

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

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

« » червня 2023 р.

« » червня 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: Біосинтез сукционату *Actinobacillus succinogenes*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3

КУХАРОВА Марія Костянтинівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Олена СЕМЕНОВА _____
(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) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2023 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

“ 01 ” березня 2023 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КУХАРОВА Марія Костянтинівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

Тема роботи Біосинтез сукционату *Actinobacillus succinogenes*

керівник роботи СУЛЕЙКО Тетяна Леонідівна, асистент

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент *Actinobacillus succinogenes*
NJ113, сукцинат, виробничий ферментер об'ємом 6,3 м³, коефіцієнт
заповнення-0,7

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Розділ 1. Характеристика сукционату, Розділ 2. Обґрунтування вибору
біологічного агента, складу поживних середовищ, 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, Розділ 8. Методи
ідентифікації цільового продукту та визначення показників його біологічної
дії, Розділ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації
виробництва, Розділ 10. Нормативно-технічна документація, використана під
час проектування виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Апаратурна схема-1 аркуш формат А1.
Технологічна схема- 1 аркуш формат А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
11	Характеристика сукцинату	01.03.2023 - 6.03.2023	
22	Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ	6.03.2023-12.03.2023	
33	Техніко-економічне обґрунтування	13.03.2023-19.03.2023	
44	Біосинтез цільового продукту	20.03.2023-26.03.2023	
55	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.03.2023-02.04.2023	
66	Специфікація обладнання	03.04.2023-09.04.2023	
77	Опис технологічної схеми	10.04.2023-16.04.2023	
88	Методи ідентифікації цільового продукту та визначення показників його біологічної дії	17.04.2023-23.04.2023	
99	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	24.04.2023-01.05.2023	
110	Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	02.05.2023-09.05.2023	
111	Оформлення пояснювальної записки	10.05.2023-22.05.2023	
112	Виконання графічної частини курсового проекту	23.05.2023-31.05.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Марія КУХАРОВА
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна СУЛЕЙКО
(ім'я та прізвище)

Реферат

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню біотехнології отримання бурштинової кислоти культивуванням *Actinobacillus succinogenes*.

Проведено порівняння мікроорганізмів для промислового біологічного синтезу сукцинату, в результаті якого було визначено найкращого продуцента бурштинової кислоти: *Actinobacillus succinogenes* NJ113, якому притаманна найменша умовна вартість 1 г продукту (0,346 грн/г) та найбільший показник синтезованого продукту за годину (2,16 г/год), в порівнянні з іншими.

Оглянуто сучасні сфери застосування бурштинової кислоти, та проведено розрахунок її річної потреби, яка складає 25,91 т, для використання в хімічній промисловості з метою синтезу полібутиленсукцинату. На основі визначеної потреби, проведено розрахунок потужності виробництва, для задоволення якої необхідно провести 143 виробничих цикли в ферментері об'ємом 6,3 м³.

Розроблено технологічну та апаратурну схеми біосинтезу бурштинової кислоти, які передбачають наявність допоміжних робіт (підготовка вуглекислого газу, приготування і стерилізація підживлювального розчину сахарози, титрувальних агентів для регуляції рівня рН поживного середовища, та поживного середовища) і технологічного процесу (отримання посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 та виробничий біосинтез сукцинату).

Кваліфікаційна робота складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (66 посилань), апаратурної та технологічної схеми (2 аркуші формату А1). Загальний обсяг роботи складається з 71 сторінки, 6 рисунків та 14 таблиць.

Ключові слова: *Actinobacillus succinogenes* NJ113, сукцинат, бурштинова кислота, *Actinobacillus*, виробничий синтез, полібутиленсукцинат.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кухарова М.К.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				2	69
Консультант					РЕФЕРАТ Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

Зміст

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СУКЦИНАТУ	8
1.1. Фізико-хімічні властивості сукцинату.....	8
1.2. Практичне застосування сукцинату	8
1.3. Добування сукцинату	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА, СКЛАДУ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ.....	11
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	11
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113.....	16
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Actinobacillus</i> <i>succinogenes</i> NJ113	17
2.4. Таксономічний статус біологічного агента.....	18
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	20
3.1. Потреба в сукцинаті.....	20
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	21
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	22
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113.....	23
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ СУКЦИНАТУ	28
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	28
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у сукцинат.....	30
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	31
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу сукцинату.....	31
5.1.1. Обґрунтування способу вирощування <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113 і типу ферментера.....	31
5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки вуглекислого газу	32
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	32

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ		
Розроб.		Кухарова М.К.					
Перевір.		Сулейко Т.Л.					
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
					3	69	
					Кафедра БТМ		

5.1.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113 та виробництва сукцинату	38
5.1.4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	38
5.1.4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробництва сукцинату	40
5.1.4.3. Обґрунтування вибору титрувальних агентів та піногасника	41
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	43
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	46
РОЗДІЛ 8. МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СУКЦИНАТУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЙОГО БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ	59
8.1. Мікробіологічний контроль <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	59
8.2. Показники росту і синтезу сукцинату	60
8.2.1. Концентрація біомаси	60
8.2.2. Концентрація сукцинату	60
8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену	60
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	62
РОЗДІЛ 10. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА	66
ЛІТЕРАТУРА	68
ДОДАТКИ	76

Вступ

Бурштинова кислота на сьогодні є важливою сполукою, яка продемонструвала широке застосування в харчовій, хімічній, сільськогосподарській та фармацевтичній промисловості [1].

Бурштинову кислоту можна отримати нафтохімічним або ферментативним шляхом. На сьогодні відомо декілька хімічних технологій виробництва бурштинової кислоти, які включають окислення парафіну та каталітичне гідрування або електролітичне відновлення малеїнової кислоти або малеїнового ангідриду [2]. Однак ці методи проявляють ряд недоліків, а саме вони використовують вичерпні ресурси, в ході реакцій відбувається виділення CO₂, та дані реакції є неекологічними. Останнім часом все більшу увагу привертає біологічне виробництво бурштинової кислоти з відновлюваних природних ресурсів. Завдяки широкому спектру природних ресурсів, екологічно чистим процесам, високому кінцевому титру кислоти та ефективності бродіння, ферментаційне виробництво є конкурентоспроможним порівняно з нафтохімічним синтезом.

Як природний продуцент бурштинової кислоти *Actinobacillus succinogenes* є одним із найбільш перспективних кандидатів завдяки своїй високій продуктивності, широкому спектру використання вуглецю та стійкості до факторів навколишнього середовища. Тому сьогодні вчені проводять дослідження з збільшенням кінцевих показників синтезу даної кислоти використовуючи представників виду *Actinobacillus succinogenes* (створюють рекомбінантні штами або оптимізують умови культивування) [3].

Враховуючи перелічені факти нині є актуальним використання *Actinobacillus succinogenes* NJ113 для синтезу бурштинової кислоти, через невелику умовну вартість кінцевого продукту (0,346 грн/г) та найкращі показники виходу продукту за год (2,16 г/год).

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кухарова М.К.			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					5	69
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Розділ 1. Характеристика сукцинату

1.1. Фізико-хімічні властивості сукцинату

Сукцинат (бурштинова кислота, БК; за номенклатурою ІЮПАК: 1,4-бутандіонова кислота) – α,ω -дикарбонова С4-кислота (рис. 1.1) з молярною масою 118,09 г/моль і константами дисоціації pK_{a1} і pK_{a2} , що дорівнюють 4.2 і 5.6 відповідно. Це безбарвні кристали без запаху (температура плавлення 185-190 °С) з сильноокислим смаком, добре розчинні у воді (близько 83 г/л за 25 °С), в метанолі (158 г/л), етанолі (54 г/л), гліцеролі (50 г/л), ацетоні (27 г/л). Ця сполука є природною для організму, оскільки вона утворюється в циклі трикарбонних кислот (у формі сукцинат-аніону), де грає роль донора електронів у реакції біосинтезу фумарової кислоти та ФАДН₂, що, у свою чергу, сприяє синтезу АТФ в організмі [4, 5].

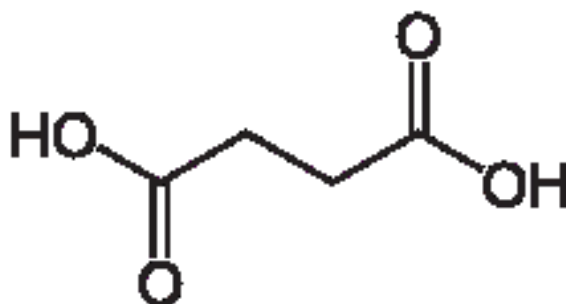


Рис. 1.1. Структура та зовнішній вигляд сукцинату

1.2. Практичне застосування сукцинату

Станом на 2013 р., щорічно у світі виробляється близько 50 тис. тонн сукцинату [6], що зумовлено широким діапазоном застосування цієї речовини. Бурштинова кислота є вихідною для синтезу 1,4-бутандіолу, деяких поліестерів і біорозкладних полімерів, алкідних фарб, пестицидів. Також ця кислота є зареєстрованою (визнана FDA безпечною) як харчова добавка Е363 (належить до групи антиоксидантів і регуляторів кислотності), яку використовують в основному для регуляції кислотності та смаку харчових продуктів і напоїв. Показано, що добавки з сукцинатом можуть

допомогти

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Кухарова М.К.			РОЗДІЛ 1. Характеристика сукцинату			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.							6	69
Консультант								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

зменшити негативні наслідки похмілля (шляхом активації розпаду ацетальдегіду на CO_2 і H_2O), а також стимулювати нервову та імунні систему [4, 5]. Крім цього, існують припущення [5], що сукцинат може посилювати концентрацію та рефлексії. Ще бурштинова кислота може використовуватися як допоміжна речовина у виробництві лікарських препаратів і косметичних засобів за рахунок її властивостей бути регулятором кислотності, буферувальним агентом або контріоном. Є також інформація, що сукцинат стимулює ріст і підвищує врожайність сільськогосподарських рослин. Окрім як у вищезазначених галузях, ця дикарбонова кислота може бути корисною в радіаційній дозиметрії, фотографії, аналітичній хімії [4, 5].

1.3. Добування сукцинату

Спочатку, бурштинову кислоту добували перегонкою з бурштину. Станом на сьогодні, існує декілька способів промислового виробництва цієї речовини [4, 5]:

- гідрування малеїнової кислоти, малеїнового ангідриду або фумарової кислоти;
- окиснення 1,4-бутандіолу молекулярним киснем у водному розчині лугу, озонолізом у водному розчині оцтової кислоти або реакцією з N_2O_4 ;
- карбонілювання етиленгліколю;
- зброджування тартрату амонію (амонійної солі винної кислоти);
- синтез з бутану як вихідної сполуки через малеїновий ангідрид;
- біосинтез з використанням генноінженерних штамів-продуцентів.

Як бачимо, бурштинову кислоту можна отримувати як хімічним синтезом, так і за допомогою біотехнологічних процесів. Враховуючи сьогоденні проблеми з навколишнім середовищем і необхідність зниження собівартості цільових продуктів виробництва, саме біотехнологічним

методам синтезу слід віддавати перевагу, особливо якщо йдеться про такі продукти широкого застосування, як бурштинова кислота.

Розділ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

Враховуючи розвиток конкурентоспроможного мікробіологічного способу виробництва бурштинової кислоти, розглянемо порівняльну характеристику продуцентів бурштинової кислоти яка наведена в табл. 2.1.

Actinobacillus succinogenes NJ113 – факультативно анаеробна грампозитивна бактерія, яка має найменший час культивування (24 год) в порівнянні з іншими мікроорганізмами, має більший показник синтезу бурштинової кислоти (60,4 г/л) в порівнянні з *A. succinogenes* 130Z, але менший в порівнянні з *A. succinogenes* GXAS137, біосинтез відбувається з дробним внесенням джерела вуглецю [8].

Actinobacillus succinogenes 130Z – має невеликий час культивування, даний штам синтезує найменшу кількість бурштинової кислоти (45,6 г/л) порівнюючи з *A. succinogenes* NJ113 та *A. succinogenes* GXAS137, на 14,8 та 19,1 г/л, відповідно, і росте на більш дорожчому поживному середовищі [9].

Actinobacillus succinogenes GXAS137 – має найбільший показник концентрації бурштинової кислоти (64,7 г/л), з найбільшим часом культивування (48 год) в порівнянні з іншими продуцентами, але на відміну від інших використовує в якості джерела нітрогену суміш з порошкоподібного кукурудзяного лікеру та арахісової муки [10].

Розглянувши продуцентів бурштинової кислоти можна зробити висновок, що для вибору оптимального продуцента, даних, наведених в табл. 2.1, не достатньо. Для вибору найкращого біологічного агента необхідно провести порівняння вартості поживного середовища для його культивування.

У табл. 2.2 наведено вартість компонентів поживного середовища для продуцентів бурштинової кислоти.

НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Кухарова М.К.		
Перевір.		Сулейко Т.Л.		
Консультант				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		

РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента, складу поживних середовищ			Літ.	Арк.	Аркушів
				8	69
Кафедра БТМ					

Порівняльна характеристика продуцентів бурштинової кислоти

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація бурштинової кислоти, г/л	Концентрації біомаси, г/л	Умови культивування	Література
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	Глюкоза – 60; Дріжджовий екстракт – 15; Кукурудзяний лікер – 2,5; NaCl – 1,0; MgCl ₂ ×6H ₂ O – 0,2; CaCl ₂ ×2H ₂ O – 0,2; MnCl ₂ – 0,07; C ₂ H ₃ NaO ₂ – 1,4; Na ₂ S×9H ₂ O – 0,16; Na ₂ HPO ₄ – 0,3; NaH ₂ PO ₄ – 1,4; K ₂ HPO ₄ – 1,5.	45,6	3,4	pH 6,4-6,8 300 об/хв 37 °C 36 год CO ₂ – 0,1 л/хв	Cao, W., Wang, Y. Succinic acid biosynthesis from cane molasses under low pH by <i>Actinobacillus succinogenes</i> immobilized in luffa sponge matrices. <i>Bioresource Technology</i> . 2018, 268 – 45–51. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.07
<i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	Сахароза – 100; Дріжджовий екстракт – 10; Кукурудзяний лікер – 5,0; KH ₂ PO ₄ – 3,0; MgCl ₂ ×6H ₂ O – 0,2; CaCl ₂ – 0,2; NaCl – 1,0.	60,4	-	pH 6,8 200 об/хв 37 °C 28 год CO ₂ – 0,5 л/хв Дробне внесення джерела вуглецю	Jiang, M., Dai, W. Succinic acid production from sucrose by <i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113. <i>Bioresource Technology</i> . 2014, 153 – 327–332. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.062
<i>Actinobacillus succinogenes</i> GXAS137	Патока цукрової тростини – 75; Порошок кукурудзяного лікеру – 20,6; Арахісова мука – 8; K ₂ HPO ₄ – 3,0; NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O – 2,0; NaCl – 1,0; MgCl ₂ ·6H ₂ O – 0,21; CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0,21.	64,7	4,5	pH 6,5-7,0 100 об/хв 37 °C 48 год CO ₂ – 0,3 л/хв Дробне внесення джерела вуглецю	Shen, N., Qin, Y., Wang, Production of succinic acid from sugarcane molasses supplemented with a mixture of corn steep liquor powder and peanut meal as nitrogen sources by <i>Actinobacillus succinogenes</i> . <i>Letters in Applied Microbiology</i> . 2015, 60(6) – 544–551. doi: 10.1111/lam.12399

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
Actinobacillus succinogenes 130Z, *Actinobacillus succinogenes* NJ113 та
Actinobacillus succinogenes GXAS137**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Вміст г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Посилання (1 – 15)*
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	Глюкоза	60	50	3	1
	Дріжджовий екстракт	15	1 100	16,5	2
	Кукурудзяний екстракт	2,5	90	0,225	3
	NaCl	1,0	40	0,04	4
	MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	32,80	0,0066	5
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,2	27	0,0054	6
	MnCl ₂	0,07	186	0,013	7
	C ₂ H ₃ NaO ₂	1,4	100	0,14	8
	Na ₂ S×9H ₂ O	0,16	40	0,0064	9
	Na ₂ HPO ₄	0,3	59	0,0177	10
	NaH ₂ PO ₄	1,4	59	0,0826	10
	K ₂ HPO ₄	1,5	119,28	0,1789	11
Вартість 1 л середовища – 20,2156 грн					
<i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	Сахароза	100	90	9	12
	Дріжджовий екстракт	10	1 100	11	2
	Кукурудзяний екстракт	5,0	90	0,45	3
	KH ₂ PO ₄	3,0	119,28	0,3578	11
	MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	32,80	0,0656	5
	CaCl ₂	0,2	27	0,0054	6
	NaCl	1,0	40	0,04	4
Вартість 1 л середовища – 20,9188 грн					
<i>Actinobacillus succinogenes</i> GXAS137	Патока цукрової тростини	75	264	19,8	13
	Кукурудзяний екстракт	20,6	90	1,854	3
	Арахісова мука	8	184	1,472	14
	K ₂ HPO ₄	3,0	119,28	0,3578	11
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,0	130	0,26	15
	NaCl	1,0	40	0,04	4
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,21	32,80	0,0069	5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,21	27	0,0057	6
Вартість 1 л середовища – 23,7964 грн					

Примітка: * – Ціни вказано станом на травень 2022 р.

- <https://prom.ua/ua/p22960204-glyukoza-dekstroza-pischevaya.html?&primelead=Mg>
- <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- <https://flagma.ua/uk/csl-corn-steep-liquor-kukuruzny-liker-o5143193.html>
- <https://prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>

5. <https://klebrig.com.ua/ua/p1559616178-magnij-hloristyj-25kg.html>
6. <https://prom.ua/ua/p148481371-kaltsij-hloristyj-hlorid.html?&primelead=M14zNA>
7. <https://prom.ua/ua/p384762482-marganets-hloristyj-hlorid.html>
8. <https://flagma.ua/acetat-natriya-natriy-uksusnokisly-o13044614.html>
9. <https://prom.ua/ua/p1480505525-sulfid-natriya-natrij.html>
10. <https://prom.ua/ua/p1063546482-natrij-fosfornokislyj-piro.html?&primelead=MC44>
11. <https://novohim.com.ua/ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/kalij-fosfornokislj-2-zamishhenij/>
12. <https://www.systopt.com.ua/item-saharoza>
13. https://bigl.ua/ua/p1331234269-melassa-saharnogo-trostrnika?click_track_data=.eJwlzk0LgjAcgPHv8j97cDO1vGUmDsIKtKiI0Lmm-DJ1Lnuh717R8eG5_F7Q9iJTdLgUGTjIMBA2JtiaaUCTuk0K3vwHRsg0LQ2kUD114EBa8Ao0GETJmm_mi6wOd1FFj2TZrQKXeWRyxbFd6nJvT5nyni4hEuFwxTfZnQRuP9R8ZKleztcyUbmVdpEub-b2eUjDxg8FnfuJcmP4QQbGRf_4QiQ4J2zoCJ_fHzarO7E.6akU5WmQuvHzqb0DQexOp842Kb4
14. <https://prom.ua/ua/p1154426736-arahisovaya-muka-sertif.html>
15. <https://prom.ua/ua/p509301658-gidrofosfat-natriya-natrij.html>

З даних, наведених в табл. 2.2, зрозуміло, що *Actinobacillus succinogenes* 130Z має найнижчу вартість 1 л поживного середовища 20,22 грн, а вартість поживного середовища для *Actinobacillus succinogenes* NJ113 та *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 більше на 0,7 та 3,58 грн, відповідно, але враховуючи різну кількість синтезованої бурштинової кислоти у даних біологічних агентів, отриманих даних не достатньо для кінцевого вибору продуцента. Для того, щоб повністю впевнитись, що обраний біологічний агент є найкращим біологічним агентом, необхідно розрахувати умовну вартість 1 г отриманого сукцинату та кількість синтезованого сукцинату за годину.

Порівняння вартості 1 г сукцинату у *A. succinogenes* 130Z, *A. succinogenes* NJ113 та *A. succinogenes* GXAS13 наведено в таблиці 2.3.

Умовна вартість 1 г цільового продукту бурштинової кислоти при культивуванні *Actinobacillus succinogenes* 130Z, *Actinobacillus succinogenes* NJ113 та *Actinobacillus succinogenes* GXAS137

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація бурштинової кислоти, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утворені бурштинової кислоти за годину, г/год
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	20,22	45,6	0,443	36	1,27
<i>Actinobacillus succinogenes</i> NJ113	20,92	60,4	0,346	28	2,16
<i>Actinobacillus succinogenes</i> GXAS137	23,80	64,7	0,367	48	1,35

Підсумовуючи вищезазначене можна зробити висновок, що *Actinobacillus succinogenes* 130Z має найменший показник кількості синтезованої бурштинової кислоти при найбільшому показнику вартості 1 г цільового продукту, отже даний продуцент не підходить для нашого проекту. *A. succinogenes* GXAS137 має більший показник кількості утвореної кислоти за годину та меншу умовну вартість 1 г сукцинату, в порівнянні з *A. succinogenes* 130Z, але даний біологічний агент має значно менші вище зазначені показники в порівнянні з *A. succinogenes* NJ113, а саме в 1,6 раза менше показник кількості утвореної бурштинової кислоти за годину та майже в 1,1 рази більшу умовну вартість цільового продукту.

Отже, в якості основного продуцента сукцинату, доцільно обрати *A. succinogenes* NJ113, через високу концентрацію синтезу сукцинату і невисоку умовну вартість отриманої речовини при порівнянні з іншими біологічними агентами.

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища

Actinobacillus succinogenes NJ113

Визначення вмісту азоту

Дано:

Кукурудзяний екстракт – 5 г/л

Дріжджовий екстракт – 10 г/л

В статті [11] відбувалось порівняння даних компонентів в якості поживного середовища і в результаті було встановлено що в дріжджовому екстракті становить кількість азоту становить 11,8 %, а в кукурудзяному екстракті – 8,2 %, тоді:

$$5 \times 8,2 \% + 10 \times 11,8 \% = 1,59$$

Враховуючи, що в біологічній клітині вміст азоту становить 10% від усіх компонентів, для визначення концентрації біомаси, необхідно провести перерахунок:

$$1,59 \times 10 = 15,9 \text{ г/л}$$

Таким чином, за азотом теоретично можлива концентрація біомаси становить 15,9 г/л.

Визначення вмісту вуглецю

Дано:

$C_{12}H_{22}O_{11} = 100 \text{ г/л};$

$M(C_{12}H_{22}O_{11}) = 342 \text{ г/моль};$

$Ar(C_{12}) = 144 \text{ г/моль};$

Відсоткове співвідношення вуглецю:

$$\frac{Ar C_{12} \times C_{12}H_{22}O_{11}}{M(C_{12}H_{22}O_{11})} = \frac{144 \times 100}{342} = 42$$

Враховуючи, що в біологічній клітині вміст вуглецю становить 50% від всіх компонентів, для визначення концентрації біомаси, необхідно провести перерахунок:

$$42 \times 2 = 84 \text{ г/л}$$

Зважаючи на холосте окислення, на яке витрачається приблизно половина вуглецю, біомаси за вуглецем становитиме 42 г/л.

З наведених вище розрахунків можна зробити висновок, що в даному середовищі лімітуючим фактором є азот. Тобто при споживанні всього азоту ріст мікроорганізмів припиниться. Отже, максимальний теоретичний рівень біомаси становить 15,9 г/л. Проведемо розрахунок кількості вуглецю яка витрачається на синтез бурштинової кислоти.

Дано:

Концентрація бурштинової кислоти – 60,4 г/л

$M(C_4H_6O_4) = 118$ г/моль;

$Ar(C_4) = 48$ г/моль;

$$\frac{Ar C_4 \times C_4H_6O_4}{M(C_4H_6O_4)} = \frac{48 \times 60,4}{118} = 24,6$$

Враховуючи що кількість вуглецю в середовищі становить 42 з яких приблизно 16 піде на біомасу в нас залишається $42 - 16 = 26$ провівши теоретичний розрахунок потреби вуглецю на синтезу бурштинової кислоти (24,6) можна зазначити що середовище даного складу є оптимальним.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки

***Actinobacillus succinogenes* NJ113**

Грамнегативна бактерія *Actinobacillus succinogenes* NJ113, являє собою поодинокі клітини розміром 0,63-1,21 мкм. Колонії, утворені на триптично-соевому бульйоні (TSB) мають круглу форму, сірі та напівпрозорі. Бактерії нерухливі, не утворюють спори. (рис. 3.1) [12, 13]

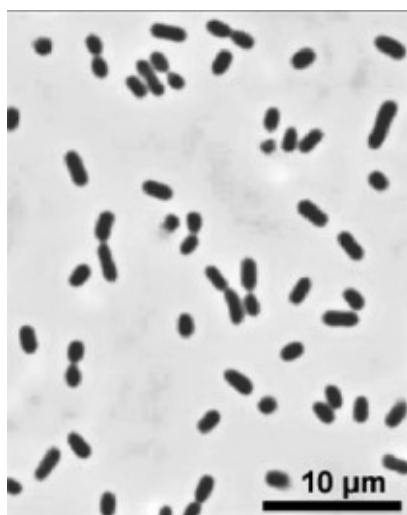


Рис. 3.1 Actinobacillus succinogenes, електронна мікрофотографія, збільшення 10 мкм

Бактерія є факультативним анаеробом. *Actinobacillus succinogenes* NJ113 є мезофілом і росте за температури 37°C, рН – від 6,0 до 7,4. Ростуть краще при підвищеній концентрації CO₂. Добре зростає без додаткових факторів росту. За типом живлення – хемоорганогетеротроф [14].

A. succinogenes NJ113 ферментує глюкозу з утворенням основних продуктів таких як: сукцинат, ацетат і форміат, а також етанол як другорядний продукт. [15]. Утворення сукцинату вимагає фіксації 1 моль CO₂ на моль отриманого сукцинату, тому у мірі збільшення кількості CO₂ кількість виробленого сукцинату збільшується. При зниженні рівня CO₂ утворюється більше етанолу. Сукцинат виробляється під час логарифмічної фази.

Actinobacillus succinogenes NJ113 дає позитивну реакцію в тестах на каталазу, оксидазу, лужну фосфатазу та β-галактозидазу [16].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Царство – *Eubacteria*

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Proteobacteria*

Клас – *Gamma proteobacteria*

Порядок – *Pasteurellales*

Родина – *Pasteurellaceae*

Рід – *Actinobacillus*

Вид – *Actinobacillus succinogenes*

Штам – *Actinobacillus succinogenes* NJ113

Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба в сукцинаті

Сукцинат є безбарвною кристалічною аліфатичною дикарбоною кислотою. Дана сполука має великий потенціал в промисловості завдяки своїй лінійній насиченій структурі, через що вона може використовуватись як проміжний продукт для синтезу хімічних речовин. Застосовується в медичній, ветеринарній, косметичній, аграрній, хімічній та харчовій промисловостях [17].

В медичній та ветеринарній сферах використовують солі сукцинату (найчастіше сукцинат кальцію, калію, натрію). Дані сполуки ефективні після тривалих хвороб і травм, так як дані речовини сприяють покращенню метаболізму та сприяє забезпеченню тканин енергією, що зменшує гіпоксію тканин. Препарати з сукцинатом можуть використовуватись, як седативні, спазмолітичні, антиреотичні та протизапальні засоби та застосовуватись як інгібітор іонів калію і антиоксидант [18].

В харчовій промисловості сукцинат відомий як харчова добавка Е 363, дана речовина використовується, як регулятор кислотності, а також деякі солі сукцинату можна використовувати як заміну харчовій солі які підсилюють смак [3, 19].

В хімічній промисловості сукцинат слугує як проміжний продукт до синтезу великої кількості важливих промислових компонентів: 1,4-бутандіол, 2-піролідіон, тетрагідрофуран, диметилсукцинат а також при комбінуванні сукцинату з бутандіолом можна отримати перспективні на сьогодні біологічно деградабельні полімери такі як полібутиленсукцинат та полі(бутиленсукцинат-співбутилентерефталат) [17, 20, 21].

В аграрній промисловості дану речовини використовують як стимулятор росту, сукцинат нормалізує природну мікрофлору ґрунту і надає

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кухарова М.К.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				17	69
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування							

загальнозміцнюючу дію: допомагає краще засвоювати живильні речовини і добрива, стимулює проростання та зростання, покращує приживлюваність, прискорює розвиток кімнатних квітів і підвищує врожай городніх культур [22].

Підсумовуючи вище наведену інформацію, можна зробити висновок, що сукцинат є важливим проміжним продуктом, який має великий діапазон використання. Серед розглянутих варіантів застосування, перспективним напрямком є використання в хімічній промисловості, а саме для отримання полібутиленсукцинату, так як на сьогодні в світі існує попит на безпечні для довкілля продукти, а даний полімер є повністю біорозкладаним (розкладається на CO₂ та воду) та має гарні конкурентоспроможні механічні властивості.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Визначивши цільове призначення сукцинату (синтез для подальшого отримання полібутиленсукцинату), слід дізнатись яку кількість даного полімеру необхідно виробляти в рік.

Згідно даних [23] глобальний ринок полібутиленсукцинату у 2021 році оцінювався в 71,23 мільярда доларів США та в подальшому даний показник буде збільшуватись. Даний полімер може використовуватись для створення упаковки, мішків, рибальських сіток, кавових капсул, дерево-пластикових композитів, тощо. Враховуючи велику кількість варіантів цільового використання та те що дана речовина є біодеградабельною, розглянемо статистичні дані утворення пластикових відходів (тобто дана кількість утворених відходів продемонструє, яку кількість біопластику можна синтезувати щоб мінімізувати відходи в подальшому).

За статистичними даними наведеним в статичному щорічнику України за 2020 рік кількість утворених пластикових відходів на кінець року становить 40,8 тис. т [24]. Слід врахувати що одразу замінити пластик, який викидають, неможливо та те що не всі товари які в результаті стали пластиковими відходами можна замінити полібутиленсукцинатом, та

враховуючи що точну кількість речовин які можна було б даним полімером замінити неможливо, для подальших розрахунків доцільно прийняти від загального значення 1 %. Отже кількість пластику в рік який можна замінити на полібутиленсукцинат становить:

$$40,8 \text{ тис. т} \times 1 \% = 408 \text{ т}$$

Визначивши теоретичну річну потребу в полібутиленсукцинаті, слід дізнатись яку кількість сукцинату витрачають для синтезу даної речовини. На сьогодні є велика кількість технологій для отримання даного продукту, для наших розрахунків візьмемо данні наведені в патенті [25]. Згідно даного патенту для синтезу 1 кг полімеру необхідно в 1,27 рази більшу кількість сукцинату. Отже, для забезпечення річної потреби полімеру необхідно:

$$408 \text{ т} \times 1,27 = 518,16 \text{ т (сукцинату).}$$

Враховуючи жорстку конкуренцію на даному ринку, доцільно прийняти що від загальної кількості ми зможемо забезпечити лише 5 % потреби, тому слід синтезувати:

$$518,16 \text{ т} \times 5 \% = 25,91 \text{ т (сукцинату)}$$

Біологічний синтез сукцинату відбувається *Actinobacillus succinogenes* NJ113, який синтезує 60,8 г/л сукцинату за 28 год. Отже, для синтезу необхідної кількості цільового продукту необхідно:

$$25\,910\,000 \text{ г} / 60,8 \text{ г/л} = 426,1 \text{ м}^3 \text{ культуральної рідини}$$

Також слід врахувати витрати при виділенні та очищенні цільового продукту.

$$426,1 \text{ м}^3 / (1 - 0,3) = 608,7 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Дізнавшись потребу в культуральній рідині, потрібно розрахувати кількість необхідної культуральної рідини за добу, для цього приймемо що кількість трудоднів буде становити 250 днів:

$$V_d = \frac{C}{T_{р\text{д}}} = \frac{608,7 \text{ м}^3}{250} = 2,44 \text{ м}^3/\text{добу}$$

Кількість культуральної рідини за цикл ($V_{\text{ци}}$) становитиме:

$$V_{\text{пц}} = \frac{K_1 * V_d * T_{\text{цф}}}{24} = \frac{1,2 * 2,44 * 35}{24} = 4,27 \text{ м}^3/\text{цикл}$$

де K_1 коефіцієнт запасу, для врахування можливості нестерильних операцій $K_1 = 1,2$, $T_{\text{цф}}$ – час роботи ферментера, який складається з часу підготовки ферментера перед синтезом (7 год) та часу біосинтезу (28 год).

Для отримання $4,27 \text{ м}^3$ культуральної рідини ($V_{\text{пц}}$) необхідно проводити синтез в ферментері з геометричний об'єм:

$$V_r = 4,27 / 0,7 = 6,1 \text{ м}^3$$

Найближчий стандартний за об'ємом ферментер $V_r = 6,3 \text{ м}^3$.

Необхідно уточнити значення коефіцієнта заповнення $K_{\text{зап}} = \frac{V_{\text{пц}}}{V_r} = \frac{4,27}{6,3} = 0,68$, дане значення знаходиться в допустимому діапазоні, тому залишаємо його незмінним.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Actinobacillus succinogenes NJ113

В результаті виробничого циклу отримуємо $V_{\text{пц}} = 4,27 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Для отримання даної кількості культуральної рідини необхідно передбачити її втрати в результаті краплевиносу ($E_{\text{ф}}$), які можуть становити 10%.

Враховуючи втрати перед виробничим синтезом необхідно передбачити наступну кількість поживного середовища та посівного матеріалу:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{пц}}}{1 - E_{\text{ф}}} = \frac{4,27}{1 - 0,1} = 4,74 \text{ м}^3$$

Також слід врахувати, що під час виробничого біосинтезу буде відбуватись дробне внесення джерела вуглецю (сахароза), отже, необхідно розрахувати (за правилом хреста) початковий об'єму культуральної рідини та розчину підживлення.

500 40/40 = 1 частин – розчину підживлення

100

60 400/40 = 10 частин – початкове поживне середовище

$$(500 - 100 = 400, 100 - 60 = 40)$$

Співвідношення початкового об'єму культуральної рідини до розчину підживлення 10:1

$$1 \text{ частина культуральної рідини становить } 4,74 / (10 + 1) = 0,431 \text{ м}^3$$

$$\text{Об'єм розчину підживлення } V_{\text{ж.сум.}} = 1 \cdot 0,431 = 430 \text{ л}$$

$$\text{Початковий об'єм культуральної рідини } V_{\text{п.кр.}} = 10 \cdot 0,431 = 4,31 \text{ м}^3$$

Розрахунок кількості поживного середовища та посівного матеріалу для ферментера об'ємом 6,3 м³

Об'єм робочого ферментера складається з суми об'ємів поживного середовища (ПС) $V_{\text{пс1}}$ і посівного матеріалу (ПМ) $V_{\text{пм1}}$.

Необхідний об'єм ПМ для засіву середовища становить 10 % від об'єму ПС, отримання посівного матеріалу буде відбуватись в посівному апараті.

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 4\,310 / (1 + 0,1) = 3\,918 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 4\,310 - 3\,918 = 392 \text{ л}$$

Розрахунок кількості поживного середовища та посівного матеріалу для посівного апарату

392 л посівного матеріалу вирощують в посівному апараті з наступним робочим об'ємом $V_{\text{роб2}}$

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{пм}}) = 392 / (1 - 0,13) = 450,6 \text{ л}$$

де $E_{\text{пм}}$ це втрати КР в посівному апараті в результаті краплевиносу під час аерації середовища ($E_{\text{пм}} = 0,13$).

Необхідний об'єм ПС ($V_{\text{пс2}}$) та ПМ ($V_{\text{пм2}}$) для отримання 450,6 л посівного матеріалу на стадію виробничого синтезу, становить:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{пм2}}) = 450,6 / (1 + 0,1) = 409,6 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{пс2}} = 450,6 - 409,6 = 41 \text{ л}$$

Щоб визначити геометричний об'єм посівного апарату $V_{\text{па1}}$ необхідно використати $V_{\text{роб2}}$ та $K_{\text{зап}}$ який становить 0,7.

$$V_{\text{па1}} = V_{\text{роб2}} / K_{\text{зап}} = 450,6 / 0,7 = 644 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 можна отримати при вирощуванні в посівному апараті об'ємом 0,63 м³.

Отже, дійсний коефіцієнт заповнення становитиме

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{па}} = 450,6 / 630 = 0,71, \text{ що допустимо.}$$

Розрахунок ПС та ПМ для інокуляторів

Посівний матеріал об'ємом 41 л для посівного апарата місткістю 0,63 м³ отримують в інокуляторі з робочим об'ємом $V_{\text{роб3}}$

$$V_{\text{роб3}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{пм3}}) = 41 / (1 - 0,05) = 43,16 \text{ л,}$$

де $E_{\text{пм3}}$ це втрати КР в інокуляторі за рахунок краплевиносу під час аерації середовища ($E_{\text{пм3}} - 0,05$).

Необхідний об'єм ПС ($V_{\text{пс3}}$) та ПМ ($V_{\text{пм3}}$) для отримання 43,16 л посівного матеріалу, становить:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб3}} / (1 + X_{\text{пм3}}) = 43,16 / (1 + 0,1) = 39,24 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{пс3}} = 43,16 - 39,24 = 3,92 \text{ л}$$

Щоб визначити геометричний об'єму інокулятора $V_{\text{ін1}}$ необхідно використати $V_{\text{роб2}}$ та $K_{\text{зап}}$ який становить 0,7.

$$V_{\text{ін1}} = V_{\text{роб3}} / K_{\text{зап}} = 43,16 / 0,7 = 61,7 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 можна отримати при вирощуванні в інокуляторі об'ємом 60 л.

Отже, дійсний коефіцієнт заповнення становитиме

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{ін}} = 43,16 / 60 = 0,72, \text{ що допустимо.}$$

Посівний матеріал об'ємом 3,92 для інокулятора місткістю 60 л отримують в інокуляторі з робочим об'ємом $V_{\text{роб4}}$

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{пм3}}) = 3,92 / (1 - 0,05) = 4,13 \text{ л,}$$

де $E_{\text{пм3}}$ це втрати КР в інокуляторі за рахунок краплевиносу під час аерації середовища ($E_{\text{пм3}} - 0,05$).

Необхідний об'єм ПС ($V_{\text{пс4}}$) та ПМ ($V_{\text{пм4}}$) для отримання 4,13 л посівного матеріалу, становить:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{пм4}}) = 4,13 / (1 + 0,1) = 3,75 \text{ л}$$

$$V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{пс4}} = 4,13 - 3,75 = 0,38 \text{ л}$$

Щоб визначити геометричний об'єму інокулятора $V_{ін2}$ необхідно використати $V_{роб2}$ та $K_{зап}$ який становить 0,7.

$$V_{ін2} = V_{роб4} / K_{зап} = 4,13 / 0,7 = 5,9 \text{ л}$$

Дану кількість посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 можна отримати при вирощуванні в інокуляторі об'ємом 6 л.

Отже, дійсний коефіцієнт заповнення становитиме

$$K_{зап3} = V_{роб4} / V_{ін} = 4,13/6 = 0,69.$$

Розрахунок кількості ПС та ПМ для качалочних колб

З колб на качалці необхідно отримати $V_{пм4} = 0,38$ л посівного матеріалу, в даному випадку через малі втрати, їх можна не враховувати.

$$V_{роб5} = V_{пм4} = 0,38 \text{ л}$$

Необхідний об'єм ПС ($V_{пс5}$) та ПМ ($V_{пм5}$) для отримання 0,38 л посівного матеріалу, становить:

$$V_{пс5} = V_{роб5} / (1 + X_{пм5}) = 0,38 / (1 + 0,1) = 0,35 \text{ л}$$

$$V_{пм5} = V_{роб5} - V_{пс5} = 0,38 - 0,35 = 0,03 \text{ л}$$

Для вирощування використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{кол} = 0,75$ л та з коефіцієнтом заповнення $K_{зап} = 0,2$

Тоді кількість колб становитиме

$$N_k = V_{роб5} / V_{кол} \times K_{зап} = 0,38 / 0,75 \cdot 0,2 = 2,5 \text{ колби (прийmemo 3)}$$

З проведеного розрахунку можна зробити висновок що процес отримання посівного матеріалу для синтезу сукцинату у ферментері об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,7 відбуватиметься у чотири стадії.

Таблиця 3.1

Об'єми апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу

***Actinobacillus succinogenes* NJ113 та виробничого синтезу сукцинату**

№ стадії	Геометричний об'єм ферментера, V_f , л	Коефіцієнт заповнення, $K_{зап}$, частка	Робочий об'єм ферментера, $V_{роб}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{пс}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{пм}$, л
1	0,750 × 3 колб	0,2	0,38	0,35	0,03
2	6	0,69	4,13	3,75	0,38
3	60	0,72	43,16	39,24	3,92
4	630	0,71	450,6	409,6	41

5	6 300	0,75	4 740	3 918	392
---	-------	------	-------	-------	-----

Розділ 4. Біосинтез сукцинату

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у *Actinobacillus succinogenes* NJ113

Actinobacillus succinogenes NJ113 синтезує сукцинат, використовуючи сахарозу як джерело вуглецю [8]. В базі даних KEGG відсутні дані про шляхи катаболізму *Actinobacillus succinogenes* NJ113, тому використовуватимемо схеми, наведені для виду *Actinobacillus succinogenes* загалом [26]. Сахароза може залучатися до процесу катаболізму двома способами: або в результаті дії альфа-глюкозидази [КФ: 3.2.1.20] та бета-фруктофуранозидази [КФ: 3.2.1.26] перетворитися на фруктозу з подальшим фосфорилуванням останньої фруктокіназою [КФ: 2.7.1.4] до фруктозо-6-фосфату, або за рахунок фосфотрансферазної системи ЕПВСА/ЕПВС [КФ: 2.7.1.211] фосфорилуватися до сахарозо-6-фосфату, який далі перетворюється на глюкозо-6-фосфат під дією бета-фруктофуранозидази [КФ: 3.2.1.26]. Тобто, сахароза розщеплюється до фосфорильованих моносахаридів, які далі залучаються в процес гліколізу, де глюкозо-6-фосфат перетворюється в фруктозо-6-фосфат за участі глюкозо-6-фосфатізомерази [КФ: 5.3.1.9] з наступним фосфорилуванням у присутності 6-фосфофруктокінази [КФ: 2.7.1.11] до фруктозо-1,6-дифосфату. Отриманий продукт піддається розщепленню фруктозо-бісфосфатальдозазою класу II [КФ: 4.1.2.13] до гліцеральдегід-3-фосфату, який одночасно окиснюється та фосфорилується гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою [КФ: 1.2.1.12] до 1,3-дифосфогліцерату, від якого далі фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3] відщеплює молекулу АТФ, внаслідок чого утворюється 3-фосфогліцерат. Після перетворення 3-фосфогліцерату в 2-фосфогліцерат (за присутності 2,3-бісфосфогліцерат-залежної фосфогліцератмутази [КФ: 5.4.2.11]) відбувається трансформація останнього у фосфоенолпіруват за участі енолази

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез сукцинату		
Розроб.		Кухарова М.К.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				24	69
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

[КФ: 4.2.1.11], після чого від фосфоенолпірувату піруваткіназою [КФ: 2.7.1.40] відщеплюється АТФ, і в результаті утворюється піруват, який у подальшому надходить у цикл трикарбонових кислот.

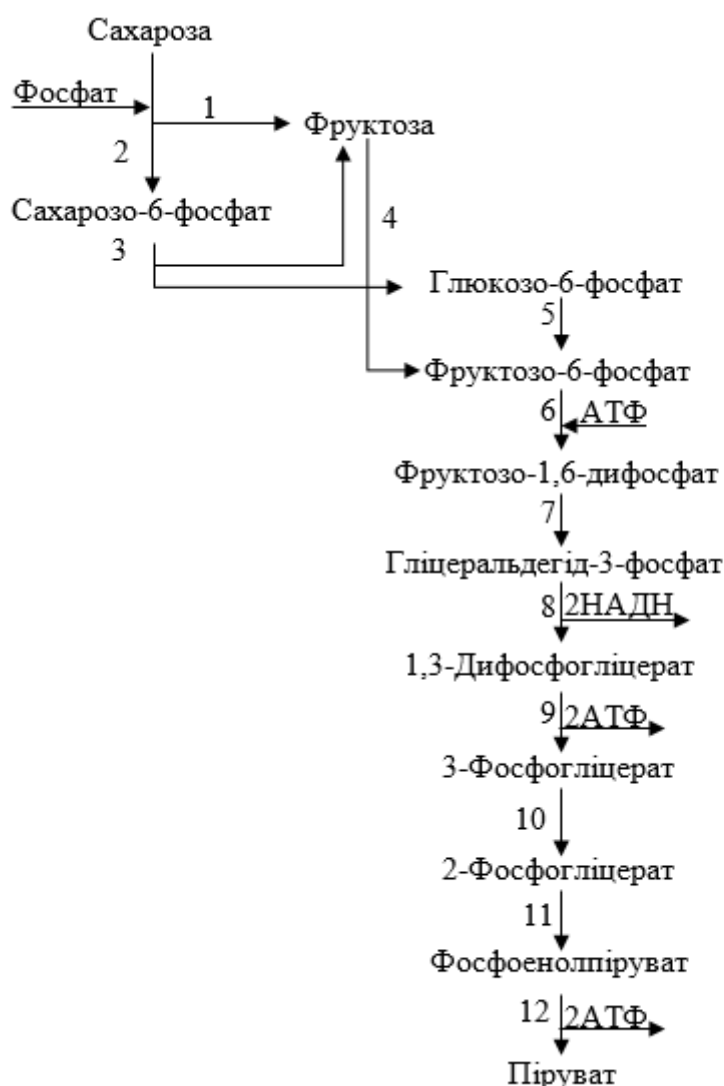


Рис 4.1. Катаболізм сахарози у *Actinobacillus succinogenes*

Ферменти: 1 – альфа-глюкозидаза [КФ: 3.2.1.20] та бета-фруктофуранозидаза [КФ: 3.2.1.26]; 2 – фосфотрансферазна система ЕПВСА/ЕПВС [КФ: 2.7.1.211]; 3 – бета-фруктофуранозидаза [КФ: 3.2.1.26]; 4 – фруктокіназа [КФ: 2.7.1.4]; 5 – глюкозо-6-фосфатізомераза [КФ: 5.3.1.9]; 6 – 6-фосфотруктокіназа [КФ: 2.7.1.11]; 7 – фруктозо-бісфосфатальдолаза, клас II [КФ: 4.1.2.13]; 8 – гліцераальдегід-3-фосфатдегідрогеназа [КФ: 1.2.1.12]; 9 – фосфогліцераткіназа [КФ: 2.7.2.3]; 10 – 2,3-бісфосфогліцерат-

залежна фосфогліцератмутаза [КФ: 5.4.2.11]; 11 – енолаза [КФ: 4.2.1.11]; 12 – піруваткіназа [КФ: 2.7.1.40];

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у сукцинат

Мікроорганізми виду *Actinobacillus succinogenes* утворюють сукцинат у циклі трикарбонових кислот [26]. Піруват, утворений під час гліколізу, піддається окисному декарбоксілюванню під дією піруватдегідрогенази [КФ: 1.2.4.1] з утворенням ацетил-КоА, котрий далі за участі цитратсинтази [КФ: 2.3.3.1] перетворюється на цитрат, який, у свою чергу, переходить в ізоцитрат унаслідок дії аконітази [КФ: 4.2.1.3]. Далі відбуваються два етапи окисного декарбоксілювання: перетворення ізоцитрату на 2-оксоглутарат і перетворення останнього на сукциніл-КоА за участі ізоцитратдегідрогенази [КФ: 1.1.1.42] та 2-оксоглутаратдегідрогенази [КФ: 2.3.1.61] відповідно. Насамкінець, сукциніл-КоА за допомогою бета-субодиниці сукциніл-КоА синтетази [КФ: 6.2.1.5] перетворюється на сукцинат (при цьому утворюється молекула АТФ).

Оскільки джерелом вуглецю є вуглевод (сахароза), то втрати інтермедіатів ЦТК будуть компенсуватись карбоксілюванням фосфоенолпірувату та пірувату під дією фосфоенолпіруваткарбоксікінази (АТФ) [КФ: 4.1.1.49] і піруваткарбоксілази [КФ: 6.4.1.1] відповідно.

Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу сукцинату

5.1.1. Обґрунтування способу вирощування *Actinobacillus succinogenes* NJ113 і типу ферментера

Actinobacillus succinogenes NJ113– представник роду *Actinobacillus*, який може використовуватись як продуцент бурштинової кислоти в промислових масштабах. Даний мікроорганізм є мезофільним нейтрофілом, оскільки оптимальна температура культивування є 37 °С, а рН 6,8. Враховуючи що при таких умовах розвивається більшість мікроорганізмів культивування слід проводити в асептичних умовах з метою усунення можливої контамінації.

З огляду на вище зазначену інформацію виробничий біосинтез буде відбуватись глибинним періодичним способом, що дозволить зменшити ризик контамінації та забезпечити максимальний синтез сукцинату.

A. succinogenes NJ113 є факультативним анаеробом, тобто даний мікроорганізм здатний рости як при кисні так і без доступу кисню, але враховуючи інформацію зазначену в 2 розділі, що для синтезу сукцинату необхідна певна концентрація вуглекислого газу, тому необхідно передбачити безперервну подачу вуглекислого газу під час виробничої ферментації через барботер до ферментатора.

Підсумовуючи, для культивування *A. succinogenes* NJ113 з метою отримання високої концентрації сукцинату обрано періодичне вирощування глибинним способом з безперервною подачею вуглекислого газу в асептичних умовах.

Під час вибору ферментера беруть до уваги морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні особливості штаму продуцента.

~~Встановивши що синтез сукцинату відбувається з внесенням~~

НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кухарова М.К.			Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.				27	69
Консультант					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми

вуглекислого газу, а так як він вноситься не лише для створення безкисневих умов для біологічного агента який потребує його для синтезу сукцинату, тому необхідним є встановлення барботера, яким можна забезпечити безперервну подачу вуглекислого газу, а також перемішуючого пристрою для додаткового перемішування, що підвищить ефективність масообмінних процесів і позитивно сприятиме ефективності культивування продуцента. Барботер розміщують під мішалкою, яка створюватиме вихрові рухи в результаті чого вуглекислий газ рівномірно розподілятиметься в товщі культуральної рідини.

Оптимальною температурою вирощування *A. succinogenes* NJ113 є 37 °С, з метою підтримання даного значення температури ферментер необхідно оснастити сорочкою та датчиком температури.

Для визначення рівня рН культуральної рідини з метою подальшого підтримання оптимального значення ферментер оснащують датчиком рівня рН.

Підсумовуючи, виробничий ферментер необхідно оснастити сорочкою, барботером з мішалкою та датчиками рівня рН і температури.

5.1.2. Обґрунтування стадій підготовки вуглекислого газу

Actinobacillus succinogenes NJ113 є факультативним анаеробом, що означає, що дана культура може вирощуватись в аеробних та анаеробних умовах. Найчастіше для отримання посівного матеріалу представників даного роду вирощують в аеробних умовах, а для синтезу сукцинату проводять анаеробне культивування, але в статті [9] за допомогою отримання посівного матеріалу в анаеробних умовах вчені отримали покращенні показники виходу цільового продукту на стадії синтезу сукцинату, тому для стадій отримання посівного матеріалу та виробничого синтезу цільового продукту необхідно передбачити підготовку вуглекислого газу, для забезпечення анаеробних умов культивування.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Технологічний процес синтезу сукцинату культивуванням *Actinobacillus succinogenes* NJ113, відбувається впродовж 250 днів та відбувається в ферментері об'ємом 6,3 м³, з приготування посівного матеріалу в посівному апараті 0,63 м³ та інокуляторах 60 та 6 л. Технологічний процес відбуватиметься в наступних приміщеннях: цех виробничого синтезу сукцинату, цех отримання посівного матеріалу, приміщення для вирощування культури в колбах на качалці і мікробіологічна лабораторія.

Зображення схематичного плану приміщення для виробничого процесу отримання сукцинату наведено на рис.2.1. В плані враховано діаметри обладнання і відстань між апаратами (не менше 1 м) та від стін (1-1,5 м).

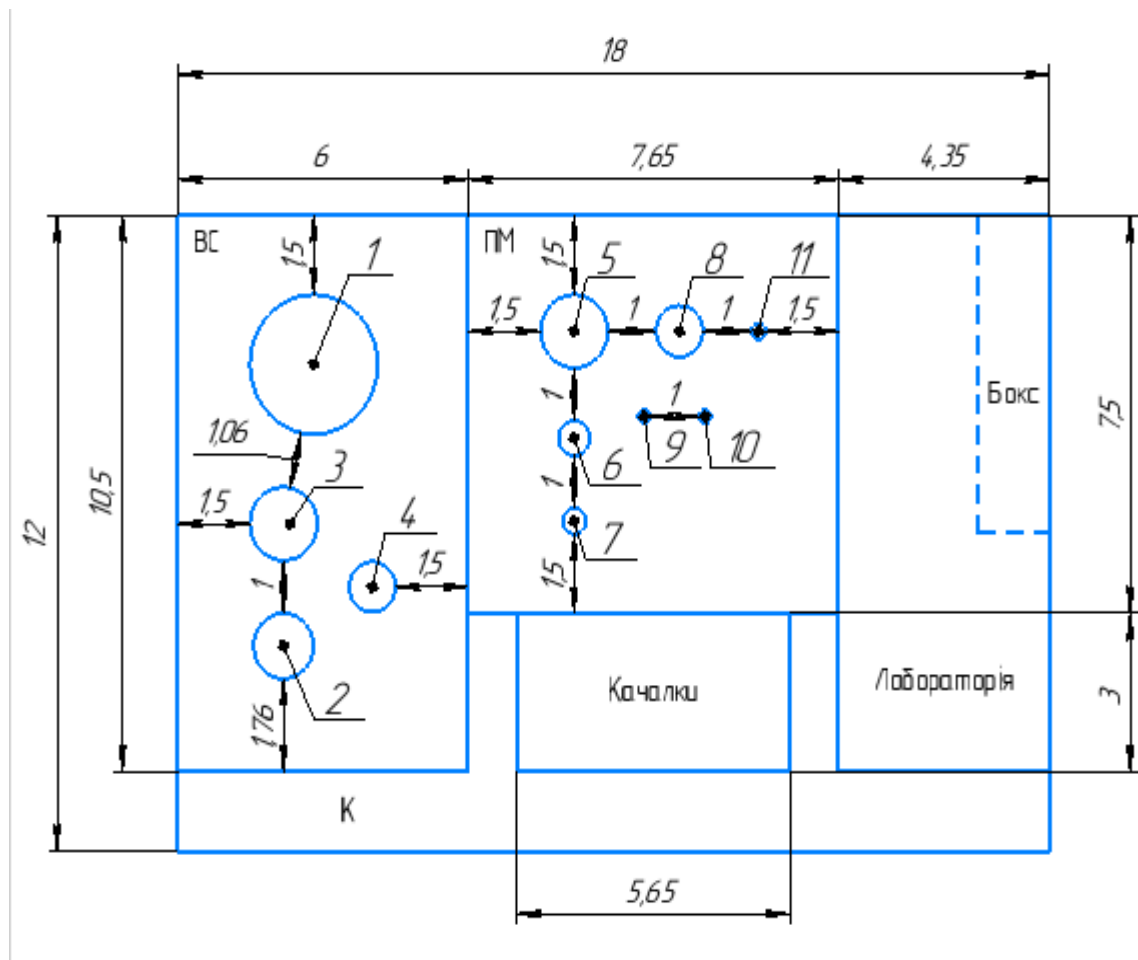


Рис. 5.1. Ескіз планування виробничих приміщень для виробництва сукцинату

BC – цех виробничого біосинтезу сукцинату, ПМ – цех вирощування посівного матеріалу, К - коридор.

В табл. 5.1. наведено габаритні розміри обладнання зображеного на рис. 5.1.

Таблиця 5.1

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва сукцинату

Поз.	Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, м	Висота, м
1	Ферментер	6 300	2,63	5,88
2	Реактор-змішувач для приготування підживлювального розчину	400	1,23	1,64
3	Реактор-змішувач для приготування композиції 1	1 000	1,38	2,18
4	Реактор-змішувач для приготування композиції 2	100	0,95	1,6
5	Посівний апарат	630	1,38	2,77
6	Реактор-змішувач для приготування композиції 1	40	0,65	0,53
7	Реактор-змішувач для приготування композиції 2	10	0,48	0,37
8	Інокулятор-1	60	0,965	2,6
9	Реактор-змішувач для приготування композиції 1	5	0,25	0,3
10	Реактор-змішувач для приготування композиції 2	5	0,25	0,3
11	Інокулятор-2	6	0,3	0,4
	Всього	8 556	-	-

З наведених даних в табл. 5.1, загальний об'єм обладнання необхідного для виробництва сукцинату культивуванням *Actinobacillus succinogenes* NJ113 становить 8,556 м³. Для подальших розрахунків необхідно визначити площу на якій знаходиться дане обладнання, а саме підлога та стіни (висота стін цеху виробничого синтезу сукцинату становить 12 м, а інших приміщень 6 м). Площа підлоги приміщення виробничого синтезу сукцинату становить 10,5 м × 6 м = 63 м², а площа стін становить (10,5 м × 6 + 6 м × 6) × 2 = 198 м². Площа підлоги приміщення отримання посівного матеріалу становить 7,65 × 7,5 = 57,375 м², а площа стін (7,65 × 3 + 7,5 × 3) × 2 = 90,9 м². Мікробіологічна лабораторія 10,5 × 4,35 = 45,675 м², а стін – (10,5 × 3 + 4,35 × 3) × 2 = 89,1 м².

Площа підлоги приміщення з качалками становить $3 \times 5,65 = 16,95 \text{ м}^2$, а стін – $(3 \times 3 + 5,65 \times 3) \times 2 = 51,9 \text{ м}^2$, узагальнені дані площ приміщень наведено в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу	63	198	261
Цех отримання посівного матеріалу	57,375	90,9	148,275
Мікробіологічна лабораторія	45,675	89,1	134,775
Приміщення з качалками	16,95	51,9	68,85
Загальна площа	183	430,2	

Загальна кількість виробничих циклів отримання культуральної рідини для забезпечення річної потреби в сукцинаті при культивуванні *Actinobacillus succinogenes* NJ113 становить 143, миття виробничого обладнання відбувається перед кожним циклом а також враховується миття після останнього циклу, тоді загальна кількість миття обладнання становить 144 рази. З метою забезпечення чистоти приміщень, підлогу миють щодня, а саме 250 разів (кількість трудоднів становить 250). Крім щоденного миття підлоги в приміщеннях раз на місяць проводять генеральне прибирання, а саме 9 разів. Загальна площа оброблення за всі виробничі цикли наведена в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва сукцинату

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	8,556	144	1 232,1
Підлога	183	250	45 750
Стіни, двері вікна	430,2	9	3 872

В табл. 5.4 наведено загальне порівняння дезінфекційних засобів.

Таблиця 5.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для синтезу сукцинату

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
«Дезактин» (дихлорантин) [27]	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2%	49 622	4 962,2	430	0,9	4 466
«Dezaldum 20» (алкілдиметилбензиламоній хлорид, глутаровий альдегід) [28]	Стіни, підлога, вікна, двері	1%	49 622	4 962,2	131,25	1,313	6 515
«Ексан Про Дез» (етанол, ПАР, ялицева олія) [29]	Стіни, підлога, вікна, двері	1,5%	49 622	4 962,2	93,5	1,403	6 962
Каустична сода (NaOH) [30]	Обладнання	1%	1 232,1	369 630	57	0,6	221 778

Примітка: ПАР – поверхнево-активні речовини.

5.1.4. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 та виробництва сукцинату

Для отримання посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 використовують поживне середовище наступного складу, г/л:

Сахароза – 25;

Дріжджовий екстракт – 10;

K_2HPO_4 – 3,0;

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2;

CaCl_2 – 0,2;

NaCl – 1,0.

Для виробництва сукцинату культивуванням *A. succinogenes* NJ113 дану культуру необхідно вирощувати на поживному середовищі, г/л:

Сахароза – 100;

Дріжджовий екстракт – 10;

Кукурудзяний екстракт – 5,0;

K_2HPO_4 – 3,0;

$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2;

CaCl_2 – 0,2;

NaCl – 1,0.

Для виробництва сукцинату використовуючи культуру *A. succinogenes* NJ113 в ферментері об'ємом 6,3 м³, необхідно отримати посівний матеріал в 4 етапи: колби на качалці, інокулятори об'ємом 6 та 60 л та посівний апарат об'ємом 630 л.

5.1.4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113

Для культивування посівного матеріалу в колбах на качалці необхідно приготувати 350 мл поживного середовища. Враховуючи малий об'єм поживного середовища стерилізація відбуватиметься в автоклаві.

Розглянувши поживне середовище для отримання посівного матеріалу залежно від режиму стерилізації окремих його складових його можна поділити на наступні композиції.

Композиція 1: Сахароза, дріжджовий екстракт (0,05 МПа, 112 °С, 30 хв);

Композиція 2: K_2HPO_4 (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв);

Композиція 3: $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl , CaCl_2 (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв).

Термолабільні речовини (сахароза та дріжджовий екстракт) об'єднують в композицію 1, стерилізують в автоклаві 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

Для уникнення утворення нерозчинного осаду фосфатна сіль буде стерилізуватись окремо від інших, так монофосфат калію (композиція 2) та основні солі (композиція 3) стерилізуватимуть в автоклаві 40 хв при 0,15 МПа (131 °С).

Інокулятор місткістю 6 л

Для отримання посівного матеріалу на даній стадії необхідна невелика кількість поживного середовища (3,75 л), тому провести стерилізацію компонентів можна в автоклаві, отже поділ компонентів поживного середовища буде відбуватись як і на попередній стадії.

Композиція 1: Сахароза, дріжджовий екстракт (0,05 МПа, 112 °С, 30 хв);

Композиція 2: K_2HPO_4 (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв);

Композиція 3: $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl , CaCl_2 (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв).

Сахароза та дріжджовий екстракт (композиція 1), стерилізують 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С), як термолабільні речовини.

Монофосфат калію (композиція 2) та основні солі (композиція 3) стерилізуються окремо при тиску 0,15 МПа (131 °С) упродовж 40 хв

Інокулятор місткістю 60 л та посівний апарат місткістю 630 л

Для отримання посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 60 та посівному апараті місткістю 630 л необхідно приготувати 39,24 та 409,6 л

поживного середовища, відповідно, через значно більші об'єми поживного середовища доцільно буде об'єднати дві композиції солей в одну для зменшення економічних затрат на додаткове обладнання. Отже поділ компонентів поживного середовища на дані стадії буде виглядати наступним чином:

Композиція 1: Сахароза, дріжджовий екстракт (0,05 МПа, 112 °С, 30 хв);

Композиція 2: K_2HPO_4 , $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl , CaCl_2 (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв).

Сахарозу та дріжджовий екстракт об'єднують в одну композицію приготування та стерилізація даної композиції буде в реакторах-змішувачах об'ємом 5 та 40 л (відповідно для інокулятора місткістю 60 л та посівного апарату місткістю 630 л), стерилізуватимуть гострою парою 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

Також для зменшення економічних витрат приготування композиції солей буде відбуватись в реакторі, а процес стерилізації в інокуляторі/посівному апараті. Приготування композиції 2 на дані стадії виглядатиме наступним чином: наважки солей вносять в реактор, додають частину води питної, солі розчиняють перемішуванням, переливають в інокулятор/посівний апарат додають іншу частину води, та стерилізують гострою парою 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

Враховуючи що може випасти небажаний осад солей перед стерилізацію композиції необхідно понизити рівень рН до позначки 4,0 за допомогою внесення розчину 6% хлоридної кислоти.

По закінченню стерилізації в стерильний розчин вносять стерильний 6% розчин гідроксиду натрію для встановлення оптимального рівня рН для біологічного агента.

5.1.4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробництва сукцинату

Під час синтезу сукцинату використовують 3,918 м³ поживного середовища, поділ компонентів відбувається за температурними режимами і виглядає наступним чином:

Композиція 1: сахароза, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт (0,05 МПа, 112 °С, 30 хв);

Композиція 2: MgCl₂ × 6H₂O, NaCl, CaCl₂, KH₂PO₄ (0,15 МПа, 131 °С, 40 хв)

В поживному середовищі для надсинтезу сукцинату використовують сахарозу в кількості 100 г/л, з метою уникнення катаболітної репресії у продуцента необхідно знизити початкову концентрацію сахарози до 60 г/л а решту (40 г/л) дробно вносити під час виробничого синтезу. Отже необхідно передбачити приготування підживлювального розчину сахарози для виробничого синтезу сукцинату та починаючи з 4 години кожні 7 годин порційно вносити стерильний розчин сахарози.

Приготування та стерилізація термолабільних компонентів (сахароза, дріжджовий екстракт та кукурудзяний екстракт) буде відбуватись в реакторі змішувачі об'ємом 1 м³ при тиску 0,05 МПа (112 °С) упродовж 30 хв.

Солі об'єднують і стерилізують як і на попередній стадії перед стерилізацією до розчину необхідно додати 6% розчин хлоридної кислоти, а після стерилізації врегулювати рівень рН до оптимальної позначки за допомогою 6% розчину гідроксиду натрію. Стерилізація відбувається гострою парою 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

5.1.4.3. Обґрунтування вибору титрувальних агентів та піногасника

В поживному середовищі яке використовується для отримання посівного матеріалу піноутворюючих компонентів немає, в той час як в середовищі для синтезу сукцинату наявний кукурудзяний екстракт який може слугувати піноутворюючим компонентом. Враховуючи що концентрація даної речовини в поживному середовищі невелика використання хімічного методу піногасіння недоцільно, тому необхідно використати механічний

спосіб піногасіння, а саме встановити піногасильний пристрій в верхній частині ферментера.

Так як приготування та стерилізація композиції солей, на стадії отримання посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 60 л, посівному апараті місткістю 630 л та в виробничому ферментері, відбувається разом необхідно передбачити приготування титрувальних агентів які будуть використовуватись для регулювання рівня рН. Перед стерилізацією необхідно знизити рівень рН до позначки 4,0, для зменшення ризику випадіння солей в нерозчинний осад, для цього розчин необхідно підкислити 6% розчином хлоридної кислоти. Після стерилізації необхідно встановити оптимальний для біологічного агента рівень рН 6,8, для цього підлужимо стерильний розчин 6% розчином натрію гідроксиду.

Розділ 6. Специфікація обладнання

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Б-1	Балон для зберігання вуглекислого газу	1	Балон з вуглекислим газом
ФІ-2 ФІ-8 ФІ-16 ФІ-31	Фільтр індивідуальний	4	Фільтр НЕРА з мікроскловолоконном як фільтруючим матеріалом і корпусом з пластику, оцинкованої або нержавіючої сталі, алюмінію. Продуктивність – 1000 м ³ /год, початковий опір – 250 Па, кінцевий опір – 650 Па. Розмір: 610-610-78 мм. Е = 99,9 % [31]
Ін-3	Інокулятор	1	Ферментер з нержавіючої сталі об'ємом 6 л, виконаний на замовлення у фірми Solaris Biotech, з сорочкою, барботером, механічним змішуючим пристроєм, ротаметром, датчиками рН, температури та рівня [32]
Н-4	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос РТL05. Продуктивність – 10 л/год, частота обертання – 40 об/хв, тиск на виході – до 4 бар, [33]
Р-5 Р-6	Реактор-змішувач	2	Апарат ємнісний з нержавіючої сталі об'ємом 5 л з сорочкою та механічним змішуючим пристроєм. Діаметр – 0,152 м, висота – 0,310 м, частота обертання мішалки – 100 об/хв [34]
Д-7 Д-10 Д-13 Д-15 Д-18 Д-23 Д-27 Д-30	Об'ємно-ваговий дозатор	8	Лічильник-дозатор поліпропіленовий з продуктивністю 10-400 л/хв, робочою напругою 6-30 В, номінальним струмом 6 А та максимальною потужністю 180 Вт [35].
Ін-9	Інокулятор	1	Ферментер з нержавіючої сталі об'ємом 60 л, виконаний на замовлення у фірми Solaris Biotech, з сорочкою, барботером, механічним змішуючим пристроєм, ротаметром, датчиками рН, температури та рівня [32]
Дз-11	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Дозатор для сипких матеріалів з об'ємом бункера 0,6 м ³ , дискретність – 0,005 г, діапазон дозування 0,2-50 кг. точність зважування – 1 кг [36]

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кухарова М.К.			РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					38	69
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
P-12	Реактор-змішувач	1	Апарат ємнісний з нержавіючої сталі об'ємом 40 л з сорочкою та механічним змішуючим пристроєм. Висота – 0,75 м, діаметр – 0,4 м, потужність двигуна – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [37]
P-14 P-20 P-21	Реактор-змішувач	3	Апарат ємнісний з нержавіючої сталі об'ємом 10 л з сорочкою та механічним змішуючим пристроєм. Висота – 0,5 м, діаметр – 0,25 м, потужність двигуна – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [37]
ПА-17	Посівний апарат	1	Ферментер з нержавіючої сталі об'ємом 630 л, виконаний на замовлення у фірми Solaris Biotech, з сорочкою, барботером, механічним змішуючим пристроєм, ротаметром, датчиками рН, температури та рівня [32]
P-19	Реактор-змішувач	1	Апарат ємнісний з нержавіючої сталі об'ємом 100 л з сорочкою та механічним змішуючим пристроєм. Діаметр – 0,508 м, висота – 2,835 м, потужність двигуна – 0,75 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [37]
Дз-22 Дз-26	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Автоматичний дозатор з діапазоном дозування 60-500 кг. Дискретність – 0,2 кг, потужність – 0,3 кВт, похибка дозування – 1 % [38]
P-24	Реактор-змішувач	1	Апарат ємнісний з нержавіючої сталі об'ємом 630 л з сорочкою та механічним змішуючим пристроєм. Висота – 2,79 м, діаметр – 0,9 м, потужність двигуна – 2,2 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв [37]
H-25	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос PTL13. Продуктивність – 294 л/год, частота обертання – 120 об/хв, тиск на виході – до 4 бар [33]
P-28	Реактор-змішувач	1	Апарат ємнісний з нержавіючої сталі об'ємом 1 м ³ з сорочкою та механічним змішуючим пристроєм. Діаметр – 1,0 м, висота – 3,5 м, потужність двигуна – 2,2 кВт, частота обертання мішалки – 100 об/хв; [37]
H-29	Перистальтичний насос	1	Перистальтичний насос PTL17. Тиск до 4 бар, частота обертання – 120 об/хв, продуктивність – 778 л/год [33]

Закінчення табл. 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Фр-32	Ферментер	1	Ферментер з нержавіючої сталі об'ємом 6,3 м ³ , виконаний на замовлення у фірми Solaris Biotech, з сорочкою, барботером, механічним змішуючим пристроєм, ротаметром, датчиками рН, температури та рівня [32]

Розділ 7. Опис технологічної схеми

Технологічна схема отримання сукцинату за допомогою культури *Actinobacillus succinogenes* NJ113 включає допоміжні роботи (підготовка вуглекислого газу, приготування і стерилізація титрувальних агентів для регуляції рівня рН поживного середовища, підживлювального розчину сахарози та поживного середовища) та технологічний процес (отримання посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 та виробничий біосинтез сукцинату).

В графічній частині проекту наведено технологічну та апаратурну схему отримання сукцинату.

ДР 1. Підготовка вуглекислого газу для технологічного процесу

ДР 1.1 Подача вуглекислого газу

Вуглекислий газ подають з балону, для очищення якого використовують індивідуальні фільтри (ФІ-2, ФІ-8, ФІ-16, ФІ-31), які встановлюються безпосередньо перед посівними апаратами та ферментером. Ступінь очищення становить 99,9% (до ТП 5.5, ТП 5.6, ТП 5.7, ТП 6.1).

ДР 2. Приготування титрувальних агентів для регулювання рівня рН поживного середовища

ДР 2.1. Приготування розчину 6%-ї хлоридної кислоти для підкислення поживного середовища

Для зменшення рівня рН поживного середовища під час технологічного процесу необхідно приготувати 7,52 л 6 % хлоридної кислоти, для цього реактор-змішувач (Р-20) об'ємом 10 л заповнюють 6,26 л питної води та при постійному перемішуванні вносять 1,26 л 36%-ї хлоридної кислоти, попередньо відміряної мірним циліндром.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кухарова М.К.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					41	69
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 2.2. Приготування і стерилізація розчину 6-% їдкою натрію для підлуження поживного середовища

Для збільшення рівня рН поживного середовища під час технологічного процесу необхідно приготувати 7,52 л розчину 6%-го натрію гідроксиду. На технічних важать кристалічний натрій, масою 415 г. Отриману наважку поміщають в реактор-змішувач (Р-21) об'ємом 10 л та вносять 6,84 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв), після повного розчинення в даному реакторі розчин стерилізують 40 хв при 131°C (0,15 МПа).

ДР 3. Приготування і стерилізація підживлювального розчину

ДР 3.1. Приготування і стерилізація підживлювального розчину сахарози

Для приготування 430 л 50 % розчину сахарози за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Дз-22) в реактор-змішувач об'ємом 630 л (Р-24) подають 215 кг сахарози та через об'ємно-ваговий дозатор (Д-23) додають 390 л води питної. Для розчинення сахарози у сорочку реактора подають пару для підігріву розчину до 40 °С при постійному перемішуванні (100 об/хв). Після повного розчинення сахарози розчин стерилізують гострою парою 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4. Приготування і стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Для отримання початкового посівного матеріалу готують 350 мл поживного середовища. В табл. 7.1 наведено кількість компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

**Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в колбах на качалці**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 350 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	25	8,75	1	40
Дріжджовий екстракт	10	3,5		
Вода		40 (мл)		
KH ₂ PO ₄	3	1,05	2	50
Вода		50 (мл)		
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,2	0,07	3	260
CaCl ₂	0,2	0,07		
NaCl	1	0,35		
Вода		260 (мл)		

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції 1

На технічних вагах формують наважки сахарози масою 8,75 г та дріжджового екстракту – 3,5 г. Отримані наважки поміщають в колбу об'ємом 0,1 л, вносять 40 мл води питної, відміряної мірним циліндром, та перемішують до повного розчинення компонентів, розчинивши компоненти колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві, де відбувається стерилізація 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції 2

На технічних вагах формують наважку монофосфату калію масою 1,05 г. Отриману наважку поміщають в колбу об'ємом 0,1 л, вносять 50 мл води питної, відміряної мірним циліндром, та перемішують до повного розчинення компонентів, розчинивши компоненти колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві, де відбувається стерилізація 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції 3

На технічних вагах формують наважки хлориду магнію масою 0,07 г, хлориду кальцію – 0,07 г та хлориду натрію – 0,35 г. Отримані наважки

поміщають в колбу об'ємом 1 л, вносять 260 мл води питної, відміряної мірним циліндром, та перемішують до повного розчинення компонентів, розчинивши компоненти колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві, де відбувається стерилізація 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 6 л

Для отримання посівного матеріалу необхідно приготувати 3,75 л поживного середовища. В табл. 7.2 наведено склад компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.2

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 6 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,75 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	25	93,75	1	0,3
Дріжджовий екстракт	10	37,5		
Вода		0,3 (л)		
КН ₂ РО ₄	3	11,25	2	3
Вода		3 (л)		
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,2	0,75	3	0,45
CaCl ₂	0,2	0,75		
NaCl	1	1,75		
Вода		0,45 (л)		

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції 1

На технічних вагах формують наважки сахарози масою 93,75 г та дріжджового екстракту – 37,5 г. Отримані наважки поміщають в колбу об'ємом 0,5 л, додають 300 мл води питної, відміряної мірним циліндром, та перемішують до повного розчинення компонентів, розчинивши компоненти колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві, де відбувається стерилізація 30 хв при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції 2

На технічних вагах формують наважку монофосфату калію масою 11,25 г. Отриману наважку поміщають в колбу об'ємом 5 л, додають 3 л води питної, відміряної мірним циліндром, та перемішують до повного розчинення компонентів, розчинивши компоненти колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві, де відбувається стерилізація 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції 3

На технічних вагах формують наважки хлориду магнію масою 0,75 г, хлориду кальцію – 0,75 г та хлориду натрію – 1,75 г. Отримані наважки поміщають в колбу об'ємом 1 л, додають 450 мл води питної, відміряної мірним циліндром, та перемішують до повного розчинення компонентів, розчинивши компоненти колбу закривають ватно-марлевым корком та розміщують в автоклаві, де відбувається стерилізація 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 60 л

Для отримання посівного матеріалу на даній стадії необхідно приготувати 39,24 л поживного середовища. Враховуючи що стерилізація відбуватиметься гострою парою необхідно враховувати утворюваний конденсат який становить приблизно 10 %, отже, початковий об'єм води, потрібний для приготування поживного середовища, становитиме 35,68 л. В табл. 7.3 наведено склад компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

**Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 60 л**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 39,24 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	25	981	1	2,98
Дріжджовий екстракт	10	392,4		
Вода		2,98 (л)		
Конденсат		0,29 (л)		0,29
K_2HPO_4	3	117,7	2	32,7
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,2	7,85		
CaCl_2	0,2	7,85		
NaCl	1	39,24		
Вода		32,7 (л)		
Конденсат		3,27 (л)		3,27

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції 1

На технічних вагах формують наважки сахарози масою 981 г та дріжджового екстракту – 392,4 г. Отримані наважки переносять в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-5), додають 2,98 л води питної та одночасно вмикають мішалку і в сорочку реактора подають глуху пару для досягнення температури 40 °С. Після повного розчинення компонентів в даному реакторі впродовж 30 хв проводять стерилізацію гострою парою при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції 2

На технічних вагах формують наважки монофосфату калію масою 117,7 г хлориду магнію – 7,85 г, хлориду кальцію – 7,85 г та хлориду натрію – 39,24 г. Отримані наважки поміщають в реактор-змішувач об'ємом 5 л (Р-6), додають 2,7 л води питної перемішують до повного розчинення, після розчинення компонентів розчин з реактора переміщують в інокулятор, через об'ємно-ваговий дозатор (Д-7) додають 30 л води питної вмикають

перемішуючий пристрій та додають 6 % розчин хлоридної кислоти (від ДР 2.1) для доведення рівня рН до позначки 4,0. Після врегулювання рівня рН впродовж 40 хв проводять стерилізацію гострою парою при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 630 л

В посівному апараті необхідно приготувати 409,6 л поживного середовища. Враховуючи що стерилізація відбуватиметься гострою парою необхідно враховувати утворюваний конденсат який становить приблизно 10 %, отже, початковий об'єм води, потрібний для приготування поживного середовища, становитиме 372,8л. В табл. 7.5 наведено склад компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

Таблиця 7.4

Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 630 л

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 409,6 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	25	10 240	1	28,2
Дріжджовий екстракт	10	4 096		
Вода		28,2 (л)		
Конденсат		2,8 (л)		2,8
КН ₂ РО ₄	3	1 229	2	344,6
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,2	82		
CaCl ₂	0,2	82		
NaCl	1	410		
Вода		344,6 (л)		
Конденсат		34 (л)		34

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції 1

Через об'ємно-ваговий дозатор (Дз-11) в реактор-змішувач об'ємом 40 л (Р-12) вносять 10,24 кг сахарози та 4,096 кг дріжджового екстракту. Після зважування та розміщення компонентів в реактор за допомогою об'ємно-

вагового дозатора (Д-10) подають 28,2 л води питної та вмикають перемішувач з одночасним внесенням сухої пари в сорочку реактора для підвищення температури до 40 °С. Після розчинення компоненти композиції в реакторі впродовж 30 хв проводять стерилізацію гострою парою при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції 2

На технічних вагах формують наважки монофосфату калію масою 1 229 г хлориду магнію – 82 г, хлориду кальцію – 82 г та хлориду натрію – 410 г. Отримані наважки поміщають в реактор об'ємом 10 л (Р-14), через об'ємно-ваговий дозатор (Д-13) додають 6,6 л води питної перемішують до повного розчинення, після розчинення компонентів розчин з реактора подають в посівний апарат за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-15) додають 338 л води питної вмикають перемішувач та додають 6 % розчин хлоридної кислоти для доведення рівня рН до позначки 4,0. Після врегулювання рівня рН впродовж 40 хв проводять стерилізацію гострою парою при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу сукцинату в ферментері місткістю 6,3 м³

Для біосинтезу сукцинату в ферментері місткістю 6,3 м³ необхідно приготувати 3,918 м³ поживного середовища. Враховуючи що стерилізація відбуватиметься гострою парою необхідно враховувати утворений конденсат який становить приблизно 10 %, та враховуючи об'єм підживлювального розчину сахарози, початковий об'єм води, потрібний для приготування поживного середовища, становитиме 3 562 л. В табл. 7.5 наведено кількість компонентів для приготування даного об'єму поживного середовища.

**Склад композицій при стерилізації компонентів для вирощування
посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 6,3 м³**

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,918 м ³ середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції, л
Сахароза	60	235,1		550
Дріжджовий екстракт	10	39,2		
Кукурудзяний екстракт	5	19,6		
Вода		550 (л)		
Конденсат		55		55
КН ₂ РО ₄	3	11,75		3 012
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,2	0,78		
CaCl ₂	0,2	0,78		
NaCl	1	3,92		
Вода		3 012 (л)		
Конденсат		301		301

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції 1

Через об'ємно-ваговий дозатор (Дз-26) в реактор-змішувач об'ємом 1 м³ (Р-28) вносять 235,1 кг сахарози, 39,2 кг дріжджового екстракту та 19,6 кг кукурудзяного екстракту. Після зважування та розміщення компонентів в реактор через об'ємно-вагового дозатор (Д-27) подають 550 л води питної та вмикають перемішувач з одночасним внесенням глухої пари в сорочку реактора для досягнення температури 40 °С. Розчинивши компоненти композиції в реакторі проводять стерилізацію впродовж 30 хв гострою парою при тиску 0,05 МПа (112 °С).

ДР 4.5.2. Приготування і стерилізація композиції 2

На технічних вагах формують наважки монофосфату калію масою 11,75 кг хлориду магнію – 0,78 кг, хлориду кальцію – 0,78 кг та хлориду натрію – 3,92 кг. Отримані наважки поміщають в реактор об'ємом 100 л (Р-

19), через об'ємно-ваговий дозатор (Д-18) додають 62 л води питної перемішують до повного розчинення, після розчинення компонентів розчин з реактора подають в ферментер та за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-30) додають 2,95 м³ води питної і вмикають перемішуючий пристрій та додають 6 % розчин соляної кислоти для доведення рівня рН до позначки 4,0. Після врегулювання рівня рН проводять стерилізацію гострою парою впродовж 40 хв при тиску 0,15 МПа (131 °С).

ТП 5. Отримання посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Actinobacillus succinogenes* NJ113 зберігають на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) при 4 °С. Через кожні 3 місяці проводять пересіви, роботи з культурою відбуваються в строго асептичних умовах.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

В асептичних умовах використовуючи бактеріологічну петлю колекційну культуру методом виснажувального штриха розсівають на чашки Петрі з агаризованим середовищем (МПА) з метою отримання ізольованих колоній. Чашки поміщають в термостат, інкубують впродовж 12 год при 37 °С.

ТП 5.3. Вирощування посівного матеріалу на агаризованих поживних середовищах

Ізольовані колонії, в строго асептичних умовах, отримані на попередній стадії (від ТП 5.2), бактеріологічною петлею, пересівають в пробірки з агаризованим середовищем МПА (одну колонію використовують для засіву однієї пробірки). Ізольовані колонії (відстань яких не менше 1 см) пересівають в пробірки, інкубування проводять в термостаті при 37 °С впродовж 12 год.

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

В асептичних умовах в колбу з стерильною композицією 3 вносять 40 мл композиції 1 (від ДР 4.1.1) та 50 мл композиції 2 (від ДР 4.1.2) вміст колби перемішують та розливають по 117 мл в три стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

В кожену пробірку з робочою культурою *A. succinogenes* NJ113 вносять 5 мл фізіологічного розчину для суспендування клітин в строго асептичних умовах. Одержану суспензію клітин піпеткою відбирають та вносять у колби з поживним середовищем. Клітини одержані з однієї пробірки використовуються для засіву однієї колби.

Вирощують культуру в колбі на качалці (180 об/хв) при 37 °С упродовж 12 год. По завершенню культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}}=8$ г/л). Посівний матеріал з 3 колб, в асептичних умовах, переливають в стерильну засівну колбу об'ємом 0,5 л.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 6 л

В інокулятор об'ємом 6 л (Ін-3) в асептичних умовах вносять стерильну композицію 1 об'ємом 0,3 л (від ДР 4.2.1) композицію 2 об'ємом 3 л (від ДР 4.2.2) та композицію 3 об'ємом 0,45 л (від ДР 4.2.3), після внесення компонентів вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для об'єднання композицій. В подальшому через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 5.4).

Вирощують посівний матеріал при температурі 37 °С впродовж 12 год з витратою вуглекислого газу 0,5 л/(л·хв) та частоті обертання мішалки 180 об/хв. Кожні 4 год, а також по завершенню процесу культивування, відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}}=8$ г/л).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі місткістю 60 л

В інокулятор об'ємом 60 л (Ін-9) з простерилізованою композицією 2, самоплином з реактора об'ємом 5 л подають стерильну композицію 1 (від ДР 4.3.1) та розчин 6 % натрію гідроксиду (від ДР 2.2) для доведення рівня рН до позначки 6,8, внівши компоненти вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для об'єднання композицій. Об'єднавши композиції, за допомогою перистальтичного насоса (Н-4) в інокулятор подають посівний матеріал (від ТП 5.5).

Вирощують посівний матеріал при температурі 37 °С впродовж 12 год з витратою вуглекислого газу 0,5 л/(л·хв) та частоті обертання мішалки 180 об/хв. Кожні 4 год, а також по завершенні культивування, відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}}=8$ г/л).

ТП 5.7. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті місткістю 630 л

У посівний апарат об'ємом 630 л (ПА-17) з стерильною композицією 2 самоплином подають стерильну композицію 1 (від ДР 4.4.1) та розчин 6 % натрію гідроксиду (від ДР 2.2) для доведення рівня рН до позначки 6,8, внівши компоненти вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для об'єднання композицій. Об'єднавши композиції через трубу перетискування в посівний апарат вносять посівний матеріал (від ТП 5.6).

Вирощують посівний матеріал при температурі 37 °С впродовж 12 год з витратою вуглекислого газу 0,5 л/(л·хв) та при частоті обертання мішалки 180 об/хв. Кожні 4 год, а також по завершенню культивування відбирають пробу для здійснення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси ($C_{\text{біомаси}} = 8$ г/л).

ТП 6. Виробничий біосинтез сукцинату

ТП 6.1. Виробничий біосинтез в ферментері місткістю 6,3 м³

У ферментер об'ємом 6,3 м³ (Фр-32) з стерильною композицією 2 (від ДР 4.5.2) за допомогою перистальтичного насоса (Н-29) вносять стерильну композицію 1 (від ДР 4.5.1) та розчин 6 % натрію гідроксиду (від ДР 2.2) для

доведення рівня рН до позначки 6,8, внівши компоненти вмикають перемішуючий пристрій (100 об/хв) для об'єднання композицій. Об'єднавши композиції через трубу перетискування в виробничий ферментер подають посівний матеріал (*від ТП 5.7*).

Під час вирощування культури в ферментер за допомогою перистальтичного насоса (Н-25) починаючи з 4 год культивування кожні 7 год порційно подають стерильний підживлювальний розчин сахарози (*від ДР 3.1*).

Виробничий синтез відбувається до досягнення концентрації біомаси 16 г/л та концентрації сукцинату 60,4 г/л, при температурі 37 °С впродовж 36 год з витратою вуглекислого газу 0,5 л/(л·хв) з частотою обертання мішалки 200 об/хв.

Під час виробничого синтезу кожні 6 год, а також по закінченню культивування, відбирають проби культуральної рідини для встановлення концентрації джерел вуглецю та азоту, сукцинату і біомаси, а також для здійснення мікробіологічного контролю.

Розділ 8. Методи ідентифікації сукцинату та визначення показників його біологічної дії

8.1. Мікробіологічний контроль *Actinobacillus succinogenes* NJ113

Мікробіологічний контроль чистоти культури продуцента здійснюють двома методами: за допомогою висіву зразка на чашки Петрі методом виснажувального штриха або мікроскопії. Висів зразків на чашки Петрі проводять так: культуральну рідину висівають на чашки Петрі з агаризованими середовищами – м'ясо-пептонним агаром (МПА), щоб виявити бактерії (з подальшою інкубацією в термостаті протягом 36 год при температурі 37 °С), і сусло-агаром (СА) для виявлення грибів і дріжджів (з подальшою інкубацією в термостаті протягом 7 діб при температурі 30 °С) [39]. Після інкубації, при огляді чашок, на поживних середовищах мають спостерігатися білі гладенькі блискучі пласкі або злегка опуклі колонії *Actinobacillus succinogenes* NJ113 [40]. Разом з цим, не повинно бути колоній інших мікроорганізмів.

Мікроскопію проводять так: готують препарат «роздавлена крапля» шляхом нанесення краплини культуральної рідини на попередньо знежирене предметне скло з подальшим накриванням її покривним скельцем та мікроскопією з використанням об'єктиву зі збільшенням х40. У зразку мають спостерігатися клітини *Actinobacillus succinogenes* NJ113 (рис. 8.1), які є паличкоподібними, з заокругленими кінцями, мають довжину 2-3 мкм та ширину 0,4-0,6 мкм [40].



Рис. 8.1. Клітини *Actinobacillus succinogenes* NJ113 під мікроскопом

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Кухарова М.К.			РОЗДІЛ 8. Методи ідентифікації сукцинату та визначення показників його біологічної дії		
Перевір.		Сулейко Т.Л.					
Консультант							
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Літ.	Арк.	Аркушів
						53	69
					Кафедра БТМ		

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища здійснюють так: відбирають 10 мл поживного середовища після стерилізації, після чого з цієї кількості відбирають 0,1 мл і висівають на чашки Петрі з МПА (виявлення бактерій) і СА (виявлення грибів і дріжджів). Після здійснення посівів чашки інкубують у термостаті при температурі 37 °С протягом 36 год (МПА) та при 30 °С протягом 7 діб (СА). Після інкубації, при огляді чашок, на поживних середовищах не повинні спостерігатися ознаки росту мікроорганізмів [39].

8.2. Показники росту і синтезу сукцинату

8.2.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають гравіметрично: пробу культуральної рідини об'ємом 8 мл центрифугують (10000 g, 10 хв) для відділення клітин, які потім двічі промивають дистильованою водою, висушують за температури 90 °С до постійної маси, після чого зважують [9].

8.2.2. Концентрація сукцинату

Концентрацію бурштинової кислоти визначають методом високоефективної рідинної хроматографії, використовуючи для цього хроматограф Shimadzu LC20AT з іоноексклюзійною колонкою Aminex HPL-87H. Як елюент використовують 2,5 М розчин сульфатної кислоти, який подають зі швидкістю 0,6 мл/хв. Процес протікає за температури 50 °С [9].

8.2.3. Концентрація джерела Карбону і Нітрогену

Джерелом Карбону в поживному середовищі є сахароза, концентрацію якої визначають хроматографічно, використовуючи той самий хроматограф, що й при визначенні концентрації сукцинату (Shimadzu LC20AT). Колонка – Aminex HPL-87R, елюент – деіонізована вода (швидкість подачі – 0,5 мл/хв). Концентрацію сахарози визначають рефрактометрично – за показником заломлення розчину [9].

Джерелами Нітрогену в поживному середовищі є дріжджовий та кукурудзяний екстракти, в яких Нітроген наявний переважно в амінному вигляді. Амінний Нітроген визначають мідним способом. Суть методу:

зразок культуральної рідини центрифугують для видалення біомаси (10000g, 10 хв), після чого супернатант підлягає розчиненню натрієм гідроксидом (концентрація 0,1 М). Далі додають надлишкову кількість суспензії ортофосфату міді в боратному буфері для утворення розчинних комплексних сполук міді. Осад ортофосфату міді відділяють фільтруванням. В отриманий фільтрат вносять оцтову кислоту (для відщеплення міді від комплексних сполук і утворення ацетату міді). Після цього, до утвореного розчину додають калію йодид, для того, щоб у результаті реакції виділився йод, кількість якого буде еквівалентна кількості міді в розчині, а отже, й кількості амінного Нітрогену, і 0,01 М розчин тіосульфату натрію, для відтитрування виділеного йоду. Зрештою проводять розрахунок концентрації амінного Нітрогену (мг/л) з урахуванням того, що 1 мл витраченого на титрування 0,01 М розчину тіосульфату натрію відповідає 0,28 мг амінного Нітрогену [41]. Концентрацію кожного з екстрактів визначають, виходячи з вмісту амінного Нітрогену в кожному з них – 5 % у дріжджовому та 3 % – у кукурудзяному [42]. Враховуючи концентрацію цих компонентів (10 г/л і 5 г/л дріжджового та кукурудзяного відповідно), розрахуємо концентрацію амінного Нітрогену в кожному з них – $10 \cdot 0,05 = 0,5$ г/л та $5 \cdot 0,03 = 0,15$ г/л. Отже, виходить, що в розрахунку на 1 л середовища в дріжджовому екстракті амінного Нітрогену буде в $0,5/0,15 = 3,3$ рази більше. Приймаємо, що аміний Нітроген з обох екстрактів споживається продуцентом одночасно. Тоді, визначивши загальну кількість амінного Нітрогену, концентрацію кукурудзяного екстракту можна обчислити, поділивши цю кількість на 4,3 ($3,3 + 1$). Віднявши отримане значення від загальної кількості амінного Нітрогену, отримаємо вміст дріжджового екстракту.

Розділ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва

Виробничий процес на біотехнологічних підприємствах є джерелом емісії твердих, рідких та газоподібних відходів. До твердих відходів в основному відносять пакування від речовин які використали в процесі виробництва та біомаса мікроорганізму після синтезу цільового продукту. Газоподібні відходи в основному складаються з викидів вуглекислого газу, які отримують в процесі вирощування посівного матеріалу *Actinobacillus succinogenes* NJ113 та виробничого синтезу сукцинату. До рідких відходів відносять залишки миючих та дезінфікуючих засобів, залишки титрувальних агентів, та рідкі відходи, що утворюються під час виділення цільового продукту з культуральної рідини. Враховуючи велику кількість потенційних відходів на біотехнологічних виробництвах впроваджують системи знешкодження відходів задля зменшення загрози для навколишнього середовища, з даною метою розглянемо декілька методів.

Система знешкодження твердих відходів

Під час виробничого процесу основним об'ємом твердих відходів є пакувальна тара, враховуючи сучасні тенденції пов'язані з вторинним використанням сировини, розраховувати об'єми та способи знешкодження даних речовин не має сенсу, так як пакувальну тару можна сортувати і віддавати на вторинну переробку. До твердих відходів також відноситься біомаса продуцента, так як цільовий продукт виробництва (сукцинат) є ендометаболіт то після процесу ферментації з біомаси екстрагують сукцинат а відпрацьовану біологічну масу утилізують. Найзручнішим та найпростішим способом утилізації біомаси є її спалювання, при використанні даного способу енергію від згоряння можна використовувати для обігріву виробничих приміщень в зимовий період.

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Кухарова М.К.			РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Сулейко Т.Л.					55	69
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Система знешкодження рідких відходів

Для очищення рідких відходів можна використати метод описаний в патенті [43]. Дана технологія дозволяє повторно використовувати очищену воду на підприємстві, що є економічно вигідно.

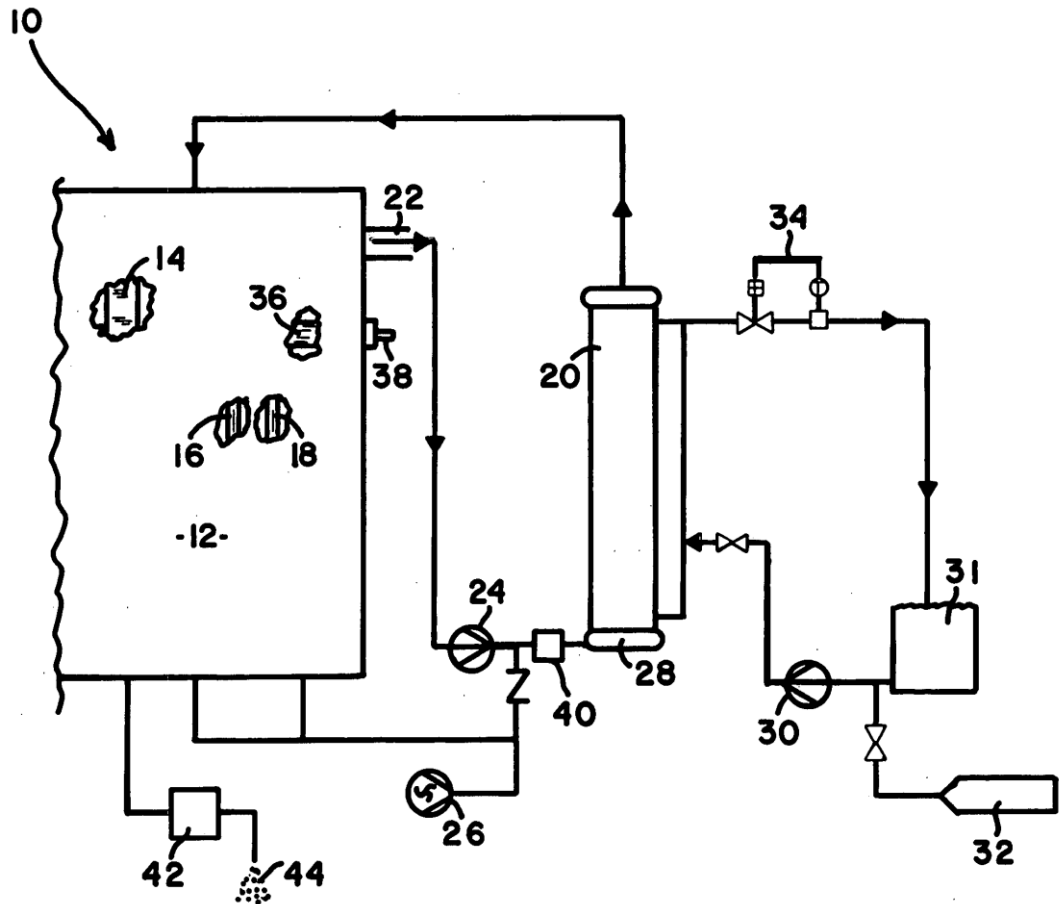


Рис. 9.1. Схематичне зображення установки очищення рідких відходів

Під час очищення використовується біологічний басейн в якому знаходяться колектор I.V.E (14), який стабілізує потік рідини та в подальшому направляє його вниз через шари біомаси, які виступають в якості природного біологічного фільтра. В подальшому потік проходить через запатентовану перегородку omni-flow (16) де відбувається денітрифікація та в подальшому проходячи через другу перегородку post omni-flow (18) де відбувається дезінфекція та освітлення рідини. Потім через патрубок (22) рідина направляється до установки зворотного осмосу (20). Також дана схема передбачає наявність спалювача (42), який дозволяє за

потреби спалювати непотрібні речовини (наприклад мул, тощо) перетворюючи їх на золу.

Отримана установка очищає на 100 % від колоїдних речовин розміром понад 10 нм, каламутність води становить менше 0,1 NTU, та повністю видаляє органічних сполуки з великою молекулярною масою (понад 100 кДа).

Система знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи формуються на доферментаційних стадіях в інокуляторах та посівних апаратах, під час ферментації та на післяферментаційних стадіях в основному під час сушіння продукту в залежності від способу сушіння. Газоподібні відходи в основному складаються з аерозолу бактеріальних спор та вуглекислого газу.

Процес отримання посівного матеріалу становить 12 год на всіх стадіях, вирощування посівного матеріалу, який відбувається в інокуляторах 6 л та 60 л та посівному апараті об'ємом 630 л, а процес виробничого синтезу в ферментері 6,3 м³ – 28 год. Під час вирощування культури та виробничого синтезу сукцинату відбувається внесення вуглекислого газу з однаковою швидкістю 0,5 л/(л·хв), тоді кількість газоподібних відходів буде становити:

$$(4,13 \text{ л} + 43,16 \text{ л} + 450,6 \text{ л}) \times 0,5 \text{ л}/(\text{л} \times \text{хв}) \times 12 \text{ год} \times 60 = 179,4 \text{ м}^3$$

$$4\,740 \times 0,5 \text{ л}/(\text{л} \times \text{хв}) \times 28 \text{ год} \times 60 = 3\,981,6 \text{ м}^3$$

$$179,4 \text{ м}^3 + 3\,981,6 \text{ м}^3 = 4\,161 \text{ м}^3 \text{ загальний об'єм газоподібних відходів}$$

Дану кількість відпрацьованого повітря можна очищувати технологією описаною в патенті [44], дана технологія одночасно спроможна очищувати до 100 тис м³ відпрацьованих газів.

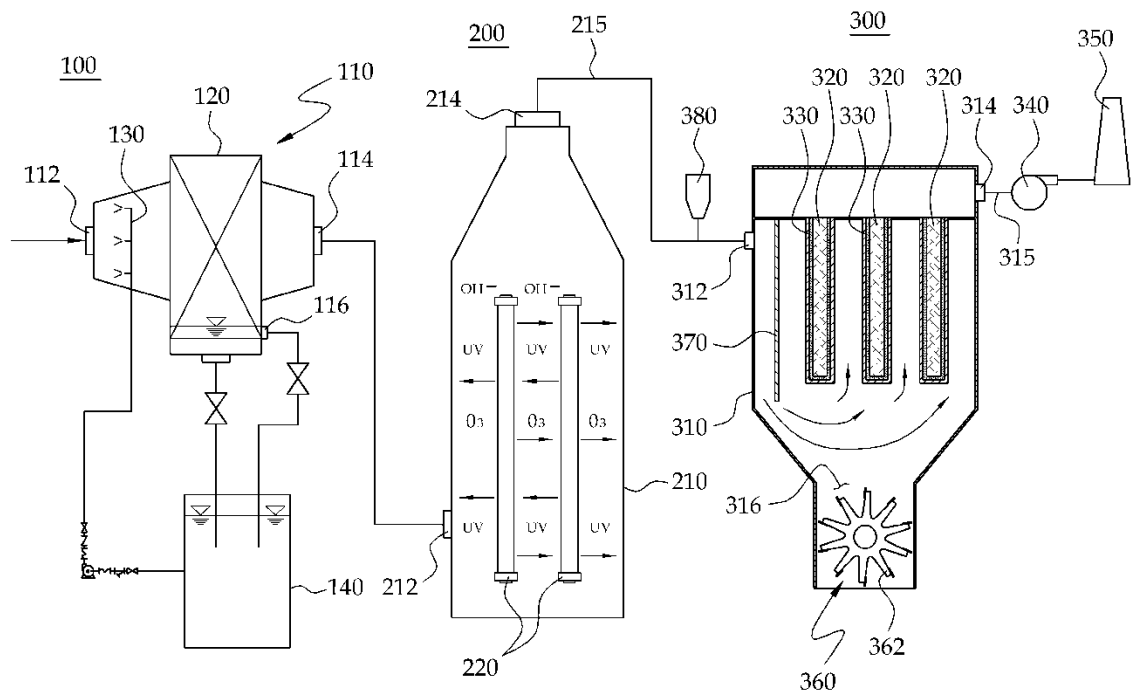


Рис. 9.2. Схематичне зображення установки очищення газоподібних відходів

Технологія очищення газів передбачає пристрій вологого очищення (100), пристрій високого ступеня окиснення (200) та пристрій очищення сухого типу (300).

Етап вологого очищення включає наявність очисної камери вологого типу (110), в яку подають відпрацьовані гази через отвір (112), з випускним отвором (114) для подальшого очищення газів розпиленням миючої розчину через розпилювальну насадку (130). Пристрій для окиснення складається з удосконаленої камери окиснення (210) та УФ-лампи (220). Очищувач сухого типу містить очисну камеру (310) сухого типу та безліч фільтрувальних тканин (320).

Розділ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва

До будь-якого виробництва застосовується низка нормативно-технічної документації яка є обов'язковою, в нашому випадку цільовим продуктом біотехнологічного виробництва виступає сукцинат, так як дана речовина не є лікарським засобом, вимоги для її виробництва будуть менш жорсткими. Розглянемо нормативні-документи які слід застосовувати про біотехнологічному виробництві сукцинату:

ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни та визначення [45]

ДСТУ EN 12460:2019 Біотехнологія. Великосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибирання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику (EN 12460:1998, IDT) [46]

ДСТУ EN 12683:2019 Біотехнологія. Змінені організми для використання в довкіллі. Настанови щодо складання характеристики генетично зміненого організму через аналізування тривкості зміни геному на молекулярному рівні (EN 12683:1998, IDT) [47]

ДСТУ EN 12689:2019 Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основі мікроорганізмів (EN 12689:1998, IDT) [48]

ДСТУ ISO 7218:2014 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень (ISO 7218:2007, ISO 7218:2007/Amd 1:2013, IDT) [49]

ГОСТ 6341-75 Реактивы. КИСЛОТА ЯНТАРНАЯ. Технические условия. (Реактивы. Кислота бурштинова. Технические условия) [50]

ДСТУ Б А.3.2-12:2009 Системи вентиляційні. Загальні вимоги [51]

					НУХТ БТЕК 04.03.21 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
<i>Розроб.</i>		<i>Кухарова М.К.</i>			РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	Літ.	Арк.	Аркушів
<i>Перевір.</i>		<i>Сулейко Т.Л.</i>					60	69
<i>Консультант</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ДСТУ prEN 1672-1-2001 Обладнання для харчової промисловості. Вимоги щодо безпеки і гігієни. Основні положення. Частина 1. Вимоги щодо безпеки (prEN 1672-1:1994, IDT). З поправкою [52]

ДСТУ 8828:2019 Пожежна безпека. Загальні положення [53]

ДСТУ 4312:2012 Протипожежна техніка. Системи газового пожежогасіння. Модулі ізотермічні. Загальні технічні умови [54]

ДСТУ ISO 11690-1:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування мал шумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 1. Стратегія керування шумом (ISO 11690-1:1996, IDT) [55]

ДСТУ ISO 11690-2:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування мал шумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 2. Заходи щодо керування шумом (ISO 11690-2:1996, IDT) [56]

ДСТУ 4462.0.01:2005 Охорона природи. Поводження з відходами. Терміни та визначення понять [57]

ДСТУ ISO 4787:2009 Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевіряння місткості (ISO 4787:1984, IDT) [58]

ДСТУ EN ISO 835:2018 Посуд лабораторний скляний. Піпетки мірні градуйовані (EN ISO 835:2007, IDT; ISO 835:2007, IDT) [59]

ДСТУ 3276-95 Посуд сталевий емальований. Загальні технічні умови. З поправкою [60]

ДСТУ ISO 9001:2015. Системи управління якістю. Вимоги (ISO 9001:2015, IDT) [61]

ДСТУ ISO 1042:2005 Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT) [62]

ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування (ISO 14001:2015, IDT) [63]

ДСТУ EN ISO/IEC 17000:2021 Оцінювання відповідності. Словник термінів і загальні принципи (EN ISO/IEC 17000:2020, IDT; ISO/IEC 17000:2020, IDT) (заміна ДСТУ 2462-94 Сертифікація. Основні поняття. Терміни та визначення) [64]

Література

1. Cukalovic A., Stevens C.V. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: A marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels Bioprod Biorefin.* 2008, 2: 505–529
2. Cok B., Tsiropoulos I., Roes A.L. Succinic acid production derived from carbohydrates: An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels Bioprod Biorefin.* 2014, 8: 16–29
3. Yang Q., Wu M., Dai Z. Comprehensive investigation of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*: a promising native succinic acid producer. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 2019. doi:10.1002/bbb.2058
4. Succinic acid [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Succinic_acid
5. Succinic acid [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Succinic_acid#Commercial_production.
6. E363 – Янтарная кислота [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dobavkam.net/additives/e363>.
7. Succinic acid [Електронний ресурс] //Режим доступу. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1110>
8. Jiang, M., Dai, W. Succinic acid production from sucrose by *Actinobacillus succinogenes* NJ113. *Bioresource Technology.* 2014, 153 – 327–332. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.06
9. Cao, W., Wang, Y. Succinic acid biosynthesis from cane molasses under low pH by *Actinobacillus succinogenes* immobilized in luffa sponge matrices. *Bioresource Technology.* 2018, 268 – 45–51. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.07
10. Shen, N., Qin, Y., Wang, Production of succinic acid from sugarcane molasses supplemented with a mixture of corn steep liquor powder and peanut meal as nitrogen sources by *Actinobacillus succinogenes*. *Letters in Applied Microbiology.* 2015, 60(6) – 544–551. doi: 10.1111/lam.12399.
11. Tan J. P., Jahim J. M. Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *IOP*

Conference Series: Earth and Environmental Science. 2016, 36: 012058.
doi:10.1088/1755-1315/36/1/012058

12. Guettler M. V., Rumler D., Jain M.K. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 2009, 49: 207-216.

13. McKinlay J.B., Shachar-Hill Y. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers. *Metabolic Engineering*. 2007, 9: 177-192.

14. Kim P., Laivenieks M. Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70: 1238-1241.

15. Park D. H., Laivenieks M., Guettler M. V., Jain M. K. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65: 2912-2917.

16. Zeikus J. G., Jain M.K., Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 51: 545-552.

17. Litsanov B., Brocker M. Succinic Acid. *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*. 2014, 435-472. doi:10.1002/9781118845394.ch16

18. Saxena R. K., Saran S., Isar J. Production and Applications of Succinic Acid. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 601-630. doi:10.1016/b978-0-444-63662-1.00027-0

19. Pat. US5229161A Turk R. Metal free and low metal salt substitutes containing lysine. 1993

20. Xu J., Guo, B.-H. Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate), and Applications. *Plastics from Bacteria*. 2009, 347-388. doi:10.1007/978-3-642-03287-5_14

21. Nghiem N., Kleff S., Schwegmann S. Succinic Acid: *Technology Development and Commercialization. Fermentation.* 2017, 3(2): 26. doi:10.3390/fermentation3020026

22. Янтарна кислота для рослин [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://agro-market.net/ua/news/tips_and_advice/yantarnaya_kislota_dlya_rasteniy/

23. Global Polybutylene Succinate (PBS) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-polybutylene-succinate-pbs-market>

24. Саттичний щорічник України [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ukrstats.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2021/zb/11/Yearbook_2020.pdf

25. Pat. WO2022158876A1 박제영. Polybutylenesuccinate-carbonate crosslinked copolymer, composite material of same crosslinked copolymer and nanocellulose, and method for preparing same 28.07.2022

26. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/>

27. Дезактин [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://proam.ua/ua/p1187438859-dezaktin.html?utm_source=google_producta&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gclid=CjwKCAajwitShBhA6EiwAq3RqA88Quqv0MlkrbVawRbE5c7baPB0hYZGsDJfXSa0hD3LLkMR0S7E38ayBoCPAIQAvD_BwE

28. Методичні рекомендації [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://atma.ua/download/?id=183>

29. Антимікробна дія, Ексан Про Дез [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/ua/p914551087-eksan-pro-dez.html?utm_source=google_pmax&utm_medium=cpc&utm_content=pmax&utm_campaign=Pmax_cpa_1_50_dom_i_sad&gclid=CjwKCAajwitShBhA6EiwAq3R

qA63qo322zwd-

kQ9lxX0Rgkv7Cgprp5peO33Fks4SGZzQUH8QMq1Q7RoCZ5YQAvD_BwE

30. Сода каустична [Електронний ресурс]. Режим доступу:
[https://proam.ua/ua/p694734755-kaustickheskaya-soda-](https://proam.ua/ua/p694734755-kaustickheskaya-soda-grranula.html?&primelead=Mі43NA)

[grranula.html?&primelead=Mі43NA](https://proam.ua/ua/p694734755-kaustickheskaya-soda-grranula.html?&primelead=Mі43NA)

31. Фільтри індивідуальні [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.technofilter.com.ua/types/hepa/>.

32. SIP and CIP Pilot and Industrial Scale [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.solaarisbiotech.com/en/fermenters-bioreactors-pilot-industrial-customizable>.

33. Насоси перистальтичні [Електронний ресурс]. Режим доступу:
https://taapflo.ua/images/pt_ptl_ua_rev1_2019.pdf.

34. Stirred Reassure Autoclave Reactor [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.aamarequip.com/stirred-pressuree-autoclave-reaactor>.

35. Лічильник [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://proam.ua/ua/p1139912056-schetchik-dozator-dlya.html>

36. Дозатор [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://aratmash.ua/product/dozator-syapuchih-materialov-06-kub-m>.

37. Апарати сталеві з перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс].
Режим доступу:
http://euromasdh.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.

38. Дозатор автоматичний [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://vesmastesr.com.ua/images/dozatorsd/doz4.html>.

39. Красінько, В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія" ден. і заоч. форм навч. / В. О. Красінько ; Нац. ун-т харч. технол. – Київ: НУХТ – 2019. – 252 с.

40. Патент №114497. Властивості і спосіб одержання янтарної кислоти / Д. Живкович, Я. Крікен. Опубл. 26.06.2017.

41. Визначення вмісту амінного азоту [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5193901/page:15/>.

42. Tan, J.-P., Jahim, J.-M. Use of corn steep liquor as an economical nitrogen source for biosuccinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2016, 36: 012058. doi: 10.1088/1755-1315/36/1/012058.

43. Pat. US20070045183A1 United States. Purified water reclamation process / Dee Murphy. Pub. 01.03.2007 [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://patents.google.com/patent/US20070045183A1/en?q=\(purification+water+waste\)&oq=purification+water+waste](https://patents.google.com/patent/US20070045183A1/en?q=(purification+water+waste)&oq=purification+water+waste)

44. Pat. KR20100118643A Korean. Gas purifying system / 이인섭김현. Pub. 08.11.2010 [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://patents.google.com/patent/KR20100118643A/en?q=\(industrial+scrubbers+for+cleaning+air+waste\)&oq=+industrial+scrubbers+for+cleaning+air+waste](https://patents.google.com/patent/KR20100118643A/en?q=(industrial+scrubbers+for+cleaning+air+waste)&oq=+industrial+scrubbers+for+cleaning+air+waste)

45. ДСТУ 3803-98 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://national_standardts_ukr.academic.ru/20655/%D0%94%D0%A1%D0%A2%D0%A3_3803-98

46. ДСТУ EN 12460:2019 Біотехнологія. Великкосерійна технологія та виготовлення. Настанови щодо вибрання та встановлення устаткування відповідно до біологічного ризику (EN 12460:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84126

47. ДСТУ EN 12683:2019 Біотехнологія. Змінені організми для використання в довкіллі. Настанови щодо складання характеристики генетично зміненого організму через аналізування тривкості зміни геному на молекулярному рівні (EN 12683:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84130

48. ДСТУ EN 12689:2019 Біотехнологія. Настанови щодо оцінювання чистоти, біологічної активності та тривкості продуктів на основі мікроорганізмів (EN 12689:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=84132

49. ДСТУ ISO 7218:2014 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови щодо мікробіологічних досліджень (ISO 7218:2007, ISO 7218:2007/Amd 1:2013, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=82219

50. Реактивы. КИСЛОТА ЯНТАРНАЯ. Технические условия [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://docs.cntd.ru/document/1200017514>

51. ДСТУ Б А.3.2-12:2009 Системи вентиляційні. Загальні вимоги [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://ksv.do.am/GOST/DSTY_ALL/DSTY4/dsty_b_a.3.2-12-2009.pdf

52. ДСТУ prEN 1672-1-2001 Обладнання для харчової промисловості. Вимоги щодо безпеки і гігієни. Основні положення. Частина 1. Вимоги щодо безпеки (prEN 1672-1:1994, IDT). З поправкою [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=65272

53. ДСТУ 8828:2019 Пожежна безпека. Загальні положення [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=82138

54. ДСТУ 4312:2012 Протипожежна техніка. Системи газового пожежогасіння. Модулі ізотермічні. Загальні технічні умови [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=54571

55. ДСТУ ISO 11690-1:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування мал шумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 1. Стратегія керування шумом (ISO 11690-1:1996, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=51154

56. ДСТУ ISO 11690-2:2005 Акустика. Практичні рекомендації щодо проектування малошумних робочих місць, обладнаних механізмами. Частина 2. Заходи щодо керування шумом (ISO 11690-2:1996, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=51155

57. ДСТУ 4462.0.01:2005 Охорона природи. Поводження з відходами. Терміни та визначення понять [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=51368

58. ДСТУ ISO 4787:2009 Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевіряння місткості (ISO 4787:1984, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=26026

59. ДСТУ EN ISO 835:2018 Посуд лабораторний скляний. Піпетки мірні градуйовані (EN ISO 835:2007, IDT; ISO 835:2007, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=80548

60. ДСТУ 3276-95 Посуд сталевий емальований. Загальні технічні умови. З поправкою [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=97976

61. ДСТУ ISO 9001:2015. Системи управління якістю. Вимоги (ISO 9001:2015, IDT). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://khoda.gov.ua/image/catalog/files/%209001.pdf>

62. ДСТУ ISO 1042:2005 Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT) [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=53493

63. ДСТУ ISO 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосовування (ISO 14001:2015, IDT). [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://quality.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2018/10/%D0%94%D0%A1%D0%A2%D0%A3-ISO_14001-2015-.pdf

64. ДСТУ EN ISO/IEC 17000:2021 Оцінювання відповідності. Словник термінів і загальні принципи (EN ISO/IEC 17000:2020, IDT; ISO/IEC 17000:2020, IDT). [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=96931

Додатки

Схема біотрансформації сахарози в сукцинат

