0,089$ г/л. Відповідно, концентрація цих солей у сере-
довищі становить $(142 \times 0,085) / 31 = 0,39$ г/л та $(136 \times 0,089) / 31 = 0,39$ г/л.

Таким чином, розрахунки показали, що для синтезу гелану і біомаси дос-
татньо значно нижчої концентрації фосфорних солей у середовищі культиву-
вання *S. yabuuchiae* GI:724472388, ніж наведено у статті [11]. Ми припускаємо,
що високий вміст Na_2HPO_4 і KH_2PO_4 (6 і 3 г/л відповідно) необхідний для ство-
рення у середовищі достатньо ємного буфера для підтримання рН у процесі ку-
льтивування продуцента.

Інші компоненти середовища

Джерелами таких необхідних для росту бактерій елементів, як Натрій,
Кальцій, Хлор, Магній та Сульфур є солі хлориду натрію (NaCl), хлориду каль-
цію (CaCl_2) та сульфату магнію (MgSO_4), які не можуть лімітувати ріст проду-
цента гелану (як і інших мікроорганізмів), оскільки зазвичай вносяться у сере-
довище у надлишку.

Скоригований після перевірного розрахунку склад поживного середо-
вища для біосинтезу гелану штамом *S. yabuuchiae* GI:724472388 наведено у
табл. 2.4.

Склад поживного середовища для культивування продуцента гелану

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л
Відходи виробництва біодизелю	163,3
NH ₄ Cl	2,2
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Бактерії *Sphingomonas yabuuchiae* – це паличкоподібні клітини із заокругленими кінцями, довжиною 1 – 4 мкм та діаметром 0,5 мкм. Бактерії грамнегативні, нерухомі, спори не утворюють, здатні до утворення капсули [43, 44].

Після поверхневого культивування штаму *S. yabuuchiae* на триптоказеїновому соєвому агарі отримують насичено- або темно-жовті, круглі та гладкі колонії (рис. 2.1) [43].

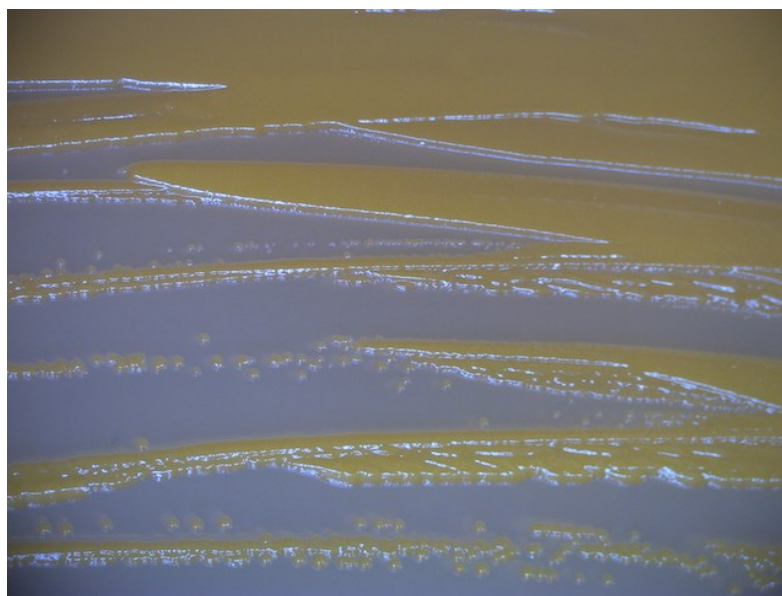


Рис. 2.1. Колонії *S. yabuuchiae* на чашці із трипто-казеїновим соєвим агаром через 2 дні при 30 °С [45]

S. yabuuchiae є аеробом, здатним до росту і розмноження у діапазоні температури від 30 до 37 °С, оптимальна температура становить 30 °С (мезофіл) [44]. Бактерії здатні рости при рН 6,0 – 8,0, оптимальний рН 7,0 (нейтрофіл) [11].

Як субстрат *S. yabuuchiae* може використовувати гліцерин, крохмаль і твін 80; не гідролізує желатин та орнітин. Не знижує рівень нітратів. Зброджує L-арабінозу, целобіозу, фруктозу, галактозу, глюконат, глюкозу, лактозу, мальтозу, манозу, мелібіозу, рафінозу, сахарозу та трегалозу; не зброджує адоніт, інозитол, маніт, рамнозу або сорбіт. Каталазна активність позитивна [43, 44].

2.5. Таксономічний статус біологічного агента

Рід *Sphingomonas* був вперше запропонований дослідником Yabuuchi (1990 р.) та віднесений до сімейства *Sphingomonadaceae* з класу *Alphaproteobacteria*. Таку назву рід отримав через наявність унікальних сфінгогліколіпідів у ліпідному складі клітин. Згодом рід був розділений на чотири роди: *Sphingomonas sensu stricto* (кластер I), *Sphingobium* (кластер II), *Novosphingobium* (кластер III) та *Sphingopyxis* (кластер IV), на основі послідовностей генів 16S рРНК та поліамінних моделей. Однак Yabuuchi та співавтори показали, що жодна з фізіологічних та біохімічних характеристик не підтримує поділ роду *Sphingomonas*, включаючи клітинні ліпіди та жирні кислоти. Тому назва роду збереглася лише для представників кластеру I [46, 47].

Сучасна (філогенетична) класифікація для *S. yabuuchiae* GI:724472388 наведена згідно LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [44]:

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Alphaproteobacteria*

Порядок – *Sphingomonadales*

Родина – *Sphingomonadaceae*

Рід – *Sphingomonas*

Вид – *Sphingomonas yabuuchiae*

Штам – *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреби населення України у гелані для лікування захворювань шкіри

Гелан має регульовану еластичність і твердість, а також високий коефіцієнт пропускання, що дозволяє матеріалу легко змінити форму та мати безліч різних застосувань [16]. Екзополісахарид (ЕПС) використовується, як загусник, сполучна речовина та стабілізатор у різних харчових продуктах [4]. Завдяки його здатності до набухання, утворення міцних і прозорих гелей та безпечності у використанні саме низькоацильована форма гелану знаходить застосування у медицині та косметичі (лосьйони, тонери) [10].

Акне (вугрі) – поліморфний мультифакторний дерматоз, що виникає в результаті гіперпродукції і дисбалансу ліпідів секрету сальних залоз, фолікулярного гіперкератозу зі звуженням проток сальних залоз, розмноженням бактерій і розвитком запалення [48]. Вугрова хвороба – це одне з найпоширеніших дерматологічних захворювань в світі, що охоплюють близько 85-90% населення земної кулі. Акне страждають близько 90% підлітків (12-21 рік), на вік старше 21 років припадає 85% [49].

Сучасні підходи до лікування акне включають призначення різних системних і зовнішніх препаратів, що впливають на ланки патогенезу: гіперсекрецію шкірного сала, фолікулярний гіперкератоз, розмноження *Propionibacterium acnes* та інших мікроорганізмів, запалення в дермі [48].

Для лікування вугрової хвороби широко використовуються антибактеріальні препарати. Вони пригнічують ріст і розвиток *P. acnes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, а також змінюють якість епідермальних ліпідів, виявляють протизапальний ефект, надають антиоксидантну дію. Однак у багатьох штамів мікроорганізмів розвивається резистентність до антибактеріальних препаратів.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркциш</i>	<i>Аркцишів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Парфенюк М.А.</i>					27	97
<i>Керівник</i>		<i>Пирог Т.П.</i>						
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ 29</i>		

Крім того, тривале місцеве або пероральне застосування антибіотиків призводить до збільшення захворюваності на інфекції верхніх дихальних шляхів [50].

При більш легких формах захворювання, як правило, достатньо застосування лікувальної косметики. З її допомогою здійснюється щоденний догляд за шкірою, схильної до вугрового висипу: її очищення, тонізація і зволоження. Склад цих засобів включає компоненти на водній основі, що не володіють камедогенною дією і не викликають алергічного ефекту. Косметика дозволяє звужити пори, очистити їх від надлишків шкірного сала і прибрати чорні точки на шкірі [9].

Базовий догляд за шкірою грає істотну роль як при лікуванні акне на будь-якій стадії захворювання, так і для підтримки ремісії. Сучасний догляд за будь-яким типом шкіри повинен включати: очищення і адекватне зволоження, а також фотопротекцію, лікувальна косметика повинна бути безпечною і застосовуватися тривало [48, 49].

Станом на 1 січня 2021 року загальна чисельність населення України становила 41,4 млн осіб (дані Державної служби статистики України <http://www.ukrstat.gov.ua/>). Загальна ж чисельність жінок від даної кількості осіб складає близько 53,6 %, тобто 22,2 млн осіб.

Оскільки постає проблема запалень шкіри та акне, частина жінок (приблизно 40%) віком від 15 до 30 років використовує косметичні засоби для її усунення. До таких засобів відносять тонери і тоніки. Серед загальної кількості жінок України дана вікова категорія складає приблизно 15,5 %, тобто 3 446 789 млн осіб, а тонерами ж користуються близько 1 378 716 млн жінок.

3.2. Розрахунок потужності виробництва тонерів для лікування захворювань шкіри

У даний час на косметичному ринку України можна побачити протизапальні тоніки таких виробників: Weleda, Juvena (Швейцарія); The Ordinary (Канада); Babe (Іспанія); Vichy, La Roche-Posay, Academie, Garnier (Франція); Lumene (Фінляндія); Вітекс (Білорусь); It's Skin, Pyunkang Yul, Genosys, Isoi (Корея);

ECO Laboratorie (Росія); Biotrade (Болгарія); Lynia, Bielenda, Norel, Avon, APIS Professional, Denova Home, Pharmaceris, Kire Skin, Dermedic, Barwa, Sylveco (Польща); Dr. Kadir, Christina (Ізраїль); Amore, VitaminClub, Hillary, Green Pharm Cosmetic (Україна) та ін.

Перелік найпопулярніших тонерів і тоніків в Україні представлено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Перелік найпопулярніших тонерів і тоніків в Україні

Тонер/тонік	Країна виробник	Об'єм	Ціна
Гліколевий тонер / тонік (The Ordinary)	Канада	240 мл	464 грн
Тонік для очищення, звужує пори (Vichy)	Франція	200 мл	407 грн
Тонік для проблемної шкіри з проявами акне (VitaminClub)	Україна	150 мл	230 грн
Заспокійливий тонік для обличчя (La Roche-Posay)	Франція	200 мл	486 грн
Дерматологічний анти-акне тонік (Bielenda)	Польща	250 мл	137 грн
Антибактеріальний протигрибковий тонік з цинковою для лікування проблемної шкіри (Amore)	Україна	150 мл	140 грн
Антибактеріальний тонік для шкіри з акне (Denova Home)	Польща	200 мл	486 грн
Загоюючий тонік для обличчя (Genosys)	Корея	200 мл	885 грн
Антибактеріальний тонік для шкіри з ознаками акне (Norel)	Польща	500 мл	708 грн
Тонік для жирної і проблемної шкіри (Hillary)	Україна	200 мл	400 грн
Тонер, що загоює для проблемної шкіри (Pyunkang Yul)	Корея	150 мл	232 грн
Тонік для обличчя "Анти-акне" (Lynia)	Польща	150 мл	238 грн

На сьогоднішній день в Україні достатньо мала частина виробників, які використовують у виробництві тоніків тільки органічну сировину, не використовуючи синтетичних поверхнево-активних речовин, стабілізаторів чи емульгаторів, які можуть бути шкідливими для організму людини. Застосування гелану

вітчизняними виробниками одночасно як стабілізатора та гелеутворювача ще не було, а проблема акне усе ще залишається актуальною, тому розробка повного процесу виробництва тоніку на території України є більш ніж доцільною.

Близько 80 – 90 % косметичного ринку України складають імпортні продукти, тому для початку ми можемо забезпечити частину, що залишилася, тобто 10 %. Визначаємо теоретичну кількість жінок, що можуть скористатися нашим тонером:

$$1\,378\,716 \cdot 0,1 = 137\,872 \text{ осіб}$$

Враховуючи, що на рік для 1 жінки потрібно приблизно 1,5 л тонера, то на загальну кількість жінок потрібно

$$137\,872 \cdot 1,5 = 206\,808 \text{ л}$$

Розраховуємо масу діючої речовини на 1 рік для всіх жінок. На один рік потрібно 1,5 л тонера. В одній баночці з тонером 240 мл міститься 2 % гелану [8], тобто 20 г ЕПС міститься в 1 л тонера. Отже, на курс потрібно:

$$G_{гп} = 206\,808 \cdot 20/1 = 4\,136\,160 \text{ г} = 4,14 \text{ тонн/рік}$$

Отже, для забезпечення фармацевтичного ринку України косметичним засобом, необхідно отримувати 4,14 т сухого екзополісахариду в рік.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера для біосинтезу полісахариду гелану

Потужність нашого виробництва гелану становить $G_{гп} = 4140 \text{ кг/рік}$. Субстанцію гелану отримують сухою із залишковою вологою $W = 5-10 \%$, отже сухої речовини в продукті буде $CP = 0,9-0,95$ (частка). Продуцент – *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388 синтезує 52,6 г гелану на 1 л культуральної рідини [11].

Плануємо, що вибрану кількість субстанції будемо виробляти за $T_{рд} = 60$ робочих трудоднів. Кількість циклів на рік становить:

$$N_{цк} = 24 \cdot T_{рд} / T_{цф} = 24 \cdot 60 / 151,5 = 9,5, \text{ а отже } 10 \text{ циклів,}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (144 год) та час підготовки ферментера до роботи (7,5 год): миття та огляд апарата (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів (0,5 год),

стерилізація апарату (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

Кількість продукту за цикл складає:

$$G_{цк} = G_{нт}/N_{цк} = 4140/10 = 414 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один цикл, із врахуванням сумарних втрат цільового продукту при виділенні (20 %):

$$V_{кр.} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{гп} / R_{кр}(1-E_{св}) = 1,1 \cdot 414 \cdot 0,95 / (52,6 \cdot (1-0,2)) = 10,3 \text{ м}^3,$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Отже, за виробничий цикл отримують $V_{кр} = 10,3 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

$10,3 \text{ м}^3$ культуральної рідини ($V_{кр}$) можна отримати у ферментері, робочий об'єм якого має становити:

$V_{г} = V_{кр} / (1-E_{ф}) = 10,3 / (1-0,1) = 11,4 \text{ м}^3$, де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Можливий геометричний об'єм ферментера при $K_3 = 0,65$

$$V_{мф} = V_{рф} / K_3 = 11,4 / 0,65 = 17,54 \text{ м}^3$$

У таблиці знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{ф} = 20 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$K_{зф} = V_{кр} / V_{ф} = 11,4 / 20 = 0,57 - \text{не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу для біосинтезу полісахариду гелану *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у ферментері буде складати:

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 11,4 / (1 + 0,1) = 10,4 \text{ м}^3$, де $X_{ф} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 11,4 - 10,4 = 1 \text{ м}^3$.

Для одержання 1 м^3 інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 1 / (1 - 0,1) = 1,1 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у посівному апараті буде складати:

$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{па}) = 1,1 / (1 + 0,1) = 1 \text{ м}^3$, де $X_{па} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить $V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 1,1 - 1 = 0,1 \text{ м}^3$ або 100 л.

Кількість інокуляту $V_{роб.2} = 1,1 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{па2} = V_{роб.2} / K_{зап} = 1,1 / 0,6 = 1,8 \text{ м}^3$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 2 \text{ м}^3$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап2} = V_{роб.2} / V_{сф} = 1,1 / 2 = 0,55.$$

Для одержання 100 л інокуляту в інокуляторі враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1 - E_{ін}) = 100 / (1 - 0,1) = 111,1 \text{ л}.$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища у посівному апараті буде складати:

$V_{пс3} = V_{роб.3} / (1 + X_{ін}) = 111,1 / (1 + 0,1) = 101$ л, де $X_{ін} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить $V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 111,1 - 101 = 10,1$ л.

Кількість інокуляту $V_{роб.3} = 111,1$ л можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{ін3} = V_{роб.3} / K_{зап} = 111,1 / 0,6 = 185,2$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,2$ м³, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап3} = V_{роб.3} / V_{сф} = 111,1 / 200 = 0,56.$$

Для одержання 10,1 л посівного матеріалу в малому інокуляторі враховуємо втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу у посівному апараті становитиме:

$$V_{роб.4} = V_{пм3} / (1 - E_{ін}) = 10,1 / (1 - 0,1) = 11,2$$
 л.

Кількість посівного матеріалу (доза) для малого інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища.

Тоді кількість поживного середовища в малому інокуляторі буде складати:

$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1 + X_{ін}) = 11,22 / (1 + 0,1) = 10,2$ л, де $X_{ін} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для малого інокулятора.

Кількість посівного матеріалу становить $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 11,22 - 10,2 = 1,02$ л.

Кількість інокуляту $V_{роб.4} = 11,22$ л можна одержати під час культивування бактерій в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{ін4} = V_{роб.4} / K_{зап} = 11,22 / 0,6 = 18,7$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,02$ м³, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап4} = V_{роб.4} / V_{сф} = 11,22 / 20 = 0,56.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{пм4}} = 1,02$ л можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 1020 / (750 \cdot 0,2) = 6,8.$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 7 качалочних колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу гелану у ферментері об'ємом 20 м^3 зі змінним коефіцієнтом заповнення (початковий – 0,6, а кінцевий – 0,65, оскільки у процесі культивування двічі здійснюється внесення субстрату) буде проходити у чотири етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу гелану *S. uabuiuchiae* GI:724472388 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом 20 м^3 , один інокулятор об'ємом 2 м^3 , один інокулятор об'ємом 200 л і один інокулятор об'ємом 20 л.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шлях катаболізму ростового субстрату біологічним агентом

Ростовим субстратом для біосинтезу гелану за допомогою *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388 є відходи виробництва біодизелю [11]. Оскільки 64% відходів складає гліцерин [42], то катаболізм розпочинається саме із цієї сполуки.

Так як у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [52] відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388, тому для побудови шляху метаболізму гліцерину обираємо близькоспоріднені мікроорганізми *Sphingomonas koreensis* та *Sphingomonas paucimobilis* [52].

Згідно з KEGG катаболізм гліцерину у *S. koreensis* [53] відбувається шляхом перетворення ростового субстрату у D-гліцеральдегід, який згодом перетворюється у D-гліцерат за допомогою ферменту альдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.3). Потім D-гліцерат за рахунок ферменту D-гліцерат-3-кінази (КФ 2.7.1.31) перетворюється у 3-фосфо-D-гліцерат, який далі піддається перетворенню у 2-фосфо-D-гліцерат за допомогою фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.11).

Згідно з KEGG подальший метаболізм у *S. paucimobilis* [54] проходить із залученням 2-фосфо-D-гліцерату до гліколізу і перетворенням його на фосфоенолпіруват (ФЕП) за рахунок дії енолази (КФ 4.2.1.11), а ФЕП у свою чергу перетворюється за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40) на піруват, який згодом під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>						35	97
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>					<i>Кафедра БТМ 37</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Схему катаболізму гліцерину наведено на рис. 4.1 [53, 54].

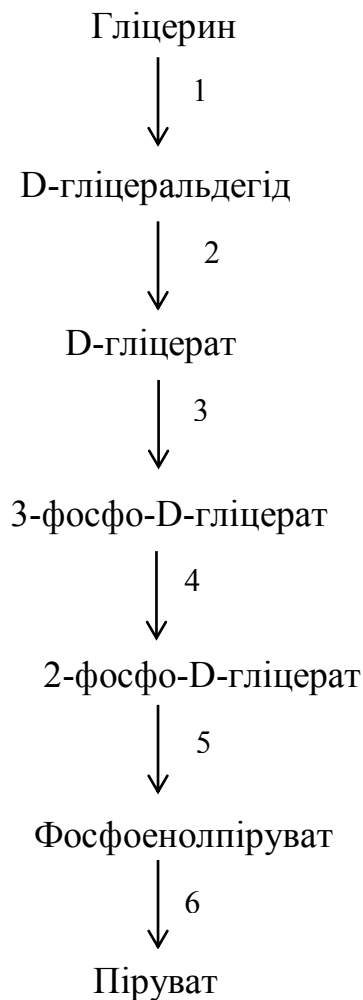


Рис. 4.1. Катаболізм гліцерину у *S. koreensis* і *S. paucimobilis* згідно з KEGG [53, 54] **Ферменти:** 1 – алкогольдегідрогеназа (КФ 1.1.1.2); 2 – альдегіддегідрогеназа (КФ 1.2.1.3); 3 – D-гліцерат-3-кіназа (КФ 2.7.1.31); 4 – фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 5 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 6 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Під час росту *S. yabuuchiae* GI:724472388 з використанням відходів виробництва біодизелю, внаслідок катаболізму гліцерину, утворюється піруват, який згодом під дією ферредоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [55].

Так як у KEGG [52] відсутня інформація про шляхи біотрансформації ростового субстрату у штаму *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388, тому для

побудови шляху подальшого метаболізму обираємо близькоспоріднені мікроорганізми *Sphingomonas paucimobilis* та *Sphingomonas sp.* ММ-1 [52].

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення інтермедіату ЦТК – оксалоацетату при рості на гліцерині є реакції гліюксилатного циклу, що каталізуються такими ферментами як ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1), малатсинтетаза (КФ 2.3.3.9), малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37) [56].

Для того, щоб утворилися ФЕП, 3-фосфогліцерат, фруктозо-6-фосфат і глюкозо-6-фосфат, потрібно, щоб функціонували реакції гліюконеогенезу, ключовим ферментом якого є фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49), під дією якого оксалоацетат перетворюється на ФЕП [54].

Гелан – полісахарид, що утворюється полімеризацією УДФ-глюкози, УДФ-глюкуронової кислоти і ГДФ-рамнози.

Згідно з KEGG глюкозо-6-фосфат у *S. paucimobilis* [54, 57] піддається перетворенню у глюкозо-1-фосфат за допомогою ферменту фосфогліюкомутази (КФ 5.4.2.2). Далі глюкозо-1-фосфат перетворюється під дією глюкозо-1-фосфатуридилтрансферази (УТФ) (КФ 2.7.7.9) на УДФ-глюкозу, яка згодом згідно з KEGG у *Sphingomonas sp.* ММ-1 [58] піддається перетворенню на УДФ-глюкуронову кислоту за рахунок дії УДФ-глюкозо-6-дегідрогенази (КФ 1.1.1.22).

Згідно з KEGG фруктозо-6-фосфат у *S. paucimobilis* [59] у свою чергу за допомогою манозо-6-фосфатізомерази (КФ 5.3.1.8) перетворюється на манозо-6-фосфат, що згодом перетворюється на манозо-1-фосфат під дією ферменту фосфоманомутази (КФ 5.4.2.8). Потім манозо-1-фосфат перетворюється за допомогою манозо-1-фосфатгуанілілтрансферази (КФ 2.7.7.13) на ГДФ-манозу, яка далі піддається перетворенню під дією дегідро-D-рамнозоредуктази (КФ 1.1.1.187) на ГДФ-рамнозу.

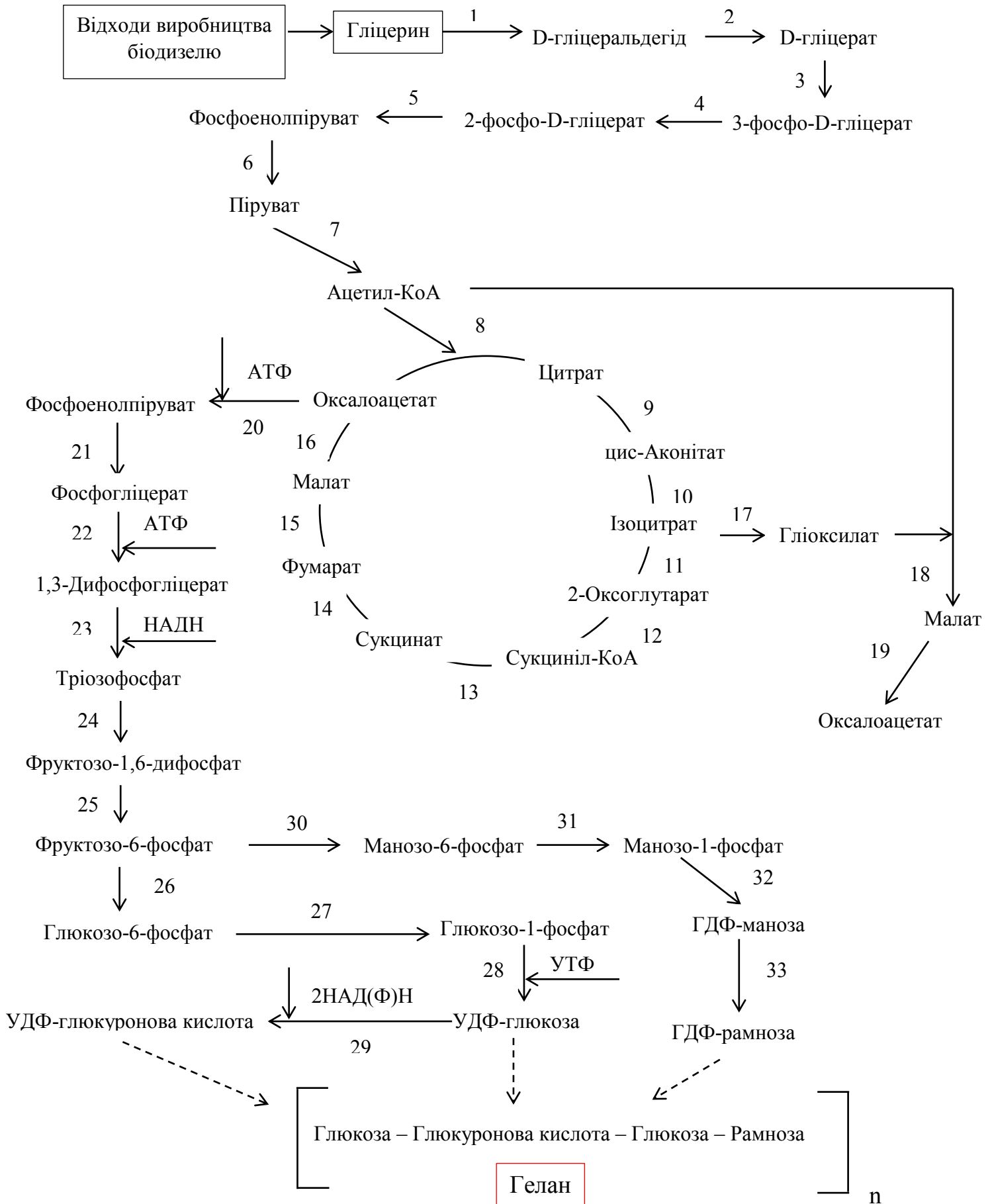


Рис. 4.2. Схема біотрансформації відходів виробництва біодизелю *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388 у гелан

Ферменти:

1. КФ 1.1.1.2 Алкогольдегідрогеназа
2. КФ 1.2.1.3 Альдегіддегідрогеназа
3. КФ 2.7.1.31 D-гліцерат-3-кіназа
4. КФ 5.4.2.11 Фосфогліцератмутаза
5. КФ 4.2.1.11 Енолаза
6. КФ 2.7.1.40 Піруваткіназа
7. КФ 1.2.7.11 Фередоксиноксидоредуктаза
8. КФ 2.3.3.1 Цитратсинтетаза
9. КФ 4.2.1.3 Аконітатгідратаза
10. КФ 4.2.1.3 Аконітатгідратаза
11. КФ 1.1.1.42 Ізоцитратдегідрогеназа
12. КФ 2.3.1.61 2-Оксоглутаратдегідрогеназа
13. КФ 6.2.1.5 Сукциніл-КоА-синтетаза
14. КФ 1.3.5.1 Сукцинатдегідрогеназа
15. КФ 4.2.1.2 Фумаратгідратаза
16. КФ 1.1.1.37 Малатдегідрогеназа
17. КФ 4.1.3.1 Ізоцитратліаза
18. КФ 2.3.3.9 Малатсинтетаза
19. КФ 1.1.1.37 Малатдегідрогеназа
20. КФ 4.1.1.49 Фосфоенолпіруваткарбоксікіназа
21. КФ 5.4.2.11 Фосфогліцератфосфомутаза
22. КФ 2.7.2.3 Фосфогліцераткіназа
23. КФ 1.2.1.12 Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
24. КФ 4.1.2.13 Фруктозодифосфатальдолаза
25. КФ 3.1.3.11 Фруктозодифосфатаза
26. КФ 5.3.1.9 Глюкозо-6-фосфатізомераза
27. КФ 5.4.2.2 Фосфоглюкомутаза
28. КФ 2.7.7.9 Глюкозо-1-фосфатуридилтрансфераза
29. КФ 1.1.1.22 УДФ-глюкозо-6-дегідрогеназа

- 30. КФ 5.3.1.8 Манозо-6-фосфатізомераза
- 31. КФ 5.4.2.8 Фосфоманомутаза
- 32. КФ 2.7.7.13 Манозо-1-фосфатгуанілілтрансфераза
- 33. КФ 1.1.1.187 Дегідро-D-рамнозоредуктаза

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Умови і спосіб культивування безпосередньо залежать від фізіолого-біохімічних особливостей біологічного агента.

1. Виробниче культивування і вирощування посівного матеріалу відбувається за температури 34°C і рН 7,0 [11]. За таких умов можливий ризик контамінації сторонніми мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами. Тому необхідно забезпечити асептичні умови під час отримання гелану. Для забезпечення асептичних умов проводять стерилізацію обладнання і комунікації, поживного середовища, аераційного повітря (оскільки *S. yabuuchiae* є аеробною бактерією [44]), піногасників. Для перешкодження сторонній контамінації у ферментері створюють надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря.

2. Виробництво гелану можна проводити як періодичним так і безперервним способами. Однак біосинтез екзополісахаридів (ЕПС) може проходити одночасно із ростом продуцента, але максимальна швидкість їх продукування досягається у стаціонарній фазі росту, тому продуктивність біосинтезу під час безперервного культивування буде зменшуватися. Також зазначають, що під час культивування продуцентів мікробних ЕПС безперервним способом можливо отримати цільовий продукт зі зміненими реологічними властивостями. Зважаючи на дані нюанси, обираємо періодичний спосіб культивування.

3. Для культивування продуцента обираємо глибинний спосіб культивування, оскільки даний спосіб має переваги над поверхневим. Під час глибинного способу культивування компоненти поживного середовища споживаються раціональніше, що дозволяє зменшити кількість відходів виробництва.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>						41	97
<i>Керівник</i>	<i>Пироз Т.П.</i>							
<i>Н. контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							
						<i>Кафедра БТМ</i>		43

4. У процесі одержання посівного матеріалу, починаючи із культивування в колбах і закінчуючи культивуванням в $0,1 \text{ м}^3$ ферментері, концентрація гліцерину у середовищі складає 80 г/л (згідно зі статті [11]), а під час виробничого біосинтезу – обрахована ($163,3 \text{ г/л}$). Відповідно до інформації, наведеної у статті [11], тривалість культивування складає 144 год. Тому під час виробничого біосинтезу початкова концентрація гліцерину у середовищі становить 80 г/л , а решту – $83,3 \text{ г/л}$ дробно вносимо двома порціями по $41,7 \text{ г/л}$ на 72 і 96 год культивування.

Отже, культивування продуцента гелану здійснюється періодично з підживленням глибинним способом в аеробних умовах із дотриманням асептики проведення процесу.

Залежно від умов культивування біологічного агента конструкція і оснащення ферментера може відрізнятись. Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне обладнання для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов.

1. Під час культивування продуцента гелану необхідними є аеробні умови. Тому ферментер повинен бути обладнаний барботером із метою забезпечення культури необхідною кількістю кисню та містити газоаналізатор – для контролю концентрації CO_2 .

2. Оскільки процес ферментації повинен проходити за нейтрального значення рН (7,0), то ферментер повинен бути оснащений датчиком для контролю значень рН.

3. У процесі біосинтезу гелану (як і інших мікробних ЕПС) спостерігається підвищення в'язкості культуральної рідини, а, отже, і зниження ефективності масообміну. Для інтенсифікації процесу масообміну та кращої гомогенізації культуральної рідини обираємо як перемішуючий пристрій турбінну мішалку відкритого типу з регульованою кількістю обертів.

4. Оскільки ферментація має проходити при постійній температурі (34°C), то ферментер повинен бути обладнаний сорочкою і датчиком, що відображає значення температур.

5. При використанні як субстрату відходів виробництва біодизелю оснащення ферментера додатковим піногасником не є необхідним. Оскільки відходи містять у своєму складі такі компоненти як жирні кислоти, олеати, тригліцериди [60], піна під час процесу ферментації утворюватися не буде.

Оскільки об'єм ферментера – 20 м³, очевидно, що його миття відбуватиметься в автоматичному режимі, тому необхідно, щоб даний апарат підтримував технологію Clean-In-Place (CIP).

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки продуцент гелану – *S. yabuuchiae* GI:724472388 є аеробною бактерією [44], то постає необхідність у безперервній подачі стерильного повітря у процесі біосинтезу. Тому, у технологічній схемі слід передбачити підготовку стерильного аераційного повітря.

У мікробіологічних боксах та лабораторіях, де здійснюється підготовка посівної культури та інокуляту, повітря стерилізують шляхом опромінення ультрафіолетовими променями (застосування УФ-ламп).

Підготовка стерильного аераційного повітря проходить таким чином:

1. Забір атмосферного повітря за допомогою турбокомпресора через забірну шахту, на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі, тобто на висоті ~ 16 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 2, косий дах будівлі (~1,5 м)).

2. Аби істотно знизити кількість контамінантів, повітря далі потрапляє у фільтри попереднього очищення, в яких звільняється від грубого аерозолу – пилу.

3. Стиснення повітря у турбокомпресорі до 0,35 – 0,5 МПа, що призводить до підвищення його температури (120 – 250 °С) і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму.

4. Аби не призводити до злипання волокон і утворення каналів, забезпечується випадання вологи у краплевловлювачі охолодженням повітря за допомогою теплообмінного апарату.

5. Підігрів повітря у теплообмінниках.

6. Видалення конденсованої вологи у ресивері, що потрапила із компресора.

7. Очищення повітря на головних фільтрах.

8. Очистка повітря на індивідуальних фільтрах. Від головних фільтрів повітря проходить колектором в індивідуальні фільтри третього рівня, що встановлені безпосередньо на кожному ферментері (затримують 99,999% мікроорганізмів).

Конструкція індивідуального фільтра залежить від типу фільтрувального матеріалу, що застосовується. У процесі експлуатації фільтрів необхідна також їхня стерилізація. Найефективніший спосіб – нагрівання вологою парою і витримування впродовж певного часу за температури 125 – 130 °С [61].

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Достатньо важливим для забезпечення виробництва продукції належної якості і мікробіологічної чистоти є забезпечення відповідного стану санітарії та гігієни на підприємстві. Підготовка виробничих приміщень включає в себе ряд заходів: вологе прибирання, дезінфекцію і ультрафіолетове опромінення підлоговими та настінними світильниками стін, підлог, стель, поверхні обладнання та комунікацій з метою забезпечення чистоти. Підготовка виробничих приміщень поділяється на щоденну і генеральну. Щоденне прибирання "чистих" приміщень проводять після кожної зміни вологим способом.

Для попередження набуття мікроорганізмами резистентності до мийних засобів, слід змінювати засоби для дезінфекції один раз в 1-3 місяці. Із метою охорони безпеки життєдіяльності людини і тварин і запобігання небажаних для людини наслідків до дезінфікуючих речовин, які використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловостях висувається ряд вимог:

- ✓ широкий спектр антимікробної дії;
- ✓ безпека для людей і тварин;
- ✓ мінімальні корозійна активність та агресивність;
- ✓ легка розчинність у воді;
- ✓ відсутність різкого запаху;

- ✓ стійкість при зберіганні, використанні, придатність до транспортування;
- ✓ висока активність;
- ✓ низька ціна та висока доступність;
- ✓ здатність до очищення та відбілювання [62].

Каустична сода (NaOH) - біла кристалічна речовина, що легко розчиняється у воді, достатньо добре розчиняється у метиловому та етиловому спиртах, але не розчинна в етоксигетані. У твердому вигляді є високо гігроскопічною речовиною, яка здатна до швидкої трансформації у сильно концентрований розчин під час перебування на повітрі. Гарячі (2-3 %) розчини каустичної соди омилують жири, гідролізують білок, розчіплюють вуглеводи. Такі розчини каустичної соди при (60-70 °С) виявляють дезінфікуючу дію [63, 64].

Каустична сода є їдким, токсичним та корозійно-активним матеріалом (2-й клас небезпеки за ГОСТ 12.1.007). При контакті зі слизовими та шкірою здатний надавати сильний дратівливий вплив – аж до хімічних опіків. При ковтанні згубний вплив на слизові оболонки максимізується, при попаданні в очі уражається сітківка і погіршується зір. Із зазначеного вище випливає, що нехтувати технікою безпеки, маючи справу з цією речовиною, не можна [64].

Концентрація каустичної соди у миючому розчині не повинна перевищувати:

- 0,2 % - при ручному митті обладнання;
- 2,0 % - при механічному митті обладнання [63].

Біомой – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом (ТУ У 22902465.005-96). Рекомендований МОЗ України та затверджений до застосування Головним державним санітарним лікарем України [65].

Препарат є порошком світлих тонів (допускається присутність пофарбованих включень ензимів). Засіб добре розчиняється у воді (розчинність не менше 30 г/дм³). Робочі розчини Біомою безбарвні, не пошкоджують вироби, що обробляються, і мають виражені емульгуючі та миючі властивості, легко

видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях.

Біомой належить до класу мало небезпечних речовин (4 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). При потраплянні у шлунок та на шкіру не виявляє кумулятивних, шкірних подразнюючих і сенсibiliзуючих властивостей. У концентраціях рекомендованих до застосування не подразнює слизову оболонку очей [65, 66].

Застосування Біомою для зазначених цілей дає відчутну економічну вигоду в порівнянні з іншими миючими засобами. Для приготування робочого розчину Біомою використовується концентрація 0,15-0,5 %. Робочий розчин Біомою готують у тарі будь-якого матеріалу шляхом розчинення у питній воді [65].

Дезінфікуючий засіб «**ЕСТЕР ДЕЗ**» (на основі надощтової кислоти – НОК) використовується для проведення низькотемпературної дезінфекції заздалегідь вимитого технологічного устаткування (резервуарів, ємностей, теплообмінників, ліній розливу, пакування і фасування), трубопроводів, оборотних полікарбонатних бутлів та поліефірних (ПЕТФ, ПЕН) пляшок, інвентарю, тари методом циркуляції, зрошування, занурення; для боротьби з пліснявою та профілактикою її появи; для дезінфекції санітарно-побутових приміщень [67].

Склад: надощтова кислота 8,0-16,0 %; перекис водню 16,0-26,0 %; оцтова кислота 12,5-20,5 %; стабілізуюча добавка і вода - до 100,0 % [68].

Засіб має високу бактерицидну, фунгіцидну, спороцидну дію. Ефективно діє проти мікроорганізмів і вірусів при низьких температурах і нетривалому часі впливу (15-30 хв.). Проявляє сильну бактерицидну активність по відношенню до спороутворювальних бактерій, кишкової палички, дріжджів в 0,015-0,1 % концентрації по НОК. Резистентність мікроорганізмів до дезінфікуючого засобу відсутня. Дезінфікуючий засіб «ЕСТЕР ДЕЗ» екологічно безпечний, після застосування розкладається на кисень, воду та оцтову кислоту [67].

Засіб для миття та дезінфекції «**ПЗ-монакс 990**» («P3-topax 990») (діюча речовина N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін – 2,0% - 5,0 %), під-

ходить для дезінфекції зовнішніх поверхонь і механізмів, а також стін і підлоги на підприємствах при використанні у вигляді 1 – 2 % робочого розчину в рамках пінної обробки. Строк придатності: 36 місяців за умови зберігання невідкритої упаковки при температурі 0-30 °С.

Засіб володіє антимікробною активністю по відношенню до бактерій у т.ч. групи кишкових паличок, стафілококів, сальмонел та ін., а також дріжджоподібних грибів і дріжджів – специфічних мікрофлорі харчової промисловості. Деззасіб за параметрами гострої токсичності при введенні у шлунок відноситься до 3 класу помірно небезпечних речовин за ГОСТ 12.1.007-76; при інгаляційному впливі у насичених концентраціях мало небезпечні; робочий розчин при однократному використанні способом зрошення подразнює органи дихання і слизові оболонки очей. Засіб призначено для дезінфекції поверхонь у промислових приміщеннях, технологічного обладнання, інвентарю, тари, санітарно-технічного обладнання [69].

Фамідез Саноксіл 100 – концентрований засіб на основі перекису водню та срібла для ефективної та швидкої дезінфекції водостійких поверхонь. Не містить альдегідів, фенолів, спиртів та поверхнево-активних речовин. Внесено в Державний реєстр дезінфекційних засобів за номером 75. Дезінфекцію поверхонь здійснюють шляхом зрошування, протирання або оприскування робочими розчинами засобу. Склад: водню пероксид 50%, срібла нітрат 0,08%, кислота фосфорна [70].

Фамідез Саноксіл 100 – високоефективний засіб проти бактерій (вкл. туберкульоз), спор, вірусів (щодо збудників перентеральних вірусних гепатитів та СНІДу), грибків (щодо грибків роду *Candida*). Засіб не слід приймати всередину. Уникати контакту з очима та шкірою. Сильний окисник. Зберігати осторонь від органічних продуктів (вата, мастила і т.д.). Із засобом потрібно працювати у захисних рукавицях [71].

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Згідно з попередньо проведеними розрахунками (див. підрозділ 3.4) виробничий біосинтез гелану здійснюється у ферментері об'ємом 20 м³, що міс-

тять $10,4 \text{ м}^3$ поживного середовища. Інокулянт отримують у чотири етапи: у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємом 20 і 200 л та посівному апараті об'ємом 2 м^3 .

Максимальний синтез гелану ($52,6 \text{ г/л}$ за 144 год) досягається за умов росту бактеріального штаму *S. yabuuchiae* GI:724472388 на середовищі такого складу (г/л):

- Відходи виробництва біодизелю – $163,3$;
- NH_4Cl – $2,2$;
- Na_2HPO_4 – 6 ;
- NaCl – 5 ;
- KH_2PO_4 – 3 ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,12$;
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – $0,011$.

Стерилізації підлягають усі компоненти поживного середовища, окрім відходів виробництва біодизелю, що є однією з переваг даного субстрату. Це пов'язано з тим, що у складі даного компоненту є неочищений гліцерин (65%) [42], який містить токсичні домішки, такі як етанол, метанол, жирні кислоти, хлорид натрію, важкі метали [60].

У процесі одержання посівного матеріалу, починаючи від культивування у колбах і закінчуючи культивуванням у 2 м^3 інокуляторі, концентрація відходів виробництва біодизелю у середовищі складає 80 г/л [11], а під час виробничого біосинтезу – обрахована ($163,3 \text{ г/л}$). Відповідно до інформації, наведеної у статті [11], тривалість культивування складає 144 год. Тому під час виробничого біосинтезу початкова концентрація джерела вуглецю у середовищі становить 80 г/л , а решту – $83,3 \text{ г/л}$ дробно вносимо двома порціями по $41,7 \text{ г/л}$ на 72 і 96 год культивування.

Для того, аби визначити спосіб внесення деяких компонентів середовища (відходи виробництва біодизелю) і приготування титрувальних розчинів (соляної кислоти та їдкого натру) та визначитися з необхідними для цього колбами

чи збірниками, розрахуємо кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на кожну зі стадій виробництва (табл. 5.1.). Оскільки вміст гліцерину у відходах виробництва біодизелю становить 65% [42], то густина його розчину складає 1170 кг/м³.

Таблиця 5.1

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	Відходи виробництва біодизелю			HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, кг	Вміст, л	Ємність для внесення	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
1,02	0,082	0,07	—	—	—	—	—
10,2	0,82	0,7	колба на 1 л	20,4	у колбі на 50 мл	20,4	у колбі на 50 мл
101	8,1	6,9	реактор на 10 л	202	у колбі на 250 мл	202	у колбі на 250 мл
1000	80	68,4	реактор на 100 л	2000	у реакторі на 5 л	2000	у реакторі на 5 л
10400	832	711	реактор на 1 м ³	—	—	—	—
	434	371		—	—	—	—

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Для отримання необхідної кількості посівного матеріалу потрібно у 9 качалочних колбах об'ємом 750 мл приготувати 1,02 л поживного середовища (ПС). Дану кількість ПС стерилізуємо в автоклаві. Проаналізувавши склад ПС для вирощування бактеріального штаму *S. yabuuchiae* GI:724472388, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: NH₄Cl, NaCl, MgSO₄ · 7H₂O (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Композиція Б: Na₂HPO₄, KH₂PO₄ (режим стерилізації: 131 °C, 40 хв).

Солі композиції А стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нероз-

чинних фосфатів магнію. Стерилізацію композицій А і Б здійснюють в автоклаві.

Окремо готують запасний розчин $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, що стерилізують в автоклаві при $131\text{ }^\circ\text{C}$ упродовж 40 хв.

Відходи виробництва біодизелю не підлягають попередній стерилізації, тому вносяться безпосередньо у колбу.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 20 л

Для одержання посівного матеріалу необхідно 10,2 л середовища, тому стерилізація буде здійснюватися безпосередньо в інокуляторі, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: NH_4Cl , NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: $131\text{ }^\circ\text{C}$, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Для зменшення витрат і спрощення технологічного процесу на даному етапі основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію, яку попередньо розчиняють в окремому збірнику об'ємом 20 л і стерилізують в інокуляторі. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію рН розчину з солями, перед стерилізацією доводять 6 %-вим розчином соляної кислоти до значення рН 4,0 – 4,5.

Перед культивуванням зі збірника додають відходи виробництва біодизелю, а рН середовища за допомогою стерильного 6%-го розчину їдкого натру доводять до 6,8 – 7,0. Потім додають посівний матеріал.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 200 л

Для одержання посівного матеріалу необхідно 101 л ПС, тому стерилізація буде також здійснюватися безпосередньо в інокуляторі.

Композиція А: NH_4Cl , NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: $131\text{ }^\circ\text{C}$, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Для зменшення витрат і спрощення технологічного процесу на даному етапі основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію, яку попередньо

розчиняють в окремому збірнику об'ємом 160 л і стерилізують в інокуляторі. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію рН розчину з солями, перед стерилізацією доводять 6 %-вим розчином соляної кислоти до значення рН 4,0 – 4,5.

Перед культивуванням зі збірника додають відходи виробництва біодизелю, а рН середовища за допомогою стерильного 6%-го розчину їдкого натру доводять до 6,8 – 7,0. Після додають посівний матеріал.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 2 м³

Для одержання посівного матеріалу необхідно 1000 л середовища, тому стерилізація буде також здійснюватися безпосередньо в інокуляторі.

Композиція А: NH_4Cl , NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Для зменшення витрат і спрощення технологічного процесу на даному етапі основні і фосфорні солі об'єднують в одну композицію, яку попередньо розчиняють в окремому збірнику об'ємом 1,6 м³ і стерилізують в інокуляторі. Для запобігання утворенню нерозчинних фосфатів магнію рН розчину з солями, перед стерилізацією доводять 6 %-вим розчином соляної кислоти до значення рН 4,0 – 4,5.

Перед культивуванням зі збірника додають відходи виробництва біодизелю, а рН середовища за допомогою стерильного 6%-го розчину їдкого натру доводять до 6,8 – 7,0. Далі додають посівний матеріал.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 20 м³

Для одержання посівного матеріалу на цій стадії необхідно 10,4 м³ середовища. Щоб зменшити витрати води, пари та скоротити час обробки даного об'єму поживного середовища, економічно доцільним буде проведення процесу стерилізації в установці безперервної стерилізації (УБС). Обираємо УБС-15 із продуктивністю 15 м³/год (час стерилізації становитиме 0,7 год). Температура стерилізації – 130 °С.

Розчин усіх компонентів поживного середовища, відходів виробництва біодизелю, готується в одному реакторі-змішувачі. Відходи виробництва біодизелю подаються зі збірника після стерилізації усіх інших компонентів.

Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Аби спростити технологічний процес, основні та фосфорні солі для одержання посівного матеріалу в інокуляторах стерилізуємо разом в апаратах об'ємом 2 м³, 200 л і 20 л. Для цього, щоб уникнути утворення осаду, рН розчину доводимо до 4,0 – 4,5 додаванням 6%-го розчину соляної кислоти.

Оскільки процес ферментації повинен проходити за нейтрального значення рН (7,0) [11], то перед внесенням посівного матеріалу поживне середовище підлужнюють стерильним 6%-вим розчином їдкого натру, який стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

При використанні як субстрату відходів виробництва біодизелю приготування піногасника не є необхідним. Це обумовлено тим, що піна під час процесу ферментації утворюватися не буде, оскільки відходи містять у своєму складі такі компоненти як жирні кислоти, олеати, тригліцериди [60].

Отже, технологічна схема, окрім стадій підготовки поживного середовища, включає такі стадії допоміжних робіт:

- підготовка стерильного аераційного повітря та очистка відпрацьованого;
- приготування 6% розчину HCl для підкислення середовища при стерилізації його в посівних апаратах об'ємом 20, 200 л і 2 м³;
- приготування та стерилізація 6% розчину NaOH для стабілізації рН середовища перед початком культивування в посівних апаратах об'ємом 20, 200 л і 2 м³;
- приготування і стерилізація запасного розчину CaCl₂ · 2H₂O для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці.

Окрім основних реакторів для розчинення композицій солей, також необхідно передбачити такі реактори:

- ✓ У цеху підготовки посівного матеріалу:

- для приготування 6% HCl (5 л) на стадії культивування в інокуляторі об'ємом 2 м³;
- для приготування та стерилізації 6% NaOH (5 л) на стадії культивування в інокуляторі об'ємом 2 м³;
- для приготування композиції А: 20 л; 160 л; 1,6 м³;
- для відходів виробництва біодизелю (10 л, 100 л).
- ✓ У цеху виробничого біосинтезу:
 - реактор-змішувач об'ємом 16 м³ для змішування композиції А перед стерилізацією в УБС;
 - реактор-змішувач для відходів виробництва біодизелю (1 м³).

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біо-синтезу гелану

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник А1И 021.000 («Тепло-тех-Комплект»). Температура повітря до 150 ° С; тиск до 0,6 МПа [72].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Повітряний фільтр ФВКАС-6. Виробник: «Єврофільтр». Фільтрувальний матеріал: пенополіуретан; продуктивність: 3400 м ³ /год; Е=90%; габаритні розміри, мм: 592x592x48 [73].
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор Т2 («Dalgakiran»). Продуктивність: 2250 м ³ /год; робочий тиск: 5.5 – 8.8 бар; габаритні розміри, мм: 2450x1640x1900 [74].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Промисловий осушувач повітря рефрижераторного типу («Dalgakiran»). Продуктивність: 1700 м ³ /год; габарити, мм: 390x344x320; потужність: 5,7 кВт [75].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 500-600-11-01 («Zelko»). Об'єм, л: 500; максимальний тиск: 11 бар; габаритні розміри, мм: 2125x600 [76].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Водяний нагрівач НКВ 400x200-2 («Vents»). Максимальний робочий тиск: 1,6 МПа; габаритні розміри, мм: 400x200x200 [77].
Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Компактний кишеньковий фільтр класу F9 («New filter»). Фільтрувальний матеріал: мікроскловолокно; Е>95% [78].

<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Парфенюк М.А.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Пирог Т.П.</i>			
<i>Н. контр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>			
<i>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</i>			<i>Літера</i>	<i>Аркциш</i>
				54
			<i>Кафедра БТМ</i>	
			56	

ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр повітряний <i>SPF-005</i> . Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно; діапазон температур: 1,5-150 °С; ступінь очищення повітря фільтром: 99,999 % [79].
Р-9	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор УПЭС-0.02/1.1 об'ємом 20 л «Промбіофіт» (Росія). Матеріал: нержавіюча сталь; оснащений сорочкою та мішалкою: 0-200 об/хв; потужність двигуна мішалки: 0,2 кВт; габаритні розміри: 1000 x 250 x 680 [80, 81].
Н-10	Насос мембранний	1	Мембранний насос для рідин («АгроТех»). Максимальна потужність: до 15 Вт; продуктивність: 1,5 л/хв; максимальний робочий тиск: 3,5 бар [82].
І-11	Інокулятор	1	Інокулятор BioFlo-4500 об'ємом 20 л («AWTech»). Матеріал корпусу: нержавіюча сталь; містить сорочку, мішалку з регульованою швидкістю перемішування: 50-1000 об/хв; із датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури, манометром; габаритні розміри, мм: 890 x 754 x 1194 [83].
ІФ-12	Індивідуальний фільтр очищення повітря	1	Фільтр ULPA TNBSU30561050 класу U16 («Thepow»). Максимальна робоча температура: 70°C; фільтрувальна площа: 3,88 м ² ; стійкість до вологи до 100%; E=99,999%; фільтрувальний матеріал: ультратонке скловолокно [84].
Р-13	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач фірми «МашХім» (Росія) об'ємом 160 л. Потужність змішувача: до 5,5 кВт; швидкість перемішування: 20-3000 об/хв; оснащений сорочкою та температурним датчиком; габаритні розміри, мм: 500x875x1850 [85].
Н-14	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий CAM INOX 80-HL («Speroni»). Максимальний тиск: до 8 бар; продуктивність: 3 м ³ /год (50 л/хв); потужність: 600 Вт [86].

З-15	Збірник для зберігання відходів виробництва біодизелю	1	Збірник з емальованої сталі об'ємом 10 л («Єврохіммаш»). Містить сорочку та лопатеву мішалку із частотою обертів 100 об/хв; потужність двигуна: 0,75 кВт; габаритні розміри, мм: 420x350x500 [87].
I-16	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 200 л BLBIO-200SJ («BLBIO»). Матеріал корпуса: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою: 200-400 об/хв; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО ₂ , DO, температури; витратоміром, манометром, барботером, контролером рівня рідини; потужність: 6 кВт; габаритні розміри, мм: 1400x820x2200 [88].
ІФ-17	Індивідуальний фільтр очищення повітря	1	Фільтр ULPA ФяС-У класу U16 («Фолтер»). Фільтрувальний матеріал: скловолокно; максимальна робоча температура: до 80°C; E=99,999%; стійкість до вологи до 100% [89].
Д-18	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Ваговий дозатор «АгроТех» (Україна) для реактора-змішувача об'ємом 1,6 м ³ . Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; напруга: 20 В; потужність: 2,2кВт [90].
Р-19	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор із еліптичним днищем об'ємом 1,6 м ³ фірми «МашХім» (Росія). Оснащений сорочкою, температурним датчиком та лопатєвою мішалкою; габаритні розміри, мм: 1940 x 2595 [91].
Д-20	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Електронний промисловий дозатор води та рідин Serv_W21. Об'єм дозуючої води: 0,1 – 999,9л; витрати води: 12 л/хв [92].
Н-21	Насос відцентровий	1	Насос Відцентровий СВМ 152 («Spegoni»). Потужність: 0,85 кВт; матеріал робочого колеса: чавун; висота напору: 21 м; продуктивність: 18 м ³ /год (300 л/хв); тиск: 10 бар [93]
З-22	Збірник для зберігання відходів виробництва біодизелю	1	Реактор-змішувач фірми «МашХім» (Росія) об'ємом 100 л. Потужність змішувача: до 5,5 кВт; швидкість перемішування: 20-3000 об/хв; оснащений сорочкою та температурним датчиком; габаритні розміри, мм: 400 x 1825 x 770 [85].

P-23	Реактор-змішувач для приготування 6% розчину соляної кислоти	1	Реактор A2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [94].
Д-24	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор рідин та води mBev. Об'єм дозуючої води: 0,1 – 999,9л; витрати води: 1 л/хв [95].
P-25	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації 6% розчину натрію гідроксиду	1	Реактор A2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [94].
Д-26	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор рідин та води mBev. Об'єм дозуючої води: 0,1 – 999,9л; витрати води: 1 л/хв [95].
I-27	Інокулятор	1	Промисловий біореактор STR 2000 L об'ємом 2 м ³ («Allegro»). Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316; розрахунковий тиск в ємності: 0,3 МПа; частота обертів турбінної мішалки R 1313: 0-800 об/хв; з рубашкою; оснащений датчиками вимірювання рН, рО ₂ , температури; витратоміром, манометром; габаритні розміри, мм: 1855 x 1710 x 2930 [96, 97].
ІФ-28	Індивідуальний фільтр очищення повітря	1	Фільтр ULPA TNBSU117057070 класу U16 («Thenow»). Максимальна робоча температура: 70°C; фільтрувальна площа: 17,4 м ² ; стійкість до вологи до 100%; E=99,999%; фільтрувальний матеріал: ультратонке скловолокно [84].
Д-29	Ваговий дозатор для подачі компонентів композиції А	1	Ваговий дозатор «АгроТех» (Україна) для реактора-змішувача об'ємом 1,6 м ³ . Мінімальна межа дозування – 100 г, максимальна – 60 кг; напруга: 20 В; потужність: 2,2кВт [90].
P-30	Реактор-змішувач для приготування композиції А	1	Реактор-змішувач із еліптичним днищем фірми «МашХім» (Росія) об'ємом 16 м ³ . Оснащений сорочкою, температурним датчиком та лопатевою мішалкою; габаритні розміри, мм: 3325x6140 [91].
Д-31	Об'ємний дозатор для подачі води	1	Дозатор води та рідин. Об'єм дозуючої води: 0,01 – 9999л; робочий тиск: 0,5 атм – 10 атм; робоча напруга: 220 В [98].

Н-32	Насос відцентровий для перекачування композиції А від Р-30 до УБС-34	1	Насос Відцентровий CS 50-160 D («Speroni»). Потужність: 3 кВт; тиск: 10 бар; максимальний напір: 25 м; матеріал: чавун; продуктивність: 72 м ³ /год (1200 л/хв) [99].
З-33	Збірник для зберігання відходів виробництва біодизелю	1	Реактор із еліптичним днищем об'ємом 1,0 м ³ фірми «МашХім» (Росія). Оснащений сорочкою, температурним датчиком та лопатевою мішалкою; габаритні розміри, мм: 1538 x 2520 [91].
УБС-34	Установка безперервної стерилізації	1	Матеріал: нержавіюча сталь; потужність – 15 м ³ /год; температура стерилізації – 131 °С; містить 2 теплообмінника. Виготовлення на замовлення.
Н-35	Насос перистальтичний для перекачування композиції А від УБС-32 до ферментера	1	Насос Перистальтичний РТ 100 («Tapflo»). Продуктивність: 3,6 м ³ /год (60 л/хв) [100].
Н-36	Насос відцентровий для перекачування відходів виробництва біодизелю	1	Насос Відцентровий САМ 100 НЛ («Speroni»). Потужність: 0,75 кВт; матеріал робочого колеса: чавун; висота напору: 45 м; продуктивність: 3,6 м ³ /год (60 л/хв); тиск: 6 бар [101].
ФР-37	Ферментер	1	Ферментер DIN-BE об'ємом 20 м ³ («Pfaudler» – Німеччина). Матеріал: нержавіюча сталь 304; оснащений барботером, сорочкою, датчиком рН, рО ₂ , температури; пробовідбірником, манометром; турбінною мішалкою: 320 об/хв; максимальний допустимий тиск: 6 бар; габаритні розміри, мм: 2900x7734 [102].
Н-38	Насос відцентровий для перекачування культуральної рідини у збірник	1	Насос Відцентровий CS 50-160 D («Speroni»). Потужність: 3 кВт; тиск: 10 бар; максимальний напір: 25 м; матеріал: чавун; продуктивність: 72 м ³ /год (1200 л/хв) [99].

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ГЕЛАНУ

Технологічна схема біосинтезу гелану *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388 складається із допоміжних робіт та основного технологічного процесу. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, приготування і стерилізація запасного розчину CaCl₂, підготовка і стерилізація поживних середовищ. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: підготовку посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу гелану наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 16 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 2, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де розміщують обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 1.2. Очищення повітря від грубих часток

Попереднє очищення повітря проводять у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром 50 мкм.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Стискання повітря здійснюють у компресорі (К-3), щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C.

ДР 1.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°C.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ГЕЛАНУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Парфенюк М.А.</i>						
<i>Керівник</i>		<i>Пироз Т.П.</i>					59	97
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт</i>						61		
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

Згодом зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де проходить усунення пульсацій руху повітря. На даному етапі показник вологості зменшується до 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°C. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%.

ДР 1.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення складає 95%.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-12, ІФ-17, ІФ-28) кожного з біореакторів до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО – 0.

ДР 2. Приготування титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину HCl

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 20 л

Для приготування 20,4 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 50 мл додають за допомогою мірного циліндра на 25 мл додають 17,5 мл питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 5 мл при постійному перемішуванні 3,5 мл 31%-ого розчину HCl [103]. Рідини обов'язково змішують у такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 2.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 202 мл 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 250 мл додають за допомогою мірного циліндра на 250 мл додають 173 мл питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 50 мл при постійному перемішуван-

ні 35 мл 31%-ого розчину HCl. Рідини обов'язково змішують у такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 2.1.3. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівному апараті об'ємом 2 м³

Для приготування 2000 мл 6%-го розчину HCl у реактор-змішувач (Р-23) об'ємом 5 л подають за допомогою об'ємного дозатора (Д-24) 1,71 л питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 500 мл при постійному перемішуванні 345 мл 31%-ого розчину HCl. Рідини обов'язково змішують у такому порядку, а не навпаки з метою уникнення сильної екзотермічної реакції.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 20 л

Для приготування 20,4 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 1,22 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 50 мл і за допомогою мірного циліндра на 25 мл додають 20,4 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 200 л

Для приготування 202 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 12,12 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 250 мл і за допомогою мірного циліндра на 250 мл додають 202 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлужнення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 2 м³

Для приготування 2 л 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 120 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор-змішувач (Р-25) об'ємом 5 л і при постійному перемішуванні подають за допомогою

об'ємного дозатора (Д-26) 2 л питної води. Стерилізують у реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 3. Приготування і стерилізація запасного розчину CaCl₂

ДР 3.1. Приготування і стерилізація запасного розчину CaCl₂ для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках.

На технічних терезах зважують 1,1 г CaCl₂ · 6H₂O. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води, відміряної мірним циліндром, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту потрібно 1020 мл поживного середовища. Враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища – це посівний матеріал (102 мл), об'єм запасного розчину (1,02 мл) та об'єм гліцерину (70 мл), то кількість води для приготування поживного середовища становитиме 847 мл.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 917 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
NH ₄ Cl	2,2	2,02	А	0,547
NaCl	5	4,6		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,12	0,11		
Вода		0,547 (л)		
Na ₂ HPO ₄	6	5,5	Б	0,3
KH ₂ PO ₄	3	2,75		
Вода		0,3 (л)		

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 2,02 г NH_4Cl , 4,6 г NaCl і 0,11 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, доливають дистильовану воду (0,547 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 5,5 г Na_2HPO_4 і 2,75 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 1 л, додають дистильовану воду (0,3 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 20 л

Для одержання рідкого посівного матеріалу у посівному апараті, об'єм якого складає 20 л, слід приготувати 10,2 л поживного середовища. Потрібно звернути увагу, що 10% (1,02 л) припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі. При розрахунку також потрібно врахувати 0,7 л гліцерину (відходи виробництва біодизелю) як субстрату. Тому об'єм води, потрібний для приготування композиції складає 8,48 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 20 л наведений у табл. 7.2.

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 9,18 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
NH ₄ Cl	2,2	20,2	А	8,48
NaCl	5	45,9		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,12	1,1		
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0,011	0,1		
Na ₂ HPO ₄	0,5	4,59		
KH ₂ PO ₄	0,5	4,59		
Вода		7,63 (л)		
Конденсат		0,85 (л)		

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 20,2 г NH₄Cl, 45,9 г NaCl, 1,1 г MgSO₄ · 7H₂O, 0,1 г CaCl₂ · 6H₂O, 4,59 г Na₂HPO₄ і KH₂PO₄. Наважки переносять у реактор-змішувач на 20 л (Р-9), додають 7,63 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40°C. Отриманий розчин перекачують мембранним насосом (Н-10) у попередньо простерилізований інокулятор (І-11) об'ємом 20 л, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1.1) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 200 л

На даному етапі необхідно отримати 101 л поживного середовища. Потрібно звернути увагу, що 10% (10,1 л) припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі. При розрахунку також потрібно врахувати 6,9 л гліцерину (відходи виробництва біодизелю) як субстрату. Тому об'єм води, потрібний для приготування композиції складає 84 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 200 л наведений у табл. 7.3.

Таблиця 7.3

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 200 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 90,9 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
NH ₄ Cl	2,2	200	А	84
NaCl	5	454,5		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,12	10,9		
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0,011	1		
Na ₂ HPO ₄	0,5	45,45		
KH ₂ PO ₄	0,5	45,45		
Вода		75,6 (л)		
Конденсат		8,4 (л)		

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 200 г NH₄Cl, 454,5 г NaCl, 10,9 г MgSO₄ · 7H₂O, 1 г CaCl₂ · 6H₂O, 45,45 г Na₂HPO₄ і KH₂PO₄. Наважки переносять у реактор-змішувач на 160 л (Р-13), додають 75,6 л води питної, вмикають перемішувачий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40°C. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-14) у попередньо простерилізований інокулятор (І-16) об'ємом 200 л, через конектор подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1.2) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для інокулятора об'ємом 2 м³

На даному етапі необхідно отримати 1000 л поживного середовища. Слід пам'ятати, що 10% (100 л) припадає на посівний матеріал, а також 10% складе конденсат, який утвориться при стерилізації поживного середовища в інокуляторі. При розрахунку також потрібно врахувати 68,4 л гліцерину (відходи виро-

бництва біодизелю) як субстрату. Тому об'єм води, потрібний для приготування композиції складає 831,6 л.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі об'ємом 2 м³ наведений у табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 2 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 900 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
NH ₄ Cl	2,2	1980	А	831,6
NaCl	5	4500		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,12	108		
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0,011	9,9		
Na ₂ HPO ₄	0,5	450		
KH ₂ PO ₄	0,5	450		
Вода		748,44 (л)		
Конденсат		83,16 (л)		

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

Через ваговий дозатор (Д-18) у реактор-змішувач на 1,6 м³ (Р-19) подають 1,98 кг NH₄Cl, 4,5 кг NaCl, 108 г MgSO₄ · 7H₂O, 450 г Na₂HPO₄ і KH₂PO₄, а на технічних терезах зважують 9,9 г CaCl₂ · 6H₂O. Наважку також переносять у реактор-змішувач на 1,6 м³ (Р-19), додають через об'ємний дозатор (Д-20) 748,44 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40°C. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-21) у попередньо простерилізований інокулятор (І-27) об'ємом 2 м³, подають від реактора-змішувача (Р-23) самоплином 6 %-ий розчин HCl (від ДР 2.1.3) до досягнення рН 4,0-4,5 і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 20 м³

На даному етапі необхідно отримати 10,4 м³ поживного середовища. Враховуючи кількість посівного матеріалу (1,04 м³) та об'єм відходів виробництва біодизелю (711 л), кількість води для приготування поживного середовища складає 9,65 м³.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 20 м³ наведений у табл. 7.5.

Таблиця 7.5

Склад композицій для стерилізації поживного середовища в УБС

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 10,36 м ³ середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
NH ₄ Cl	2,2	22,79	А	9650
NaCl	5	51,8		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,12	1,24		
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0,011	0,11		
Na ₂ HPO ₄	0,5	5,18		
КН ₂ РО ₄	0,5	5,18		
Вода		8685 (л)		
Конденсат		965 (л)		

ДР 4.5.1. Приготування композиції А

Через ваговий дозатор (Д-29) у реактор-змішувач на 16 м³ (Р-30) вносять 22,79 кг NH₄Cl, 51,8 кг NaCl, 1,24 кг MgSO₄ · 7H₂O, 0,11 кг CaCl₂ · 6H₂O, 5,18 кг Na₂HPO₄ і КН₂РО₄, додають через об'ємний дозатор (Д-31) 8685 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у збірнику на рівні 40°C.

ДР 4.5.2. Стерилізація композиції А в УБС

Отриманий розчин солей (від ДР 4.5.1) перекачують відцентровим насосом (Н-32) в УБС (УБС-34), де відбувається стерилізація гострою парою за температури 131°C упродовж 5-7 хвилин.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *S. yabuuchiae* GI:724472388 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (триптоказеїновий соєвий агар [44]). Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1 – 2 рази на місяць. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *S. yabuuchiae* GI:724472388 розсівають на чашки Петрі із трипто-казеїновим соєвим агаром для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 34 °C (48 год).

ТП 5.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії *S. yabuuchiae* GI:724472388 із чашок Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним трипто-казеїновим соєвим агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування становить 48 годин, температура 34 °C. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л зі стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) вносять простерилізовану композицію Б (від ДР 4.1.2), вносять запасний розчин CaCl₂ (від ДР 3.1), додають 70 мл гліцерину (відходи виробництва біодизелю), перемішують і розливають по 145 мл у 7 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. yabuuchiae* GI:724472388 (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (200 об/хв) при температурі 34°C упродовж 48 год, після чого визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 2,8 – 2,9 г/л, і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 5.5. Вирощування в інокуляторі об'ємом 20 л

У посівний апарат (I-11) із композицією А (від ДР 4.2.1), через засівну колбу додають 700 мл гліцерину, вмикають перемішувачий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 5.4). Культивують при температурі 34°C і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30 \%$ від насичення повітря) упродовж 24 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 2,8 – 2,9 г/л.

ТП 5.6. Вирощування в інокуляторі об'ємом 200 л

У посівний апарат (I-16) із композицією А (від ДР 4.3.1), зі збірника (З-15) додають 6,9 л гліцерину, вмикають перемішувачий пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.2) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора (I-11) посівний матеріал (від ТП 5.5). Культивують при температурі 34°C і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30 \%$ від насичення повітря) упродовж 24 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 2,8 – 2,9 г/л.

ТП 5.7. Вирощування в інокуляторі об'ємом 2 м³

У посівний апарат (І-27) із композицією А (від ДР 4.4.1), зі збірника (З-22) самоплином додають 68,4 л гліцерину, вмикають перемішувачий пристрій і доводять із реактора-змішувача (Р-25) 6%-им розчином NaOH самоплином (від ДР 2.2.3) рН середовища за показником датчика рН до 6,8-7,0. Через трубу перетискування подають з інокулятора (І-16) посівний матеріал (від ТП 5.6). Культивують при температурі 34°C і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30$ % від насичення повітря) упродовж 24 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси, яка повинна становити 2,8 – 2,9 г/л.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 20 м³

У виробничий ферментер (ФР-37) об'ємом 20 м³ перистальтичним насосом (Н-35) подається простерилізоване в УБС (УБС-34) середовище (від ДР 4.5.1), зі збірника (З-33) відцентровим насосом (Н-36) подають 711 л гліцерину та вмикають перемішувачий пристрій. Через трубу перетискування подають з інокулятора (І-27) посівний матеріал (від ТП 5.7). Культивують при температурі 34°C і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30$ % від насичення повітря) упродовж 24 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Через 72 год і 96 год культивування у ферментер зі збірника (З-33) відцентровим насосом (Н-36) подають гліцерин порціями по 371 л. Загальний час культивування складає 144 год.

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (5,7 – 5,8 г/л) та концентрації гелану (52,6 г/л).

Після закінчення процесу біосинтезу культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-38) у цех виділення цільового продукту.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Оскільки культивування бактерій *S. yabuuchiae* GI:724472388 з метою одержання гелану проводиться в асептичних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на усіх етапах промислового виробництва, щоб підтвердити відсутність сторонньої мікробіоти. Протягом усього часу культивування періодично (кожні 4 години) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю поживних середовищ, посівного матеріалу, а також для контролю показників росту і біосинтезу: концентрації гелану та біомаси бактерій; контролю рівня джерела азоту (NH₄Cl) та джерела вуглецю (гліцерин) у середовищі.

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводиться двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища та мікроскопіювання. Культуральну рідину розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, із сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для дріжджів і грибів. Згодом чашки інкубують за температури 28 – 30 °С (МПА) та 24 – 26 °С (СА або ГКА). Після інкубації чашки розглядають на наявність сторонньої мікрофлори [104].

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі. Для приготування препарату в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять 10 мкл культуральної рідини на предметне скло, на якому попередньо нанесений нігрозин [11]. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи.

За відсутності у зразку контамінації під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Sphingomonas yabuuchiae* GI:724472388 (рис. 8.1).

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Лавфенюк М.А.</i>				<i>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Пироз Т.П.</i>						72	97
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i> ⁷⁴		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Бактерії є нерухомими, грамнегативними, спор не утворюють, мають паличкоподібну форму, розмір клітин складає $2,5 \times 0,5$ мкм [44].

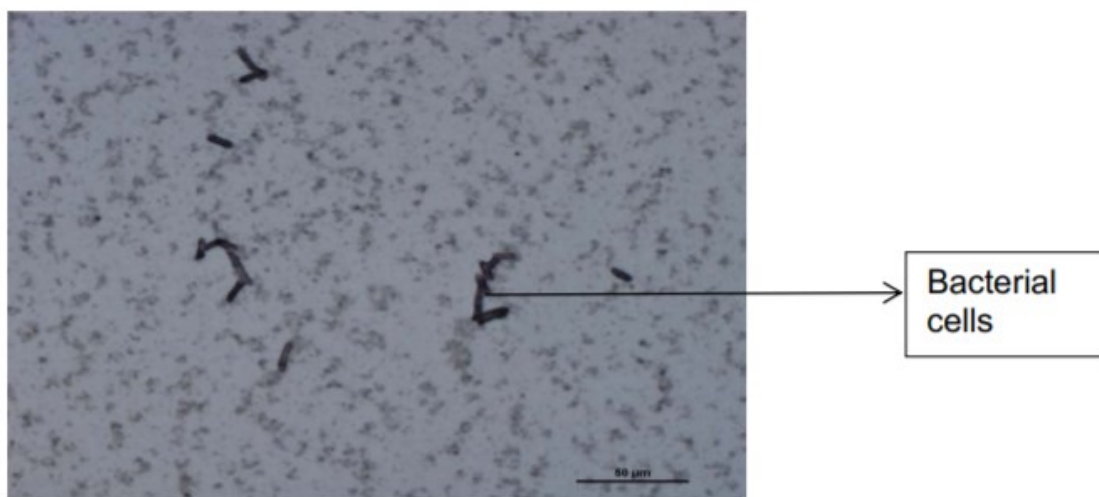


Рис. 8.1. Зображення клітин *Spingomonas yabuuchiae* GI:724472388 у світловому мікроскопі [11]

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають ваговим методом. Осад клітин після центрифугування культуральної рідини промивають водою і висушують до постійної маси [105].

8.2.2. Визначення кількості синтезованого цільового продукту

Концентрацію гелану визначають за використання вагового методу. ЕПС осаджують із культуральної рідини етанолом, осад промивають чистим етанолом і висушують до постійної маси, від маси наважки віднімають масу клітин [105].

8.2.3. Визначення концентрації джерела Карбону та Нітрогену

Джерелом Карбону при культивуванні *S. yabuuchiae* є технічний гліцерин, визначення концентрації якого проводять за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. Концентрацію гліцерину визначають у супернатанті, попередньо профільтрованому через фільтр Millipore (0,22 мкм), на колонці Hi-Plex H (100 × 7,7 мм, Polymer labs, США) із рефрактометричним детектором.

Рухома фаза 5 мМ розчин H₂SO₄, швидкість потоку 0,7 мл/хв, температура 65 °С [11].

Джерелом Нітрогену при культивуванні *S. yabuuchiae* є амоній хлорид, визначення концентрації якого проводять при використанні метода Неслера. Іони амонію взаємодіють із реактивом Неслера з утворенням забарвленого в жовто-коричневий колір сполуки, екстинцію якої визначають спектрофотометрично при 430 нм з подальшим перерахунком за калібрувальним графіком [106].

8.3. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1

Номер контрольно-ї точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Повітрозабірник Висота забору повітря	-	Під час купівлі та при встановленні	H = 16 м
Кт 1.2 <i>Очистка від грубих домішок</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через фільтр грубої очистки	E = 90%
Кт 1.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Тиск, температура	Манометр, термометр	Після компресування	P = 0,35-0,5 МПа, t = 120-250°C
Кт 1.4 <i>Охолодження і видалення зайвої вологи</i>	Охоложене повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після охолодження і видалення вологи	t = 25-35°C, W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після нагрівання	t = 40-50°C, W = 50%
Кт 1.6 <i>Очищення у головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очистки, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після проходження через головний фільтр	E = 95%

Кт, Км 1.7 <i>Очищення в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, мікробіологічна чистота	Перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра, мікробіологічний контроль	Після проходження через індивідуальний фільтр	E = 99,999%, КУО - 0
Кх 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 <i>Приготування розчину соляної кислоти</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після приготування розчину	C = 6%
Кт, Кх, Км 2.2.1, 2.2.2 <i>Приготування і стерилізація розчину натрію гідроксиду для вироцування інокуляту у посівних апаратах об'ємами 20 і 200 л</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, час, концентрація, стерильність	Манометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, C = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 2.2.3 <i>Приготування і стерилізація розчину натрію гідроксиду для вироцування інокуляту у посівному апараті об'ємом 2 м³</i>	Розчин натрію гідроксиду Тиск, температура, час, концентрація, стерильність	Манометр, термометр, годинник, фізико-хімічний метод, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, тривалість, тиск і температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 40 хв, C = 6%, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 <i>Приготування і стерилізація запасного розчину кальцію хлориду</i>	Розчин кальцію хлориду Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти

<p>Кт, Км 4.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вироцування інокуляту у колбах на качалках</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 4.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, час, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість і тиск визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>Р = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 4.2.1, 4.3.1, 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту у посівних апаратах об'ємами 20, 200 л і 2 м³</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, рН, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура і рівень рН визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>Р = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кт, Км, Кх 4.5.1 Приготування і стерилізація поживного середовища для вироццування інокуляту для виробничого біосинтезу у ферментері 20 м³</p> <p>Приготування і стерилізація композиції А в УБС</p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, тиск, температура визначаються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °C, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури</p>	<p>Колекційна культура <i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GI:724472388 температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>Холодильник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура – безперервно при зберіганні, мікробіологічний контроль – кожні 3-4 місяці</p>	<p>t = 2 – 4 °C, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури</p>	<p>Робоча культура <i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GI:724472388 на чашках Петрі температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p>t = 34 °C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.3 Вирощування культури на щільному середовищі</p>	<p>Робоча культура <i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GI:724472388 у пробірках температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p>t = 34 °C, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

<p>Кт, Км 5.4 <i>Вирощування культури у колбах на качалках</i></p>	<p>Посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і частота обертів мішалки контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль проводять після вирощування</p>	<p>$t = 34\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $w = 200$ об/хв, $C_b = 2,8 - 2,9$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.5, 5.6, 5.7 <i>Вирощування культури в інкуляторах об'ємом 20 л, 200 л та 2 м³</i></p>	<p>Посівний матеріал Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО₂, ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>$t = 34\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\text{pH} = 6,8 - 7,0$, $\text{pO}_2 = 20 - 30\%$, $w = 320$ об/хв $C_b = 2,8 - 2,9$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 6.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 20 м³</i></p>	<p>Культуральна рідина Температура, час, рН, концентрація розчиненого кисню, концентрація біомаси, концентрація гелану, мікробіологічна чистота,</p>	<p>Датчик температури, годинник, тахометр, датчик рО₂, ротаметр, центрифуга, електронні ваги, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура, рН, частота обертів мішалки і концентрація розчиненого кисню контролюються автоматично під час вирощування, визначення концентрації біомаси, гелану і мікробіологічний контроль – кожні 4 год і після культивування</p>	<p>$t = 34\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\text{pH} = 6,8 - 7,0$, $\text{pO}_2 = 20 - 30\%$, $w = 320$ об/хв $C_b = 2,8 - 2,9$ г/л, $C_g = 52,6$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Barcelos M. C. S., Vespermann K. A. C., Pelissari F. M., Molina G. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019, 60 (9): 1475-1495. doi: 10.1080/10408398.2019.1575791.
2. Hundschell C. S., Wagemans A. M. Rheology of common uncharged exopolysaccharides for food applications. *Current Opinion in Food Science*. 2019, 27: 1 – 7. doi: 10.1016/j.cofs.2019.02.011.
3. Ullah S., Khalil A. A., Shaukat F., Song Y. Sources, Extraction and Biomedical Properties of Polysaccharides. *Foods*. 2019, 8 (8): 304. doi:10.3390/foods8080304
4. Jindal N., Singh Khattar J. Microbial Polysaccharides in Food Industry. *Biopolymers for Food Design*. 2018, 95–123. doi: 10.1016/b978-0-12-811449-0.00004-9.
5. Поліон Н. М., Дюдюн А. Д., Горбунцов В. В., Антипова Ж. А. Акне і акне-подібні дерматози. *Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология*. 2018, 87–98.
6. Новоселов А.В., Новоселов В.С., Соснова Е.А., Капительный В.А. Акне как междисциплинарная проблема. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева*. 2017, 4 (1): 29–35. doi: 10.18821/2313-8726-2017-4-1-29-35.
7. Губина-Вакулик Г.И., Бронова И.М. Патогенетическая терапия акне и патоморфологические аспекты изменений кожи в процессе саногенеза. *ВІСНИК ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»*. 2017, 2 (58): 98–107.

НУХТ БТЕК 04.01.1 КР ПЗ				
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата
Розробник		Парфенюк М.А.		
Керівник		Пирог Т.П.		
Н. контр				
Консульт				
Зав. каф.		Стадніков В.П.		
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ			Літера	Аркциш
				79
			Аркцишів	
			97	
			Кафедра БТМ 81	

8. Петрова К. С., Колбина М. С. Акне и эпидермальный барьер. *Клиническая дерматология и венерология*. 2015, 1: 90–93. doi: 10.17116/klinderma2015190-93.
9. Широкова И., Сидорова И. Диагноз — акне. *Ремедиум*. 2014, 48–53.
10. Moscovici M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6: 1012. doi: 10.3389/fmicb.2015.01012.
11. Raghunandan K., Kumar A., Kumar S., Permaul K., Singh S. Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas* spp. *3 Biotech*. 2018, 8 (1): 71. doi: 10.1007 / s13205-018-1096-3.
12. Wang D., Kim H., Lee S., Kim D.-H., Joe M.-H. Improved gellan gum production by a newly-isolated *Sphingomonas azotifigens* GL-1 in a cheese whey and molasses based medium. *Process Biochemistry*. 2020: 269–278. doi: 10.1016/j.procbio.2020.02.020.
13. Zhu G., Sheng L., Tong Q. Enhanced gellan gum production by hydrogen peroxide (H₂O₂) induced oxidative stresses in *Sphingomonas paucimobilis*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013, 37 (4): 743–748. doi: 10.1007 / s00449-013-1030-3.
14. Lee S. Y., Ahn J.-Y., Kim M., Sekhon S. S. Phenotypic and proteomic analysis of positively regulated gellan biosynthesis pathway in *Sphingomonas elodea*. *Animal Cells and Systems*. 2017, 21 (2): 115–123. doi: 10.1080/19768354.2017.1290678.
15. Zhang J., Dong Y., Fan L., Jiao Z., Chen Q. Optimization of culture medium compositions for gellan gum production by a halobacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 115: 694-700. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.029.
16. Zia K. M., Tabasum S., Khan M. F., Akram N. Recent trends on gellan gum blends with natural and synthetic polymers: A review. *International Journal of*

- Biological Macromolecules*. 2018, 109: 1068 – 1087. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.099.
17. Prajapati V. D., Jani G. K., Zala B. S., Khutliwala T. A. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 93 (2): 670-8. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.030.
18. Coelho J., Eusébio D., Gomes D., Frias F. Biosynthesis and isolation of gellan polysaccharide to formulate microspheres for protein capture. *Carbohydrate Polymers*. 2019, 220: 236-246. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.011.
19. Li A., Hu T., Luo H., Alam N., Xin J., Li H. A Carotenoid- and Poly- β -Hydroxybutyrate-Free Mutant Strain of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461 for the Commercial Production of Gellan. *mSphere*. 2019, 4 (5): e00668-19. doi: 10.1128/mSphere.00668-19.
20. Tong K., Xiao G., Cheng W., Chen J., Sun P. Large amplitude oscillatory shear behavior and gelation procedure of high and low acyl gellan gum in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 2018: 397-405. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.043.
21. Нурахметова Ж.А., Татыханова Г.С., Кудайбергенов С.Е. Имобилизованные в матрицу геллана противоопухолевые препараты и наночастицы металлов: достижения и перспективы применения. *Вестник КазНУ. Серия химическая*. 2020, 4: 33-36. doi: 10.15328/cb1169.
22. Зайнуллина А.Ш., Песириди Я.Ю., Эсмуханова Г.О.. Исследование вязкостных свойств буровых растворов на основе полисахарида геллана. *Вестник Алматинского технологического университета*. 2017, 2 (115): 96-100.
23. Hellriegel J., Günther S., Kampen I., Albero A. B. A Biomimetic Gellan-Based Hydrogel as a Physicochemical Biofilm Model. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2014, 5 (2): 83-95. doi: 10.4236 / jbnb.2014.52011.
24. Younes M., Aggett P., Aguilar F., Crebelli R. Re- evaluation of gellan gum (E 418) as food additive. *EFSA Journal*. 2018, 16 (6): e05296. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5296.

25. Геллановая камедь. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://prodobavki.com/dobavki/E418.html?page=all>.
26. Стабилизатор E418 (Геллановая камедь). [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://dukan-menu.com/supplement/e418.htm>.
27. E418 Геллановая камедь. [Электронный ресурс] – режим доступа: http://edobavki.net/dobavki/dobavki_opn.php?idd=208.
28. McGuffey J. C., Leon D., Dhanji E. Z., Mishler D. M. Bacterial Production of Gellan Gum as a Do-It-Yourself Alternative to Agar. *Journal of microbiology & biology education*. 2018, 19 (2): 1-3. doi:10.1128/jmbe.v19i2.1530.
29. Патент России на изобретение № 2592682. Микробиологическая питательная среда и ее применение / Лёгтенбёргер Х.-Ю., Фибих К. Оpubл. 07.02.2013.
30. Costa L. , Silva-Correia J., Oliveira J. M., Reis R. L. Gellan Gum-Based Hydrogels for Osteochondral Repair. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018, 1058: 281-304. doi: 10.1007/978-3-319-76711-6_13.
31. Дыкман Л. А., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы. *Acta naturae*. 2011, 2 (9): 36-54.
32. Кашуба О. В. Порівняльні особливості побічних реакцій, спричинених нестероїдними протизапальними препаратами диклофенаком та німесулідом. *Укр. Мед. Часопис*. 2009, 2 (70): 129-135.
33. Goh C. F., Lane M. E. Formulation of diclofenac for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, 473 (1-2): 607–616. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.052.
34. Mahdi M. H., Conway B. R., Mills T. and Smith A. M. Gellan Gum Fluid Gels for Topical Administration of Diclofenac. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, 515 (1-2): 535-542. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.10.048.
35. Gelrite® for microbiology. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.carlroth.com/com/en/carragene/gelrite/p/0039.1>.

36. GELRITE TM. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/G1101>.
37. Геллановая камедь KELCOGEL® F (E418), Милорада. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://milk.ingredients.pro/ingredients/7401/>.
38. KELCOGEL® F Геллановая камедь. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.cpkelco.com/products/gellan-gum/kelcogel-f-gellan-gum-i-cp-kelco/>.
39. Геллановая камедь с низким содержанием ацила F. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.chefsteps.com/ingredients/kelcogel-f-low-acyl-gellan-gum>.
40. KELCOGEL F. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://xn----ftbcdqelvdaxkld.xn--p1ai/produktsiya/pishhevye-dobavki/zheliruyushhie-veshhestva-geli-i-zagustiteli/kelcogel-f/>.
41. Pirog T. P., Ivakhniuk M. O., Voronenko A. A. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste. *Biotechnologia Acta*. 2016, 9 (2): 7–18. doi: 10.15407/biotech9.02.007.
42. Veiga S., Bussi J. Steam reforming of crude glycerol over nickel supported on activated carbon. *Energy Conversion and Management*. 2016, 141: 79–84. doi:10.1016/j.enconman.2016.04.103.
43. Li Y., Kawamura Y., Fujiwara N., Naka T., Liu H., Huang X., Kobayashi K., Ezaki T. *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*. 2004, 54 (3), 819–825. doi: 10.1099/ijms.0.02829-0.
44. The Bacterial Diversity Metadatabase. *Sphingomonas yabuuchiae*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/strain/14232>.
45. *Sphingomonas yabuuchiae*. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=11416.
46. Feng G.-D., Yang S.-Z., Xiong X., Li H.-P. and Zhu H.-H. *Sphingomonas spermidinifaciens* sp. nov., a novel bacterium containing spermidine as the ma-

- gor polyamine, isolated from an abandoned lead–zinc mine and emended descriptions of the genus *Sphingomonas* and the species *Sphingomonas yantingensis* and *Sphingomonas japonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017, 67: 2160–2165. doi: 10.1099/ijsem.0.001905.
47. Ahn J.-H., Kim B., Kim S.-J., Lee G.-H., Song J., Kwon S.-W. and Weon H.-Y. *Sphingomonas parvus* sp. nov. isolated from a ginseng-cultivated soil. *Journal of Microbiology*. 2015, 53, (10): 673–677. doi: 10.1007/s12275-015-5132-2.
48. Корюкина Е. Б., Селиванов Д. И. Комплексная терапия акне с применением средств линии лечебной косметики «Торісгем» для жирной и комбинированной кожи. *Южно-Уральский медицинский журнал*. – 2016, 3: 14–17.
49. Винцерская Г.А., Нгема М.В., Прохоров Д.В., Кузнецова М.Ю., Шеренговская Ю.В. Комплексное применение продуктов косметики линии А «Скинормил» при уходе за кожей больных угревой болезнью. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2019, 95(2): 81–86. doi: 10.25208/0042-4609-2019-95-2-81-86.
50. Дурягина Е.Н., Вайнштейн В.А. Разработка лекарственно-косметических средств для комплексного лечения и профилактики угревой болезни (акне) на основе лекарственного растительного сырья. – Санкт-Петербург. – 2017. С. 148-151.
51. THE ORDINARY / Glycolic Acid 7% Toning Solution 240ml Гликолевый тонер/тоник Очищение, лечение акне и воспалений. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.wildberries.ru/catalog/15768348/detail.aspx?targetUrl=ES>.
52. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

53. Glycerolipid metabolism - *Sphingomonas koreensis*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?skr00561.
54. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Sphingomonas paucimobilis*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?spau00010.
55. Citrate cycle (TCA cycle) - *Sphingomonas paucimobilis*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?spau00020.
56. Glyoxylate and dicarboxylate metabolism - *Sphingomonas paucimobilis*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?spau00630.
57. Starch and sucrose metabolism - *Sphingomonas paucimobilis*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?spau00500.
58. Pentose and glucuronate interconversions - *Sphingomonas sp.* MM-1. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?sphm00040.
59. Fructose and mannose metabolism - *Sphingomonas paucimobilis*. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?spau00051.
60. Kumar L. R., Yellapu S. K., Tyagi R. D. A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresource Technology*. 2019, 293: 1-11. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122155.
61. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
62. Грегірчак Н.М. Мікробіологія, санітарія і гігієна виробництв з основами НАССР [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання / Н.М.Грегірчак – К.: НУХТ, 2020. – 177 с.

63. Межгосударственный стандарт ГОСТ 2263-79. Натр едкий технический. Технические условия. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200018988>.
64. Гидроксид натрия (каустическая сода, едкий натр, каустик). [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.systopt.com.ua/ru/item-natrij-gidroksyd>.
65. БИОМОЙ® - предстерилизационное средство. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.farmakos.ua/bimoj.html>.
66. Биомой, методические рекомендации (инструкция по применению). [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://dezmed.com.ua/ru/instruktsiia/item/bimoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>.
67. Дезинфектант «ЕСТЕР ДЕЗ» – новинка ТОВ НВП «Електрогазохім». [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://harch.tech/2021/03/03/ester/>.
68. Дезинфектант "ЕСТЕР ДЕЗ". [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://egh-ingredients.com/catalog/dlya-dezinfektsii/ester-dez/>.
69. Инструкция по применению дезинфицирующего средства «РЗ-Топакс 990» для дезинфекции на предприятиях пищевой промышленности. [Электронный ресурс] – режим доступа: http://niid.ru/s/210/files/instrukcii_dezсредства/dezinfekciya_i_sterilizaciya/128_154_606.pdf.
70. Засіб дезінфекційний на основі перекису водню "Фамідез Саноксіл 100", 1000 мл. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://clean-ua.com/famidez-sanoksil-100-1000ml/>.
71. Фамідез® Саноксіл 100. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://famidez.ua/index.php/produksiya/dezinfektsiya/spetsialni-zasoby/sanoksil-100>.

72. Воздухосборник А1И 021.000. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://tt-k.ru/Vozduhosbornik_021.000.htm.
73. Воздушный кассетный фильтр ФВКАС-6. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://eurofilter.ru/catalogue/17/96/>.
74. Турбокомпрессоры ID TURBO COMPRESSOR серії T2 (IHI-DALGAKIRAN). [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-t2/>.
75. Промислові осушувачі повітря Hankison рефрижераторного типу. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://dalgakiran.ua/uk/products/promyslovi-osushuvachi-povitrya-hankison-refryzheratornogo-typu/>.
76. Ресиверы ZELKO. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://www.zelko.ua/vozduhopodgotovka/resivery?gclid=CjwKCAjw49qKBhAoEiwAHQVTo3bIMXMTbTvK7Ytv9QptHJcJ7JPXTFOv9ZlUH1KtZ2kqsVZ5UHSp6xoC4LIQAvD_BwE.
77. Водяной нагреватель Вентс НКВ 400x200-2. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://olvent.ua/vents-nkv-400h200-2/?gclid=CjwKCAjw49qKBhAoEiwAHQVToICEfOuq2pHgIzh0TxMM1AAieOaNj8clGCMkl3PKBKp1OSyGcBizRoCLpoQAvD_BwE.
78. Компактные карманные фильтры от NEW FILTER. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/kompaktnye-karmannye-filtry-fvkom-w-tipa_.html.
79. SPF серия, стерильные фильтры в нерж. корпусе, 16 бар. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://www.remeza.com/catalog/system_compressed/air_filters/spf_series/.
80. Установки приготовления эмульсий и суспензий серии УПЭС для производственных цехов. [Электронный ресурс] – режим доступа:

https://www.prombiofit.com/Equipment/upes.html?gclid=Cj0KCCQiAsqOMBhDFARIsAFBTN3efgEGEiBXclmmOthHtByjKPyTLz7zhMM88mHHnqOFLlA0ptw3zP2waAlMdEALw_wcB.

81. Установки приготовления эмульсий и суспензий серии УПЭС для лабораторных, учебных целей и опытных производств (объём рабочей ёмкости 10 или 20 литров). [Электронный ресурс] – режим доступа: https://www.prombiofit.com/Equipment/upes_lab.html.
82. Мембранный насос для рідин 1,5 л/хв. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://prom.ua/p860452263-membrannyj-nasos-dlya.html>.
83. ФЕРМЕНТЕРЫ И БИОРЕАКТОРЫ. BioFlo*4500. Каталог AWTech.
84. ULPA фильтры. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.thenowfilter.com/ulpa-filters-16188039583111142.html>.
85. Малогабаритные и лабораторные аппараты с механическими перемешивающими устройствами. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://mash-him.ru/apparaty-s-peremeshivayushhimi-ustrojstvami>.
86. Насос поверхностный Speroni CAM INOX 80-HL. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://teploradost.com.ua/nasos-poverhnostnyj-speroni-cam-inox-80hl>.
87. Аппараты стальные эмалированные с механическим перемешивающим устройством. [Электронный ресурс] – режим доступа: http://euromash.kiev.ua/ru/aparati_ema_mehanicheskim_perem_ustrojstvom_ru.php.
88. CATALOG-Bioreactor-System-Innova. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>.
89. Фильтры ULPA. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://folter.com.ua/catalog/fyasul5u16>.
90. Весовой дозатор 0,1 - 60 кг. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://agro-teh.com.ua/p565239385-vesovoj-dozator.html>.

91. Промышленные аппараты с механическими перемешивающими устройствами. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://mash-him.ru/promyshlennye-apparaty>.
92. Лічильник дозатор для КАС, воды, дизпалива ДТ до 400 л/м. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://prom.ua/p491625353-elektronnyj-promyshlennyj-dozator.html>.
93. Центробежный поверхностный насос Speroni CBM 152. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://teploradost.com.ua/centrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos-speroni-cbm-152?gclid=Cj0KCQjwnoqLBhD4ARIsAL5JedK2kv3IrTesdrxV9UmHS4lMHlmdrnIGWavI3jMyDPmtoGZxHcElzhsaAvFPEALw_wcB.
94. Standard models for 5 ltr autoclave. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://amarequip.com/docs/500ml-5ltr%20Stirred%20Pressure%20Reactor%20Catalog.pdf>.
95. Дозатор жидкости, воды, молока, пива и других напитков по объёму. Точный порционный розлив и дозирование. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://prom.ua/p1493971053-dozator-zhidkosti-vody.html?>
96. Allegro™ STR Single-Use Stirred Tank Bioreactors. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://shop.pall.com/us/en/biotech/cell-culture/bioreactors/zidhslqw8fu?_ga=2.219219933.538410990.1634891458-1120111332.1634891458.
97. Турбинная насадка. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://loip.ru/catalog/ika/aksessuary-komplektuyushchie/turbinnaya-nasadka/>.
98. Дозатор воды и жидкостей. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://agro-teh.com.ua/p370228267-dozator-vody-zhidkостей.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjwtrSLBhCLARIsACh6Rmg3hZ-cvrBWpA8goQ-8Oxmi2D6GbLGCLWzYTABpFEqO4zkhM4ft2A4aArhCEALw_wcB.

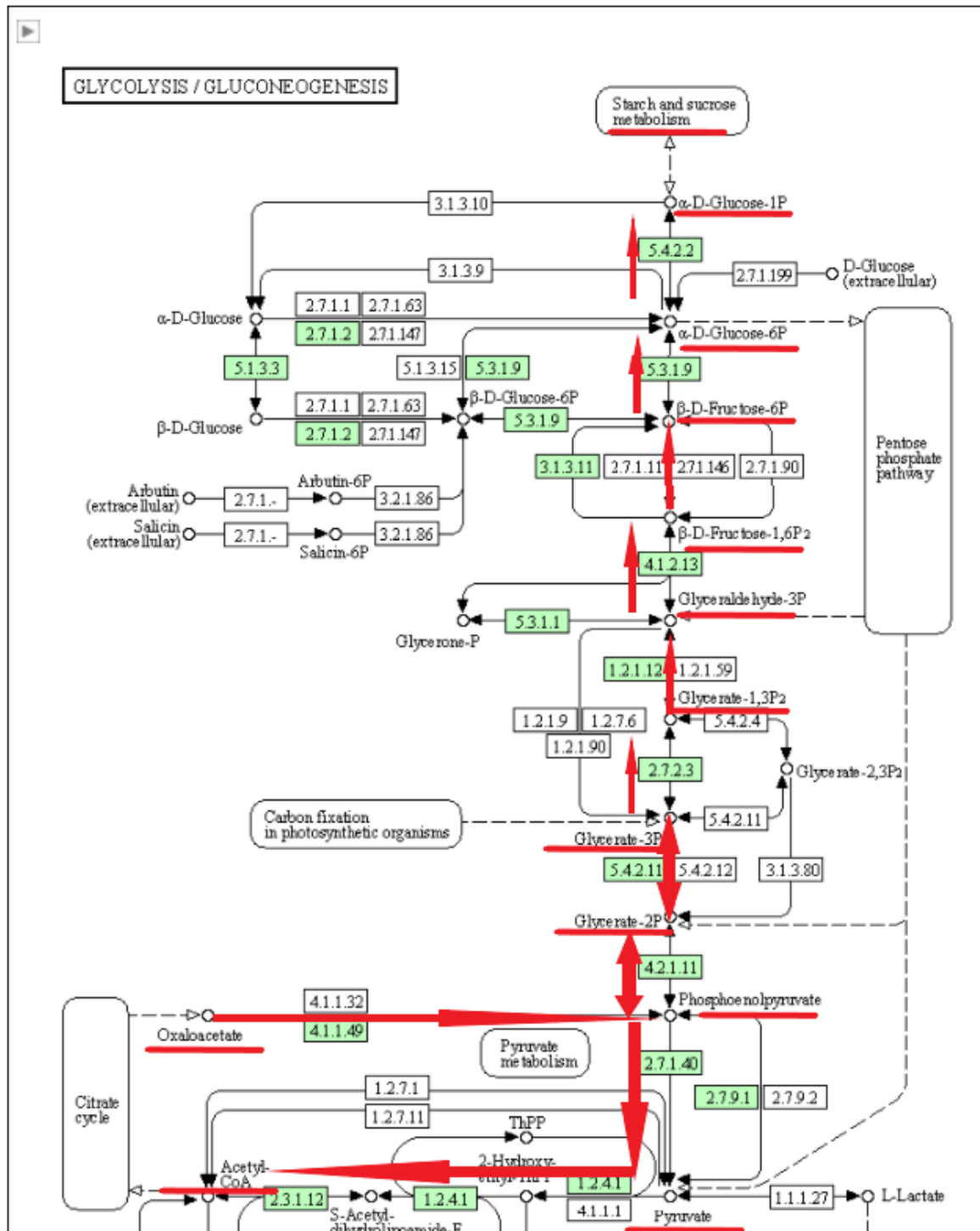
99. Центробежный поверхностный насос Speroni CS 50-160 D 3 кВт. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://teploradost.com.ua/centrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos-speroni-cs-50160-d-3-kvt>.
100. Перистальтические насосы PT&PTL. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://tapflo.ua/images/pdf_uk/pt_ptl_ua.pdf.
101. Насос поверхностный Speroni CAM 100 HL. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://teploradost.com.ua/nasos-poverhnostnyj-speroni-cam-100-hl>.
102. Pfaudler DIN BE Reactors. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.pfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.
103. Соляна кислота концентрована 31%. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://prom.ua/p1151873261-solyanaya-kislota-kontsentririvannaya.html?&primelead=My4yNg>.
104. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
105. Giavasis I., Petrotos K. Biovalorization of Olive Mill Waste Water for the Production of Gellan Gum from *Sphingomonas paucimobilis*. *British Biotechnology Journal*. 2016, 11(2): 1–15. doi: 10.9734/BBJ/2016/22510.
106. Malek R., Bonnarme P., Irlinger F., Frey-Klett P., Onésime D. Transcriptomic response of *Debaryomyces hansenii* during mixed culture in a liquid model cheese medium with *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 264: 53–62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.026.



Glycolysis / Gluconeogenesis - *Sphingomonas paucimobilis*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file |

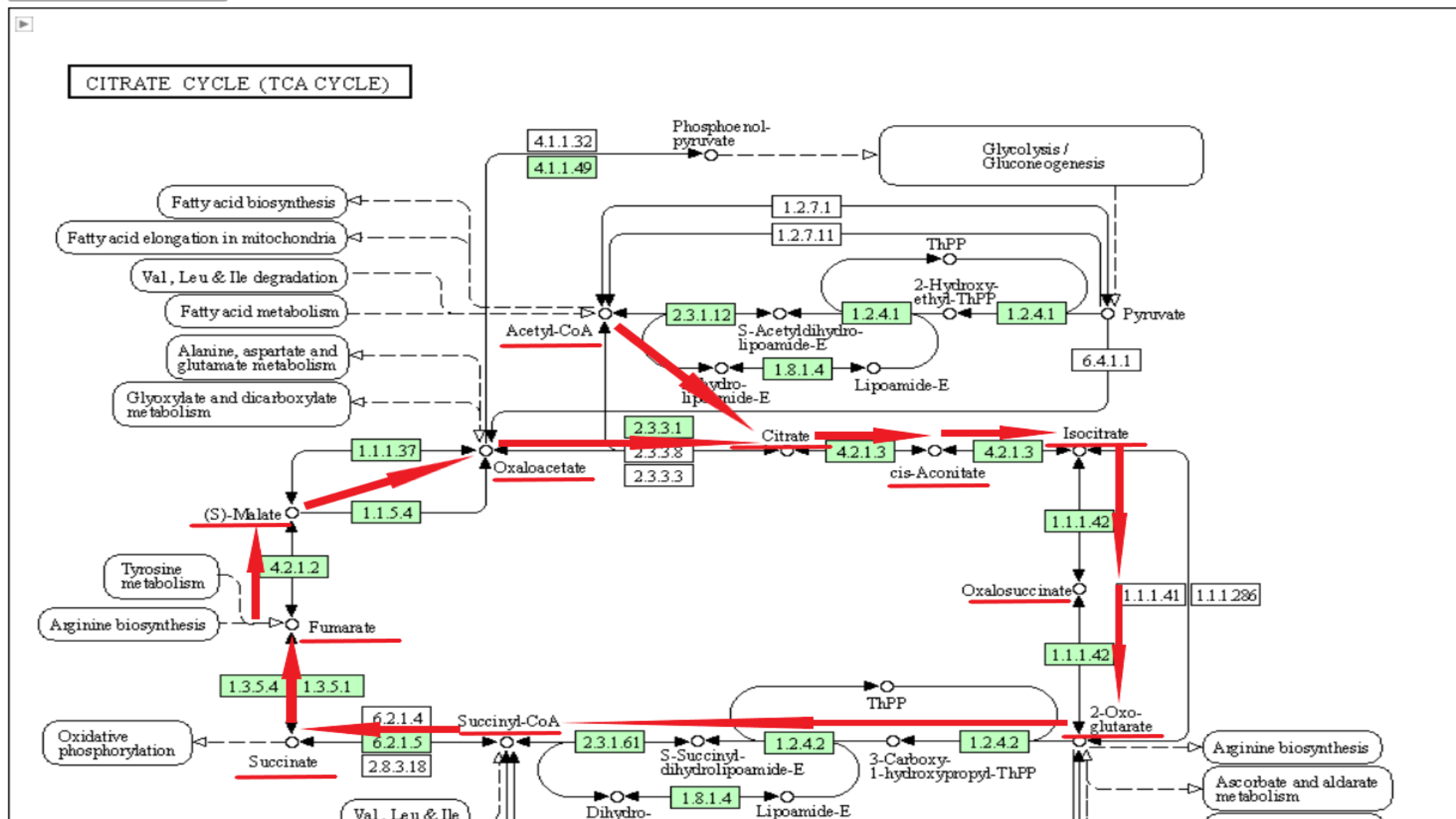
Change pathway type



CGG Citrate cycle (TCA cycle) - *Spingomonas paucimobilis*

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Show description | Image (png) file | Help]

Change pathway type





Pentose and glucuronate interconversions - *Sphingomonas* sp. MM-1

[Pathway menu | Pathway entry | Download KGML | Image (png) file | Help]

Change pathway type

