

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 20__р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 20__р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності __ 162 «Біотехнології та біоінженерія» __

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: «Одержання альгінату культивуванням *Azotobacter vinelandii*»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

Малко Діана Ігорівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Ключка Лілія Вікторівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Годовський О.В.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ - 2021р.

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 «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології
Пирог Т.П.
“28” жовтня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Малко Діани Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Одержання альгінату культивуванням *Azotobacter vinelandii*»

керівник роботи Ключка Лілія Вікторівна ,ас.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27” жовтня 2020 року №875

2. Строк подання здобувачем роботи до 31.01.2021

3. Вихідні дані до роботи геометричний об'єм ферментера 10 м³,
коефіцієнт заповнення ферментера становить 0.7,

цільовий продукт резистоміцин, виробничий штам *Azotobacter vinelandii*

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Характеристика цільового продукту

Характеристика біологічного агента

Техніко-економічне обґрунтування

Обґрунтування вибору технологічної схеми

Специфікація обладнання

Опис технологічної схеми

Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва резистоміцину А1- аркушів 2

Апаратурна схема виробництва резистоміцину формату А1 -аркушів 1

РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробці технології одержання екзополісахиду альгінату шляхом культивування продуктивного штаму *Azotobacter vinelandii* ІБ 1, який синтезує до 20,5 г/л альгінату, що понад у 2 рази більше ніж інші відомі продуценти (*A. vinelandii* ATCC 9046, *A. vinelandii* ВКПМ В-5933, *A. vinelandii* ATCC 478). На основі техніко-економічного обґрунтування визначено потребу у альгінаті (передбачається використання цього екзополісахариду для лікування гастроезофагально рефлексної хвороби), що становить 6612,48 кг альгінату на рік.

Обґрунтовано вибір способу культивування, тип ферментера. Технологічна частина включає допоміжні роботи (підготовка миючих і дезінфікуючих засобів, підготовка обладнання та комунікацій, стерильного аераційного повітря, титрувальних агентів, приготування та стерилізацію поживного середовища для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу) та технологічний процес (отримання робочої культури та культивування продуцента у колбах на качалках, у інокуляторі об'ємами 10 та 100 л, посівному апараті об'ємом 1000 л та ферментері об'ємом 10 м³)

Дипломний проект складається із вступу, семи розділів, списку використаної літератури з 28 джерел. Загальний обсяг проекту – 65 сторінок, 12 таблиць, 4 рисунки. Графічна частина – технологічна та апаратурна схеми (3 аркуші формату А1).

Ключові слова: *Azotobacter vinelandii*, альгінат, полісахарид, екзополісахарид, меляса.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту.....	6
РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента.....	9
2.1. Вибір біологічного агенту та поживного середовища для його культивування.....	10
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	11
2.3. Таксономічний статус біологічного агенту.....	13
2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	14
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування.....	18
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	18
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	20
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	22
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми.....	24
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу....	24
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	24
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	28
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	29
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	34
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання.....	39
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми.....	43
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва.....	59
7.1. Мікробіологічний контроль.....	59
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	60
7.2.1. Концентрація біомаси.....	60
7.2.2. Концентрація цільового продукту.....	60
7.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	60

7.4. Карта постадійного контролю.....	62
ЛІТЕРАТУРА.....	69
ДОДАТОК.....	

ВСТУП

Упродовж останніх 20-30 років мікробні екзополісахариди (ЕПС) – це високомолекулярні екзогенні полімери вуглеводної природи, синтезовані бактеріями та грибами, які є об'єктом теоретичних і прикладних досліджень [1]. Останнім часом ЕПС знаходять широке застосування в медицині як імуномодулятори, антивірусні препарати і стимулятори кровотворення, а також ефективні при шлунково-кишкових захворюваннях [2,3].

Мікробні ЕПС мають ряд переваг перед полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних обсягах незалежно від пори року і кліматичних умов [4]. Економічна доцільність використання мікробних ЕПС зумовлена їх позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні ЕПС стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування, наприклад, у нафтодобуванні, фармацевтиці, медицині, харчовій промисловості та ін.[5,1].

Саме тому у багатьох науково-дослідних лабораторіях провідних країн світу проводиться розробка ефективних способів отримання полісахаридів шляхом мікробного синтезу.

Велике значення для промисловості мають такі полісахаридів: декстрин (продуцент *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus bovis*), ксантан (продуцент *Xanthomonas campestris*), склероглюкан (продуценти *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium* sp.), курдлан (продуценти *Agrobacterium* sp., *Cellulomonas flavigena*), пулулан (продуцент *Aerobasidium pullulans*), альгінат (*Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*) [6].

					НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ			
Змн	Арк.	№ докум.	Підпис	Лат				
Розроб.	Малко А				Вступ	Літ.	Арк.	Аквішів
Певевіп.	Ключка						1	2 6
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н.								
Затверд.	Пирог Т П							

Високоєфективним продуцентом альгінату є *A. vinelandii* ІБ 1, який синтезує до 20,5 г/л цільового продукту [7].

Альгінат, у якості діючої речовини входить до складу антацидного препарату «Гавіскон», який застосовується для лікування гастроєзофагально рефлексної хвороби (ГЕРХ), на яку хворіє до 50 % населення України [8].

Актуальність теми. Незважаючи на досягнуті успіхи в галузі біотехнології мікробних полісахаридів дуже гостро стоїть проблема пошуку нових економічних способів їх отримання. Вивчення складу і властивостей мікробних полісахаридів дає ключ до розробки раціональних методів їх виділення, створенню оптимальних готових форм і композицій на їх основі, що в підсумку розширює вибір полісахаридів і області їх ефективного використання.

Відомо, що бактерії, які належать до роду *A. vinelandii*, при глибинному культивуванні утворюють значні кількості екзополісахариду (ЕПС), який представлений як у вигляді капсул, який оточує бактеріальні клітини, так і у вигляді аморфного слизу, що поширюється в поживному середовищі.

Завдяки здатності впливати на реологічні властивості водних систем при малих концентраціях бактеріальні ЕПС застосовуються в різних галузях промисловості.

На сьогоднішній день на ринках України та Росії практично немає вітчизняних мікробних біополімерів полісахаридної природи, що випускаються в промислових масштабах. У зв'язку з цим актуальною є розробка технології одержання біополімеру на основі бактеріального високов'язкого ЕПС з новими властивостями і складом [9,10].

Новизна. Новизною курсового проекту є використання нового штаму продуцента ЕПС, а саме *A. vinelandii* ІБ 1. Даний продуцент дозволяє отримати ЕПС альгінатного типу при його біосинтезі на середовищі Федорова в кількості 20,5 г/л, що у свою чергу майже у 2 рази перевищує показники синтезу інших продуцентів, при цьому час культивування становить 40 годин [7].

РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту

Альгінат – це полісахарид, який складається з залишків β -D-мануронової кислоти (М-блок) і α -L-гулуринової кислоти (G-блок), зв'язаних 1,4-глікозидними зв'язками [1, 5].

Мономери альгінату можуть мати різну структуру. Саме тому дуже часто описується структура, яка складається з М-блоків та G-блоків. Структура і молекулярна маса є властивостями, які характеризують функціональні властивості альгінату. Молекула мікробного альгінату має таку структуру (рис. 1.1.).

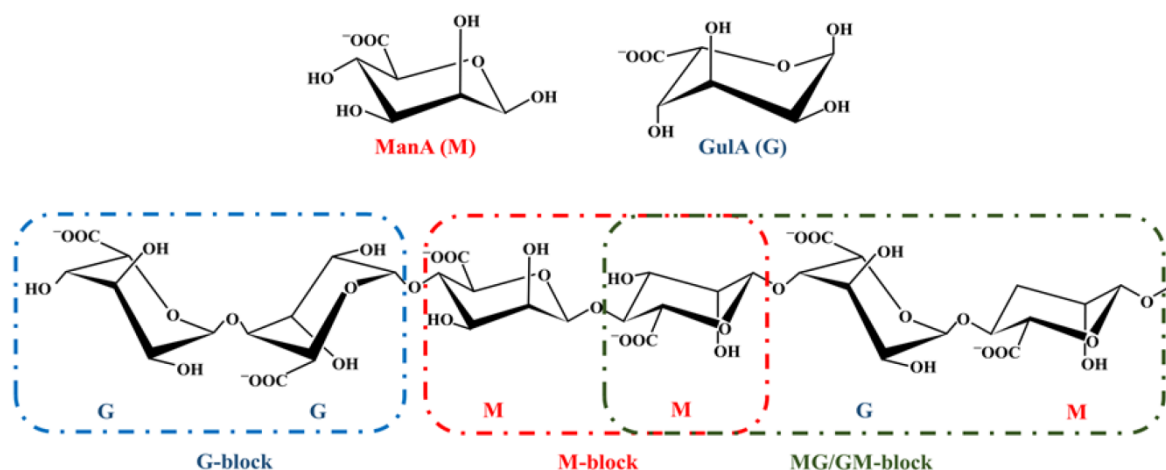


Рис. 1.1. Структурна формула альгінату

Молекулярна маса становить від 250 до 350 кДа і в певній мірі залежить від способу культивування та продуцента альгінату [9].

В'язкість екзополісахариду залежить від молекулярної маси альгінату, ступеню ацетилювання та джерела вуглецю. Використовуючи мелясу в якості джерела вуглецю можна досягти в'язкості екзополісахариду >30000 сСт (сантистоксів). Це можна пояснити особливостями культури-продуцента, яка потребує додаткових факторів для росту і секреції ЕПС, які містяться в мелясі

					НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту					
Розроб.	Малко А.							Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Ключка Л.В.								1	2
Реценз.								8		
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.	Пирог Т.П.									

В'язкість і здатність до гелеутворення альгінатних полісахаридів визначається, головним чином, високим вмістом α -L-гулуранової кислоти (відносною довжиною G-блоків полімерного ланцюга) і ступенем наявності ацетильних груп [5, 10].

При додаванні сульфатів у культуральну рідину в'язкість нативного ЕПС зростає до 146% по відношенню до вихідної в'язкості – без додавання солей, розведеного – до 148%, частково гідролізованого – до 161%. Підвищення в'язкості більшою мірою спостерігалось під впливом сульфатів натрію і марганцю. Хлориди металів знижують в'язкість ЕПС до 61–84%, розведеного і частково гідролізованого ЕПС – до 74–82%. Хлорид заліза (III), володіючи сильно вираженими властивостями кислоти Льюїса, негативно діють на в'язкість гелю екзополісахариду, осаджуючи його з розчину. Нітрати лужних і лужноземельних металів знижують в'язкість як нативного, так і розбавленого ЕПС до рівня 60–70% від вихідного, частково гідролізованому ЕПС ці солі надають стабілізуючу дію [9, 10].

Альгінат стабільний при рН 4–9 в широкому інтервалі температур, добре розчиняється в високомінералізованій та гарячій воді (при температурі від 60°C), зберігаючи високий рівень в'язкості, не розчинний у холодній воді та органічних розчинниках з концентрацією вище 30%, має ступінь полімеризації – 950 [5, 9].

Застосування. Враховуючи той факт, що мікробні екзополісахариди мають ряд переваг перед полісахаридами рослинного походження, оскільки бурі водорості є цінною харчовою та лікарською сировиною, то перспективним є виробництво мікробного альгінату, який слугує заміником рослинного.

Альгінат застосовується у різних галузях промисловості: харчовій, фармацевтичній, нафтовій, сільськогосподарській тощо.

На сьогоднішній день, у харчовій промисловості альгінати застосовуються у якості стабілізаторів та згущувачів молочної продукції: йогуртів, сметани, різноманітних сирних виробів, соусів та майонезів.

Мікробні альгірати можуть бути стабілізаторами піни при виробництві пива і можливе їх застосування як стабілізаторів формоутворення в кондитерських виробках [5, 9].

На основі альгірату в США розроблені методи отримання штучної ікри, картопляних стружок, кілець цибулі і різних закусок. Вчені стверджують, що ми знаходимося на порозі нової ери розвитку штучних харчових продуктів і можемо досягти хороших результатів, використовуючи величезний потенціал полісахаридів [5, 10, 11].

У фармацевтичній галузі альгірат в якості діючої речовини входить до складу лікарського засобу «Гавіскон», який використовується для лікування гастроезофагально рефлексної хвороби [10, 12]. Також альгірат використовують як носій для іммобілізації пробіотичних культур мікроорганізмів та ряду ферментів (наприклад ліпази) з метою захисту їх від дії несприятливих чинників, в тому числі і шлункового соку [13, 14].

Останні наукові дослідження показали ефективність застосування гідрогелів на основі альгірату для «адресної» доставки ліків до ракових клітин, покриття ран та «біочорнил» для 3D біопренту органів [2].

РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента

2.1. Вибір біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Альгірати отримують за допомогою екстракції з бурих водоростей *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum sinicola* чи *Laminaria hyperborean* або виділяють з культуральної рідини *Pseudomonas aeruginosa* та *Azotobacter vinelandii* [5, 15].

Macrocystis pyrifera – це бура водорість, яка найчастіше використовується для одержання альгірату і спеціально вирощується для цього на морських фермах в тихоокеанському регіоні [14]. Гель з такого альгірату характеризується дещо меншою міцністю та стабільністю, ніж добутий з інших видів водоростей - *Sargassum sinicola* та *Laminaria hyperborean*. Альгірат з них позбавлені даного недоліку, однак їх вирощування менш поширене [11, 16].

Pseudomonas aeruginosa – це грамнегативна, аеробна, паличкоподібна бактерія, яка має мукоїдні властивості. Мукоїдність – це нестабільна характеристика, яка значно підвищує вірулентність цього патогенного мікроорганізму [9, 17]. Оскільки альгірат використовується в харчовій промисловості та медицині, то не допустима можливість використання даного полісахариду, синтезованого патогенним продуцентом.

Єдиним мікробним продуцентом залишається *Azotobacter vinelandii*. Даний мікроорганізм не є патогенним і тому його можна використовувати для одержання альгірату для харчової промисловості. Альгірат *A. vinelandii* відрізняється від інших бактеріальних альгіратів тим, що додаткові залишки гулурунової кислоти можуть включатись у молекулу вже після полімеризації шляхом епімеризації манурунового залишку. Такий полісахарид має підвищені гель-формуванняльні властивості. Зменшення довжини полімеру пов'язане з активністю фермента альгінази, який виявляється в більш інтенсивно аерованих культурах [9, 10]. Тому розглянемо основні штами-продуценти альгірату серед бактерій виду *Azotobacter vinelandii* (табл. 2.1.)

					НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Малко А.				РОЗДІЛ 2. Характеристика біологічного агента	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Ключка Л.В.						1	112
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							

Особливості одержання альгінату культивуванням різних штамів

Azotobacter vinelandii

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація альгінату, г/л	Умови культивування	Використана література
<i>A. vinelandii</i> ІБ 1	меляса – 60,0; гідрофосфат калію – 0,3; гідрофосфат кальцію – 0,2; сульфат магнію – 0,3; сульфат калію – 0,2; хлорид натрію – 0,5; хлорид заліза (III) – 0,01; крейда – 5,0.	20,5	40 годин 25°C, рН 6,0	[7,8]
<i>A. vinelandii</i> ATCC 9046	сахароза – 30,0; дигідрофосфат калію – 0,16; гідрофосфат дикалію – 0,66; сульфат амонію – 0,3; сульфат кальцію дигідрат – 0,056; хлорид натрію – 0,2; сульфат магнію 7-гідрат – 0,2; молібдат натрію дигідрат – 0,0029; сульфат феруму 7-гідрат – 0,0027.	8	48 годин 25°C, рН 6,0	[18]
<i>A. vinelandii</i> ВКПМ В-5933	меляса – 60,0; гідрофосфат калію – 0,3; гідрофосфат кальцію – 0,2; сульфат магнію – 0,3; сульфат калію – 0,2; хлорид натрію – 0,5; хлорид заліза (III) – 0,01; крейда – 5,0.	10,1	40 годин 25°C, рН 6,0	[19]
<i>A. vinelandii</i> ATCC 478	сахароза – 30,0; дигідрофосфат калію – 0,16; гідрофосфат дикалію – 0,66; сульфат амонію – 0,3; сульфат кальцію дигідрат – 0,056; хлорид натрію – 0,2; сульфат магнію 7-гідрат – 0,2; молібдат натрію дигідрат – 0,0029; сульфат феруму 7-гідрат – 0,0027.	7,2	42 години 25°C, рН 6,0	[20]

Серед розглянутих штамів найбільш продуктивним виявився *A. vinelandii* ІБ 1, який протягом 40 годин здатний виділити до 20,5 г/л альгінату, що понад 2 рази більше, ніж інші розглянуті продуценти, тому для подальшої розробки технології обираємо саме його.

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

Морфолого-культуральні ознаки

Клітини *A. vinelandii* мають еліпсоподібну або кокоподібну форму, розміри 1,6-2,5x3-5 мкм (рис. 2.1). Цисти утворюються у старих культурах або після додавання бутанолу під час експоненційної фази росту [22].

A. vinelandii росте на багатьох натуральних і синтетичних середовищах, а саме: МПА, агаризованому суслі, середовищах Ешбі, Виноградського, Федорова. При рості на МПА колонії на другу добу дрібні округлі 0,3 – 1,5 мм в діаметрі, краї рівні. Колонії підняті, гладкі, маслянисто-блискучі, щільно врастають в агар, слизові, що тягнуться за петлею, безбарвні, напівпрозорі. (рис. 2.2). Під час росту на сусло – агарі колонії на другу добу дрібні, 0,5 – 1 мм в діаметрі, з зернистою поверхнею. На 4–6 добу поверхня стає гладкою. Колонії опуклі, іноді майже напівсферичні, безбарвні або жовтуваті, що просвічуються [7, 19, 22].

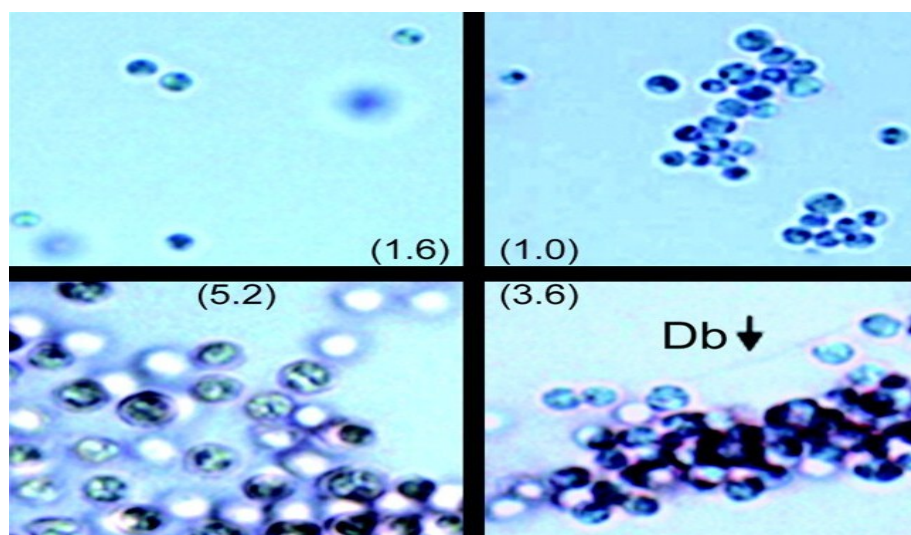


Рис. 2.1. Морфологія клітин *A. vinelandii*

Під час росту на середовищі Ешбі колонії на другу добу дуже маленькі 0,1 – 0,4 мм в діаметрі, пізніше (на 4 – 6 добу) – 0,5 – 3,0 мм, підняті, округлі, краї рівні, гладкі, маслянисто – блискучі, білуваті, напівпрозорі [20].

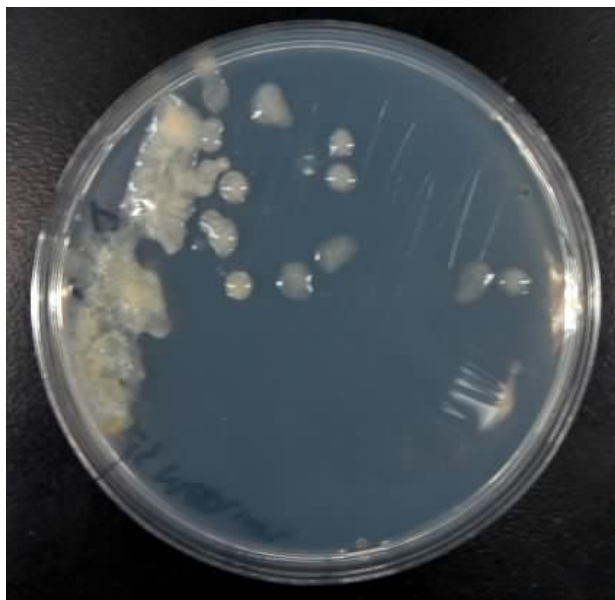


Рис. 2.2. Колонії *A. vinelandii* на середовищі Ешбі

Фізіолого-біохімічні ознаки

Температурний діапазон росту – 14-37°C, а оптимальна температура росту 25 °С, оптимум рН – 7 [4, 8]. Як джерело вуглецю можуть використовуватися: фруктоза, глюкоза, ацетат, лактат, глюконат, ацетилметилкарбінол, сахароза, трегалоза, мальтоза, рафіноза, рамноза, пропанол, бутанол, гліцерин, манітол, сорбітол, гліколят, фенол, пропіонат, бензоат, катехол, нафтален, протокатехат і толуат. Не здатен утилізувати лактозу, манозу, ксилозу, арабінозу, рибозу і фукозу [4, 8].

A. vinelandii – це азотфіксатор, який здатен засвоювати азот в аеробних або мікроаеробних умовах. Це відбувається в діапазоні рН 6–10. Як джерело азоту може використовувати сечовину, а також нітрат, відновлюючи його до нітриту, а потім до амонію. Амоній інгібує експресію генів нітрогенази, цим блокуючи азотфіксацію. Наявні пероксидаза та оксидаза [19, 22].

При рості на середовищі з іонами амонію у клітинах формуються гранули запасного полі- β -гідроксибутирату (ПГБ), і цитоплазма виглядає менш щільною. В азотфіксуючих клітинах розвивається складна система внутрішніх мембран, яка формується супутньо з синтезом нітрогенази та підвищенням інтенсивності дихання. Можна припустити, що ця система бере участь у захисті нітрогенази від кисневого пошкодження. Гранули ПГБ у таких клітинах не виникають [4, 23].

Цисти *A. vinelandii* являють собою вегетативні клітини у стані спокою і не аналогічні бактеріальним спорам. Склад зовнішньої оболонки цист: 32% вуглеводів, 28% білків, 30% ліпідів. Якісний склад жирних кислот вегетативних клітин відрізняється від цист. 70% ліпідів під час інцистування замінюються 5-*n*-алкілрезорцинолами та 6-*n*-алкілпіронами [4, 23].

При обмеженні вмісту заліза у поживному середовищі *A. vinelandii* синтезує сідерофори: жовто-зелений флюоресцентний пептид азобактин і три нефлюоресцентні катехолати – азотохелін, протохелін і амінохелін. Чутливий до дії антибіотиків стрептоміцину, тетрацикліну, пеніциліну, неоміцину та сульфаніламідів [23, 24].

2.3. Таксономічний статус біологічного агенту

У 2-му виданні Керівництва Бергі з систематики бактерій [22] за даними філогенетичного аналізу таксономічне положення *Azotobacter vinelandii* наступне:

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Proteobacteria*

Клас – *Gamma**proteobacteria*

Порядок – *Pseudomonadales*

Родина – *Pseudomonadaceae*

Рід – *Azotobacter*

Вид – *Azotobacter vinelandii*

2.4. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Джерелом вуглецю та енергії (ростовим субстратом) у поживному середовищі для біосинтезу альгінату є меляса, в якій міститься сахароза [7].

Згідно статті [2] катаболізм сахарози у *A. vinelandii* відбувається за шляхом Ентнера – Дудорова (КДФГ-шлях), про це свідчить наявність ключових ферментів цього шляху: 6-фосфоглюконатдегідратази (КФ 4.2.1.12) та 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконат-альдолази (КФ 4.1.2.14).

КДФГ-шляху у *A. vinelandii* притаманні певні особливості, які пов'язані з ферментами, що функціонують у даному метаболічному шляху.

Фермент інвертаза (К.Ф 3.2.1.26) здійснює перетворення сахарози в глюкозу. Далі глюкоза фосфорилується за участю АТФ і за допомогою гексокінази (КФ 2.7.1.1) перетворюється на глюкозо-6-фосфат.

Глюкозо-6-фосфат під дією фермента глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49) та лактонази (КФ 3.1.1.25), через проміжну сполуку глюкозо- δ -лактон-6-фосфат окиснюється до 6-фосфоглюконату.

На наступному етапі 6-фосфоглюконат за участю ферменту 6-фосфоглюконатдегідратази (КФ 4.2.1.12) перетворюється на 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконат.

Фермент – 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконат-альдолаза (КФ 4.1.2.14) перетворює 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконат на гліцеральдегід-3-фосфат, у ході цієї реакції утворюється одна молекула пірувату.

Гліцеральдегід-3-фосфат піддається дії ферменту гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) у результаті чого утворюється 1,3-дифосфогліцерат.

Перетворення 1,3-дифосфогліцерату у 3-фосфогліцерат відбувається під дією ферменту фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3).

Ферменти гліцератфосфомутаза (КФ 3.1.3.2), фосфогліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.1) та енолаза (КФ 4.2.1.11) здійснюють перетворення 3-фосфогліцерат у фосфоенолпіруват.

Заключною реакцією КДФГ-шляху є перетворення фосфоенолпірувату на піруват, що каталізується ферментом піруваткіназою (КФ 2.7.1.40). Далі піруват через ацетил-КоА за участю ферментів піруватдегідрогенази (КФ 1.2.2.2) та цитратсинтази (КФ 4.1.3.7) залучається до циклу трикарбонових кислот.

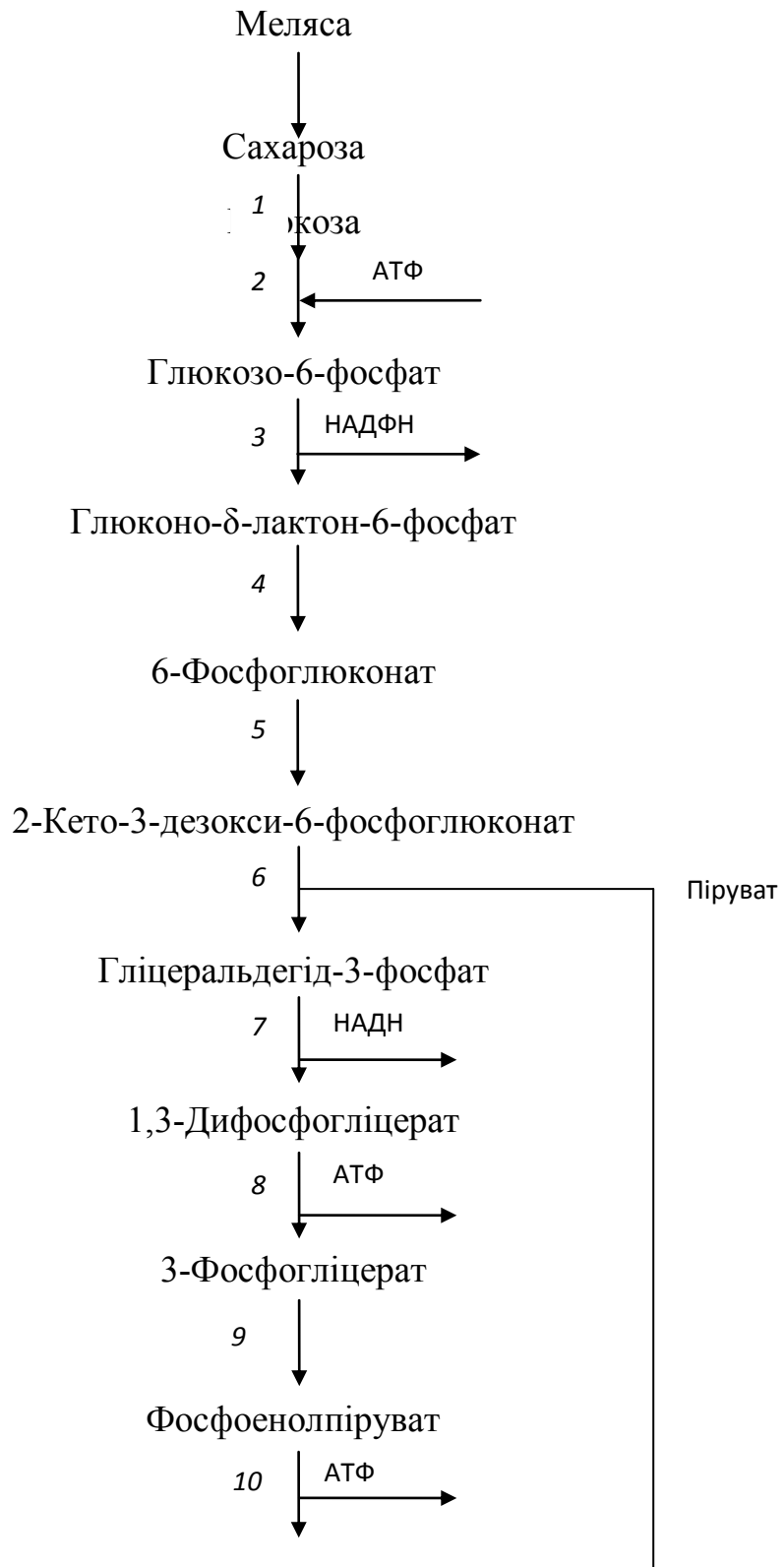


Рис.4.1. Катаболізм меляси у *A. vinelandii* ІБ 1

ферменти: 1 – інвертаза (КФ 3.2.1.26); 2 – гексокіназа (КФ 2.7.1.1); 3 – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.49); 4 – лактоназа (КФ 3.1.1.25); 5 – 6-фосфоглюконатдегідратаза (КФ 4.2.1.12); 6 – 2-кето-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюконатальдолаза

При рості *A. vinelandii* ІБ 1 на середовищі 2 (середовище Федорова) меляса (джерело вуглецю) перетворюється на піруват у КДФГ-шляху. Далі піруват під дією піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1) перетворюється на ацетил-КоА, який залучається до циклу трикарбонних кислот (ЦТК).

Попередником *A. vinelandii* ІБ 1 є ГДФ-маноза, яка утворюється з оксалоацетату, що утворюється у ЦТК.

Фермент фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.32.) здійснює перетворення оксалоацетату в фосфоенолпіруват. Фосфоенолпіруваткарбоксікіназа – це ключовий фермент глюконеогенезу. Далі проходять реакції гліколізу, але у зворотному порядку: з ФЕП утворюється фосфогліцерат за участю ферменту фосфогліцератфосфомутази (КФ 5.4.2.1). Далі фосфогліцерат фосфорилується за участю АТФ і за допомогою фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат.

На наступному етапі 1,3-дифосфогліцерат за участю ферменту гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на тріозофосфат.

Тріозофосфат піддається дії ферменту фруктозодифосфатальдолази (КФ 4.1.2.13) у результаті чого утворюється фруктозо-1,6-дифосфат.

Фруктозо-6-фосфат утворюється з фруктозо-1,6-дифосфату під дією ферменту гексозодифосфатази (КФ 3.1.3.11). Перетворення оксалоацетату на фруктозо-6-фосфат відбувається за рахунок реакції глюконеогенезу.

Фруктозо-6-фосфат перетворюється на манозо-6-фосфат за участі ферменту фосфоманнозоізомерази (КФ 5.3.1.8).

Фермент фосфоманомутаза (КФ 5.4.2.8) перетворює манозо-6-фосфат на манозо-1-фосфат.

Манозо-1-фосфат під дією фермента ГДФ-манозопірофосфорилази (КФ 2.7.7.22) перетворюється на ГДФ- манозу, з якої буде утворюватися попередник альгінату – ГДФ- мануронова кислота. Далі ГДФ-мануронова кислота піддається процесам полімеризації, ацетилювання та епімеризації у результаті чого утворюється кінцевий продукт біосинтезу – альгінат. У реакціях полімеризації бере участь такий фермент як глікозилтрансфераза (КФ 2.4.1.2.), у реакціях ацетилювання – ацетилтрансферази (КФ 2.3.).

Заключною стадією біосинтезу, у результаті якої утворюється альгінат є процес епімеризації, який характеризується ферментом С5-мануронанепімераза (КФ 5.1.3).

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування

3.1. Потреба у цільовому продукті

Альгінат – це екзополісахарид багатofункціонального призначення, який застосовується у різних галузях промисловості. Обсяги його промислового виробництва в світі оцінюються на рівні 30 тис. т на рік [2, 15].

Мікробні альгінати відрізняються від альгінатів бурих водоростей саме тим, що частина гідроксильних груп ацетильована, тобто наявні О-ацетильні групи, які зв'язані з залишками D-мануронової кислоти, проте властивості екзополісахариду альгінатного типу не змінюються. Беручи до уваги вище сказане, ми можемо замінити використання рослинного ЕПС на мікробний [11].

Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ) – на сьогодні одне з найпоширеніших захворювань гастродуоденальної зони. Всесвітньою організацією гастроентерологів ГЕРХ визнана захворюванням ХХІ століття, яким страждає від 13 до 50% населення різних країн світу [9].

За даними 2019 року в Україні було зареєстровано 224039 людей, які хворіють ГЕРХ. З кожним роком хворих стає все більше.

Проблемі лікування ГЕРХ присвячено велику кількість публікацій, оскільки факт поширення ГЕРХ є загально визнаним і не викликає сумніву.

Дана хвороба може стимулювати стенокардію, разом з тим, викликаючи спазм вінцевих артерій, може зумовлювати різкий напад рефлексорної стенокардії. Рефлюкс-езофагіт може спричинити порушення серцевого ритму: синусову брадикардію, екстрасистолію, непостійну блокаду ніжок пучка Гіса

У дітей ГЕРХ може призвести до рефлексорного ларингоспазму, розвитку апное і навіть стати причиною синдрому раптової смерті.

					НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дат</i>	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрюшів</i>
<i>Розроб.</i>		Малко А.						
<i>Перевір.</i>		Ключка Л.В.					1	2 20
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						

За даними літератури, ГЕРХ виявляється у 6–12% осіб, яким проводили ендоскопічні дослідження. За літературними повідомленнями, поширеність ГЕРХ є достатньо високою у розвинених країнах: США – 10–12%, Швеція – 17%, Великобританія – 10%, Іспанія – 10%.

Отже, враховуючи те, що досить великий відсоток населення страждає на ГЕРХ, то рентабельним є виготовлення лікарського препарату «Гавіскон», призначеного для лікування даного захворювання.

У наш час «Гавіскон» не виготовляється в Україні, а лише експортується. Виробниками даного препарату є Реккітт Бенкізер Хелскер (ЮКей) Лімітед, Денсом Лейн, Халл (Великобританія) та ФармаПас ЮКей Лімітед, Секція 22, Валлей Роад Бізнес Парк, Мерсісайд (Великобританія).

Враховуючи наведені вище дані розрахуємо кількість альгінату, яка необхідна для забезпечення потреб населення.

Таблиця 2.1

Узагальнені дані щодо розрахунку кількості альганату

Група населення	Кількість хворих	Курс лікування, Діб	Добова потреба, г	кількість альгінату (г) на 1 курс лікування для 1-го хворого	Кількість альгінату (г) На повний Курс лікування для 1-го хворого	Потреба альгінату на рік для усіх хворих, кг
дорослі	228288	4 таблетки* 4 рази на день протягом 7днів; тричі на рік	4	28	84	19176,192
діти	68224	2 таблетки* 4 рази на день протягом 7днів; тричі на рік	2	14	42	2865,408
Всього:						22041,600

Примітка: * -в 1 таблетці міститься 250 мг альгінату

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Для лікування GERX окрім препарату «Гавіскон» можна застосовувати препарати інших терапевтичних груп, а саме: антациди («Маалокс», «Ренні», «Фосфалюгель», «Альмагель», «Гастал»), H₂-гістамінові блокатори («Ранітидин», «Фамотидин»), інгібітори протонної помпи («Омепразол», «Ребепразол», «Езомепразол»). Беручи до уваги те, що для лікування даного захворювання застосовується широкий спектр лікарських препаратів, то ми можемо забезпечити лише 30 % від річних потреб в альгінаті на ринку. Для цього нам потрібно отримати: $22041,6 \text{ кг} \cdot 0,3 = 6612,48 \text{ кг}$ альгінату на рік.

Знаючи потреби в альгінаті на рік та вихід ЕПС після процесу культивування розраховуємо потужність виробництва для культивування *A. vinelandii* ІБ 1, щоб отримати 6612,48 кг альгінату: $= 537,6 \text{ м}^3$,

Штам *A. vinelandii* ІБ 1 дозволяє одержувати ЕПС альгінатного типу при культивуванні на середовищі Федорова в кількості 20,5 г/л.

Окрім цього, нам потрібно врахувати втрати, які можуть виникнути у процесі виробництва, наприклад при культивуванні, виділенні або очистці альгінату. У загальному вони можуть становити близько 30% [10, стор. 69], тому перераховуємо об'єм культуральної рідини, який нам потрібен для отримання ЕПС: $(537,6 \text{ м}^3 \cdot 0,3) + 537,6 = 698,88 \text{ м}^3$. Отже, потужність виробництва для отримання 6612,48кг альгінату становить $698,88 \text{ м}^3/\text{рік}$.

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Культивування *A. vinelandii* ІБ 1 триває протягом 40 годин. Також необхідно враховувати час на підготовку обладнання, що у даному проекті становить 8 годин, а саме: миття та огляд апарату – 1 год, перевірка на герметичність – 30 хв, підігрів апарату – 30 хв, стерилізація апарату – 1 год, охолодження апарату – 1 год 30 хв, завантаження середовища – 2 год 30 хв, засів культури – 0,5 год, звільнення ферментера від культуральної рідини 30 хв. Тому весь процес культивування з урахуванням часу на підготовку обладнання складає 2 доби.

Знаючи ці дані, можна розрахувати кількість виробничих циклів. Враховуючи те, що виробничий процес у нас триватиме 233 днів, то маємо: $233 / 2 = 116,5$ циклів, де 233 – кількість робочих календарних днів, а 2 – це кількість діб, за яку проходить виробничий процес.

Далі необхідно підрахувати об'єм культуральної рідини, який ми отримаємо за один виробничий цикл. Він становитиме: $698,88\text{ м}^3 / 116,5 = 6\text{ м}^3/\text{цикл}$.

Зважаючи на те, що світові лідери з виробництва промислових біореакторів не виготовляють ферментери об'ємом 50 м^3 і більше, оснащені мішалкою для механічного піногасіння, ферментер виготовляється на замовлення [11, стор. 24]. Замовлення такого ферментеру є досить коштовним і може бути рентабельним лише для великотонажних виробництв. Об'єм культуральної рідини, який нам потрібно отримати за один виробничий цикл складає 6 м^3 , то ми можемо поставити ферментер з загальним об'ємом 10 м^3 та коефіцієнтом заповнення 0,6.

Таким чином, пропонується проект виробництва ЕПС альгінату, який отримують у результаті культивування *A. vinelandii* ІБ 1 на середовищі, що містить мелясу, річна потреба у альгінаті на рік становить 6612,48 кг.

3.4. Розрахунок та вибір кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для вирощування продуцентів екзополісахариду альгінатного типу використовується ферментер загальним об'ємом 10 м^3 . Коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап.}} = 0,6$. Звідси випливає, що робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб.}} = V_{\text{заг.}} \times K_{\text{зап.}} = 10 \times 0,6 = 6\text{ м}^3.$$

Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу, для приготування 6 м^3 культуральної рідини. Кількість посівного матеріалу становить близько 10 % від загального об'єму поживного середовища.

Щоб приготувати 6 м^3 культуральної рідини, потрібно: $6 \times 0,1 = 0,6\text{ м}^3$ посівного матеріалу. Таку кількість посівного матеріалу можна приготувати у ферментері, об'ємом: $V_{\text{роб}} = 0,6/0,6 = 1\text{ м}^3$, такий об'єм є стандартним для ферментера.

Для приготування 600 л культуральної рідини, нам потрібно: $600 \times 0,1 = 60$ л посівного матеріалу. Цю кількість посівного матеріалу можна отримати у посівному апараті, об'ємом: $V_{\text{роб}} = 60/0,6 = 100$ л. 100 л – це є стандартний об'єм посівного апарату.

Щоб приготувати 60 л культуральної рідини, потрібно: $60 \times 0,1 = 6$ л посівного матеріалу. Таку кількість посівного матеріалу можна приготувати у інокуляторі, об'ємом: $V_{\text{роб}} = 6/0,6 = 10$ л, такий об'єм є стандартним для інокулятора.

Для приготування 6 л культуральної рідини, потрібно: $6 \times 0,1 = 0,6$ л посівного матеріалу. Таку кількість посівного матеріалу можна приготувати в інокуляторі, об'ємом : $V_{\text{роб}} = 0,6/0,6 = 1$ л, даний об'єм є стандартним.

Щоб отримати 600 мл культуральної рідини, потрібно мати: $600 \times 0,1 = 60$ мл посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна отримати при вирощуванні у колбах на качалках.

Таким чином, процес підготування посівного матеріалу проходитиме в 5 етапів, шостим етапом буде сам процес біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Стадія біосинтезу є найвідповідальнішим етапом виробництва біотехнологічної продукції. Режими культивування обумовлюють значення рН, температури, інтенсивності перемішування, аерація.

При виборі параметрів біосинтезу потрібно враховувати фізіолого-біохімічні властивості культури-продуцента. Оскільки, *A. vinelandii* ІБ 1 є аеробом, то для його росту необхідна аерація. Культивування продуцента відбувається глибинним способом на середовищі Федорова наступного складу: K_2HPO_4 – 0,3 г; $CaHPO_4$ – 0,2 г; $MgSO_4$ – 0,3 г; K_2SO_4 – 0,2 г; NaCl – 0,5 г; $FeCl_3$ – 0,01 г; $CaCO_3$ – 5,0 г; меляса – 60,0 г [7].

Культивування бактерій *A. vinelandii* ІБ 1 проводять при аерації на качалці (200 об/хв), температурі 25°C та рН 6 протягом 114 годин, з подальшим виділенням екзополісахариду при його осадженні ізопропіловим спиртом в кількості 70% по об'єму. Культивування цього мікроорганізму здійснюється періодичним методом [7].

За результатами експерименту, описаного в статті Я. О. Логінова видно, що вкрай негативно на в'язкість культуральної рідини позначалося збільшення температури культивування до 35°C (у всіх варіантах культивування при цій температурі в'язкість є нижче середнього рівня), тоді як культивування при температурі 25°C давало позитивний результат. Позитивно на в'язкість впливає збільшення вмісту меляси в середовищі, підвищення аерації та тривалості культивування щодо середнього рівня [7].

Оптимальними параметрами для культивування бактерій *A. vinelandii* ІБ 1 в качалочних колбах, що дозволяють отримувати культуральну рідину цих

					НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Малко А.					1	2
Перевір.		Ключка Л.В.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ	25	

бактерій з в'язкістю більше 30000 сСт є: вміст м'яса 60 г/л, аерація 200 об/хв, температура 25°C та тривалість культивування 114 год. До того ж м'яса повинна містити не менше 50% сахарози. Подальше збільшення вмісту м'яса в середовищі не є доцільним, оскільки не спостерігається збільшення в'язкості кінцевого продукту [7].

З точки зору економічного ефекту промислового отримання в'язкого екзополісахариду (ЕПС) негативним фактором є висока тривалість його біосинтезу, що при культивуванні в качалочних колбах пояснюється їх масообмінними характеристиками, але цього можна уникнути при культивуванні в ферментері з примусовою аерацією середовища повітря та інтенсивному перемішуванні.

З урахуванням даних, наведених в статті Я. О. Логінова, отриманих при культивуванні *A. vinelandii* ІБ 1 в колбах, здійснюється періодичне культивування протягом 40 годин в ферментері [7].

Процес культивування у ферментері відбувається при наступних параметрах: перемішування – 300 об/хв, аерація – 25–40 %, температура 25°C, рН 6, тривалість культивування становить 40 годин. Саме ці показники є оптимальними для процесу культивування, оскільки, підвищення температури до 35°C негативно впливає на в'язкість, так само як низька аерація та перемішування. Щодо тривалості процесу культивування, то зі збільшенням часу до 144 год, в'язкість альгінату зменшується до 110 сСт [7,18].

Процес культивування повинен проходити в асептичних умовах, так як розвиток сторонньої мікрофлори може пригнітити ріст продуцента.

Біосинтез ЕПС в культуральній рідині починається через 20 год культивування без збільшення його в'язкості, про що свідчить зниження в середовищі концентрації трансформуючої сахарози.

У стаціонарній фазі росту культури (28 год) відбувається збільшення в'язкості до 15000 сСт за рахунок зв'язування утвореного ЕПС з іонами Ca^{2+} . Подальше збільшення в'язкості (до 30000 сСт) може бути пов'язано з

реструктуризацією утвореного ЕПС, як, наприклад, на кінцевій стадії біосинтезу альгінових кислот, де D- мануронова кислота ферментативно епімеризується в L- гулуронову кислоту, відповідальну за властивості [7].

Культивування штаму мікроорганізму *A. vinelandii* ІБ 1, продуцента екзополісахариду альгінату, передбачає культивування глибинним способом в аеробних умовах.

Для цього ми можемо використовувати ферментери, які призначені для культивування мікроорганізмів в аеробних умовах глибинним способом, а саме ферментери, які оснащені барботером та перемішуючим пристроєм. Ці апарати призначені для аеробного культивування на рідких поживних середовищах непатогенних мікроорганізмів. Процес культивування в таких апаратах може проводитися як в періодичному, так і в безперервному режимах [27].

Культивування *A. vinelandii* ІБ 1 може відбуватися у ферментері типу АК-210 та «ОК-МФ».

Ферментер типу АК-210 складається з чотирьох основних частин:

- біохімічного приладу, що містить ферментер і допоміжні пристрої, пов'язані з ним гідравлічними, пневматичними і механічними зв'язками;
- приладів вимірювання, що включають в себе вимірювачі рН і рО₂;
- приладу регулювання, до складу якого входять електронні блоки регулювання температури рідини, швидкості обертання мішалки та регулювання рН;
- автоматичного потенціометра для реєстрації параметрів культивування мікроорганізмів.

Застосування ферментерів такого типу передбачає культивування для невеликої кількості культуральної рідини, а саме 3 – 10 л. Тому вибираємо ферментер, який дасть змогу проводити процес культивування при більших об'ємах культуральної рідини.

Ферментер «Ока МФ» – це установка, яка має набір комп'ютерних програм, що забезпечують режим періодичного культивування.

Культивування мікроорганізмів відбувається в строго асептичних умовах. Це пов'язано зі стерилізацією як основної, так і допоміжної апаратури, а також всіх компонентів, що надходять в ферментер [27].

Важливою характеристикою при виборі ферментера є наявність перемішуючого пристрою з регульованою кількістю обертів, так як під час технологічного процесу кількість обертів мішалки потрібно кожен раз збільшувати, бо збільшується в'язкість культуральної рідини. У даному ферментері пропонується використання турбінної мішалки з магнітним приводом, для забезпечення гомогенного перемішування. Характеристиками даної мішалки є: висока швидкість обертання, разом з перемішування відбувається і подрібнення (диспергування) твердих частинок.

До складу ферментера «Ока МФ» також входять:

- паростерилізуючий роз'єм для відбору проб і з'єднання ферментера із зовнішніми пристроями із збереженням асептично чистих умов;
- гермовходи для розміщення датчиків температури, рН, розчиненого кисню;
- теплообмінна сорочка;
- конденсатор пари;
- ємність, яка забезпечує накопичення та охолодження культуральної рідини.
- дозатор для введення живильного середовища в ферментер і дозатор для зливу культуральної рідини [27].

Наявність датчика регулювання розчиненого кисню є необхідним, так як клітини *A. vinelandii* ІБ 1 на початкових стадіях процесу виявляють чутливість до високих концентрацій pO_2 . Саме тому за допомогою даного датчика потрібно забезпечити подачу pO_2 оптимальної концентрації, а саме 25–40%, бо коли концентрація розчиненого кисню перевищуватиме дане значення, то спостерігатиметься пригнічення росту культури мікроорганізму, що є недопустимим [18].

Конструктивне виконання перемішуючого пристрою і системи аерації ферментера дозволяють практично повністю виключити утворення піни при аерації і перемішуванні культуральної рідини і підвищити коефіцієнт завантаження ферментера до 0,8 від обсягу, забезпечити стабільний рівень культуральної рідини в ферментері і його асептичний захист при реалізації періодичного режиму ферментації [18,27].

Отже, проаналізувавши різні види ферментерів, у даному проекті пропонується використання ферментера комбінованого типу з барботером та перемішуючим пристроєм.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Аеробним мікроорганізмам, зокрема *A. vinelandii* ІБ 1 під час виробничого процесу необхідна аерація. Враховуючи це, ми повинні під час підготовки виробництва виокремити стадію підготовки очищеного аераційного повітря, яке виступає потенційним джерелом забруднення культуральної рідини і відповідно всього виробничого процесу [28,29].

Найпростіший спосіб стерилізації повітря полягає у фізичному видаленні мікроорганізмів фільтрацією через волокнисті або мембранні фільтри. Процес підготовки очищеного аераційного повітря включає декілька стадій, а саме: забір повітря з атмосфери, попереднє очищення, стиснення повітря, стабілізацію термодинамічних показників, очищення на головних та індивідуальних фільтрах. За такого способу очищення вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999%. У результаті попереднього очищення аераційного повітря, яке відбувається на фільтрах грубого очищення, нам вдається отримати повітря з ступенем чистоти 80%. Очищення на головних фільтрах дає змогу отримати повітря з 95-99% ступенем чистоти, а на індивідуальних – 99,9999% [30].

Матеріалом для фільтрів грубої очистки повітря може бути базальтове грубе волокно, скловата, лавсан, поліпропілен, полівінілхлорид та ін. Також використовують металокерамічні фільтри з нержавіючої сталі та

титану. Саме такі фільтри є найбільш ефективними (90–95 %), оскільки мають здатність витримувати температуру до 700 °С, а швидкість фільтрування становить 0,1 м/с.

У представленому проекті запропоновано використовувати фільтри грубого очищення типу ФЯУ [30].

ФЯУ – це ячеюві повітряні фільтри, які призначені для очищення повітря від пилу в різних технологічних системах. Ступінь очищення повітря даними фільтрами становить близько 80 %.

Ці фільтри складаються з металевого каркасу, в який вставляють касети з скловолокна. Продуктивність по повітрю кожного фільтра не більше 1540 м³/год. Для збільшення продуктивності фільтрів до необхідної величини, каркаси фільтрів скручують між собою і вставляють в загальну панель.

Для індивідуального очищення повітря пропонується використовувати фільтри типу ХР4, які випускає німецька фірма «ZANDER». Такі фільтри складаються з корпусу і фільтруючого матеріалу (фторопласту), який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04–0,06 мкм.

Фільтруючі елементи фторопластових фільтрів виготовляються з фторопласту-4 (тефлону) шляхом формувань під тиском і спіканням в виробничо-заданої форми і розмірів.

Отже, характеристика та будова фторопластових фільтрів повністю задовольняє дане біотехнологічне виробництво та забезпечує стерильність аераційного повітря.

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Миючі засоби застосовуються для санітарної обробки обладнання та комунікацій, приміщень, інвентарю та ін. Вони повинні бути нешкідливими та хімічно стійкими, оскільки за допомогою них відбувається звільнення обладнання, різних поверхонь, стін, стель від забруднень різного типу, а саме: жирових, механічних та білкових [32].

Розглянемо деякі миючі засоби, що використовуються у біотехнологічному виробництві.

Каустична сода (NaOH) – біла, тверда, гігроскопічна речовина, яка добре розчиняється у воді. Розчини каустичної соди добре омилюють жири, гідролізують білки, розщеплюють вуглеводи. При зменшенні температури розчинів до (45 ± 5) °C їх мийна здатність різко падає. Розчини даної соди викликають корозію [32].

Їдкий луг належить до речовин другого класу небезпеки. Тому при роботі з лугом потрібно дотримуватися обережності. При потрапленні на шкіру, слизові оболонки і в очі утворюються серйозні хімічні опіки.

Для ручного миття технологічного обладнання рекомендується використовувати 1–2 % розчини каустичної соди температурою 45 ± 5 °C, а для циркуляційного 1–2 % розчини при температурі 55 ± 5 °C.

Термін зберігання 1 рік з дати виготовлення, у щільно закритій тарі, в недоступному для дітей та тварин місці.

Біосан – концентрований, прозорий, рідкий миючий засіб з характерним запахом. Даний миючий засіб ефективно видаляє застарілі відкладення, вапняний наліт та іржу. При правильному застосуванні не руйнує оброблювані поверхні, не містить абразивів. Видаляє неприємні запахи. «Біосан» не розкладається з виділенням шкідливих речовин та є негорючою рідиною, яка навіть при розморожуванні зберігає миючу здатність. При потрапленні на шкіру та слизові оболонки ока викликає хімічні опіки. Рекомендується використовувати 1 % розчин «Біосан» для миття обладнання та інвентарю. Даний миючий засіб належить до речовин другого класу небезпеки (по ГОСТ 12.1.007–76).

Гарантійний термін зберігання 2 роки з дати виготовлення. Миючий засіб «Біосан» зберігають у темному прохолодному місці при температурі від +10 до +20 °C, у щільно закритих ємності в місцях, недоступних для дітей. Не допускається тривале заморожування і перегрів розчину [33].

Біомой – це багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб, який являє собою порошок, світлих тонів, проте допускається присутність забарвлених включень ензимів. Добре розчиняється у воді (розчинність не менше 30 г/дм³).

Робочі розчини «**Біомою**» безбарвні, не ушкоджують оброблювані поверхні обладнання та інвентарю і володіють вираженими емульгуючими і миючими властивостями, легко видаляють білково-жирову плівку, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблених поверхнях. Даний миючий засіб не містить синтетичні поверхово-активні речовини [32].

На відміну від інших засобів, «**Біомой**» виявляє високу миючу активність при температурі не вище (40±5) °С. Його розчини не ушкоджують об'єкти з нержавіючої сталі, чорного металу з антикорозійним покриттям, алюмінію, скла, гуми, полімерних матеріалів, кахлю, емалі.

Рекомендується використовувати 0,5 % розчин «**Біомою**» температурою (40±5) °С для ручного миття технологічного устаткування, скляної і полімерної тари та інвентарю, а також (0,15–0,3) % розчини температурою (40±5) °С для циркуляційного миття технологічного обладнання і комунікацій та миття скляної і полімерної тари [32, 34].

«**Біомой**» належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки по ГОСТ 12.1.007–76) при попаданні в шлунок і на шкіру, не проявляють кумулятивних, шкіроподразнюючих і сенсебілізуєчих властивостей. У концентраціях рекомендованих до застосування (0,15–0,5 %.), не подразнює слизову оболонку очей.

Завдяки вдало збалансованій рецептурі, яка включає ряд миючих компонентів та ферментів з високою протеолітичною активністю «**Біомой**» має виражені властивості по очищенню поверхонь, які обробляються, від жирів та білків.

Термін придатності 1 рік з дати виготовлення [34].

Супераль К – це концентрований кислотно-миючий засіб, який призначений для видалення органічних і неорганічних (іржа, вапняний наліт,

молочний камінь, сольові відкладення) забруднень з ємностей, обладнання, підлог, стін, виробничих приміщень на підприємствах харчової промисловості [35].

До складу даного миючого засобу входять: ПАР, суміш органічних та неорганічних кислот, інгібітор корозії, комплексоутворювачі.

Даний засіб не викликає пошкодження гуми, алюмінію і поверхонь, але за умови дотримання рекомендованого дозування, часу обробки і температурного режиму.

Для миття обладнання готують 0,5% робочий розчин «Супераль К» [35].

Для його виробництва використовуються поверхнево-активні речовини, які посилюють мийні властивості препаратів, комплексоутворювачі, пом'якшувачі води, що зв'язують солі твердості у водорозчинні сполуки, інгібітори корозії, які захищають обладнання від передчасного «зношування», а також спеціальні функціональні домішки, завдяки яким деякі засоби можна використовувати при митті водою низьких температур. Даний миючий розчин за ступенем токсичності належить до 2 класу мало небезпечних по ГОСТ 12.1.007–76.

Термін зберігання миючого засобу «Супераль К» 12 місяців при температурі від -10 до $+30^{\circ}\text{C}$ [35].

Дезактін – дезінфекційний засіб з миючим ефектом. «Дезактін» являє собою порошок від білого кольору із слабким запахом хлору. Розчинність у воді становить не менше 20 мг/дм³. Дезактін має широкий спектр антимікробної активності: бактерицидні (в т.ч. туберкулоцидні), віруліцидні (включаючи парентеріальні вірусні гепатити, ВІЛ-інфекцію, рота-, паповавіруси), фунгіцидні (в т.ч. гриби роду *Candida*) властивості.

Склад засобу, %: дихлорантин – 21,0–23,0; 5,5-діметілгідантоїн – 12,4–16,4; диспергатор – 9,0–12,0; аніонні поверхнево-активні речовини – 3,2–5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0. Вміст активного хлору становить не менше 14,0 %.

Засіб належить до речовин 3 класу небезпек по ГОСТ 12.1.007–76. Не виявляє кумулятивних, шкірно-подразнюючих, сенсibilізуючих властивостей. Для дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері) рекомендується використовувати робочий розчин з концентрацією 0,2 %.

Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виготовлення [36].

«Ніка-екстра М Профі» – це прозорий миючо-дезінфікуючий засіб, який володіє антимікробною активністю відносно грамнегативних і грампозитивних (включаючи мікобактерії туберкульозу) мікроорганізмів, вірусів (щодо всіх відомих вірусів-патогенів людини, в тому числі вірусів ентеральних і парентеральних гепатитів (в т. ч. гепатиту, А, В і С), ВІЛ, поліомієліту, аденовірусів, вірусів «атипової пневмонії» (SARS), «пташиного» грипу H5N1, «свинячого» грипу, грипу людини, герпесу та ін.), анаеробної інфекції.

Склад даного засобу: N, N-біс (3-амінопропіл) додеціламін 0,7 %, дідецилдиметиламоній хлорид 2,7 %, полігексаметиленгуанідин гідрохлорид 0,7 % [37].

Даний засіб володіє хорошими миючо-дезінфікуючими властивостями, не псує оброблювані об'єкти, не фіксує органічні забруднення, не викликає корозії металів. Засіб зберігає свої властивості після замерзання і подальшого відтавання. Робочі розчини негорючі, пожежо- і вибухобезпечні. За параметрами гострої токсичності по ГОСТ 12.1.007–76 належить до 4 класу мало небезпечних речовин при введенні в шлунок, до 4 класу малонебезпечних речовин при нанесенні на шкіру.

«Ніка-екстра М Профі» має слабку подразнюючу дію при контакті зі шкірою і помірно подразнюючу дію на слизові оболонки ока, не володіє шкіро-резорбтивною і сенсibilізуючою активностями. Концентрація робочого розчину для дезінфекції приміщення становить 0,5 %.

Термін зберігання 3 роки, робочих розчинів – 28 діб за умови їх зберігання у закритих ємностях [37].

Клорсепт 25 – це миючо-дезінфікуючий засіб, що має бактерицидну (у тому числі туберкулоцидну), віруліцидну (у тому числі відносно вірусів гепатиту В і ВІЛ) і фунгіцидну (кандидози та дерматомікози) дії.

За параметрами гострої токсичності «Клорсепт 25» відноситься до 3 класу помірно-небезпечних речовин (ГОСТ 12.1.007–76) при введенні в шлунок, має слабку місцево-подразнюючу дію на шкіру та слизові оболонки очей. При використанні робочих розчинів, що містять 0,1 % і більш активного хлору, викликає подразнення органів дихання [38].

Для дезінфекції використовують 0,015–1,5% за активним хлором розчини. Для приготування 0,015% розчину 1 таблетку «Клорсепт 25» розчиняють у 10 л води.

Термін придатності «Клорсепт 25» – 3 роки, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 20 °С [38].

Отже, проаналізувавши дані можна зробити висновок, що для миття обладнання, інвентарю, комунікацій, тари доцільно використовувати миючий засіб «Біомой», так як він є найдешевшим миючим засобом, а для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей – «Дезактін» та «Ніка-екстра М Профі», так як вони є миючо-дезінфікуючими засобами, то це дозволить значно заощадити кошти. Дані засоби використовують з інтервалом в 3 місяці, що дозволяє запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів [32].

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Культивування азотфіксуючих бактерій *A. vinelandii* ІБ 1 відбувається на середовищі Федорова наступного складу: K_2HPO_4 – 0,3 г; $CaHPO_4$ – 0,2 г; $MgSO_4$ – 0,3 г; K_2SO_4 – 0,2 г; $NaCl$ – 0,5 г; $FeCl_3$ – 0,01 г; $CaCO_3$ – 5,0 г; меляса – 60,0 г [7]. Для того, щоб уникнути контамінації проводять стерилізацію поживного середовища. Характер проведення цього процесу залежить від фізичних властивостей компонентів поживного середовища, а

саме температури розкладання. Відомо, що основні солі стерилізують окремо від фосфорних. Це пояснюється тим, що при високих температурах стерилізації фосфорні солі починають взаємодіяти із солями Mg^{2+} та Ca^{2+} в результаті чого утворюється осад [39]. Важливо зазначити, що окремо від солей стерилізується меляса, оскільки вона є термолабільною речовиною (температура стерилізації 112 °С).

Розглянемо способи стерилізації поживного середовища на різних стадіях процесу.

Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в колбах на качалках та інокуляторі об'ємом 10 л

Для приготування посівного матеріалу в колбах потрібно 600 мл поживного середовища, а для інокулятора 1 – 6,3 л, тому стерилізацію компонентів можна здійснити в автоклаві, аби зменшити затрати на процес та скоротити час стерилізації.

Стерилізація компонентів для приготування посівного матеріалу в колбах на качалках та інокуляторі 1 буде проходити в автоклаві при таких параметрах:

Композиція А. Розчин меляси – температура 112⁰С, час 30 хв;

Композиція Б. $CaCO_3$ – температура 131⁰С, час 30 хв;

Композиція В. $K_2HPO_4 + CaHPO_4$ – температура 131⁰С, час 30 хв;

Композиція Г. $MgSO_4 + K_2SO_4 + NaCl$ – температура 130⁰С, час 1 година.

Примітка: $FeCl_3$ – запасний розчин (1г $FeCl_3$ у 100мл H_2O і для отримання посівного матеріалу у 10л ферментері)

Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту в інокуляторі об'ємом 10 л

Композиція А. Розчин меляси – температура 112⁰С, час 30 хв;

Композиція Б. $CaCO_3$ – температура 131⁰С, час 30 хв;

Композиція В + Композиція Г об'єднуються і готуються у збірнику, перекачують їх у інокулятор 10 л, де відбувається їх стерилізація. Для

сумісної стерилізації цих солей готують в колбі на 50 мл 12 мл нестерильного 6% розчин HCL (з розрахунку 2 мл на 1 л поживного середовища) і 12 мл стерильного 6% NaOH (готують в колбі на 50мл,стерилізується при температура 130⁰C).

Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту інокуляторі об'ємом 100 л

Композиція А. Розчин меляси – готується в збірнику на 50 л і стерилізується при температурі 112⁰C, час 30 хв;

Композиція Б. CaCO₃– готується в збірнику на 5 л і стерилізується при температурі 131⁰C, час 30 хв;

Композиція В + Композиція Г об'єднуються і готуються у збірнику об'ємом 50 л, перекачують їх у інокулятор об'ємом 50 л, де відбувається їх стерилізація. Для сумісної стерилізації цих солей готують в колбі на 500 мл 120 мл нестерильного 6% розчин HCL (з розрахунку 2 мл на 1 л поживного середовища) і 120 мл стерильного 6% NaOH (готують в колбі на 500 мл,стерилізується при температура 130⁰C).

Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання інокуляту інокуляторі об'ємом 1 м³

Композиція А. Розчин меляси – готується в збірнику на 500 л і стерилізується при температурі 112⁰C, час 30 хв;

Композиція Б. CaCO₃– готується в збірнику на 50 л і стерилізується при температурі 131⁰C, час 30 хв;

Композиція В + Композиція Г об'єднуються і готуються у збірнику об'ємом 500 л, перекачують їх у інокулятор об'ємом 1000 л, де відбувається їх стерилізація. Для сумісної стерилізації цих солей готують в колбі на 2000 мл 1200 мл нестерильного 6% розчин HCL (з розрахунку 2 мл на 1 л поживного середовища) і 1200 мл стерильного 6% NaOH (готують в колбі на 2000 мл,стерилізується при температура 130⁰C).

Враховуючи те, що об'єми середовищ для ферментера 10 м^3 , посівного перевищують 5 м^3 , і становить 6 м^3 , то стерилізацію можна провести використавши установку безперервної стерилізації (УБС–10).

УБС дозволяє суттєво знизити витрати пари на нагрівання нестерильного середовища до температури стерилізації та витрати води на охолодження стерильного поживного середовища. Дана установка дає можливість стерилізувати основні та фосфорні солі разом. На відміну від періодичної стерилізації, УБС має ряд переваг, а саме:

- даний об'єм середовища перебуває під дією високої температури короткий час;
- деструкція компонентів поживного середовища мінімальна – це пояснюється тим, що процес стерилізації відбувається за короткий проміжок часу;
- можлива часткова регенерація тепла;
- легкий контроль керування процесом та ін. [39].

Оскільки потрібно простерилізувати 6 м^3 поживного середовища, то доцільним буде обрання лінії УБС–10. Виходячи з об'єму середовища, об'єм збірника в якому відбуватиметься розчинення та підігрів компонентів, становитиме 10 м^3 .

Обґрунтування вибору піногасника

Вибір піногасника відіграє важливу роль при глибинному культивуванні аеробних мікроорганізмів. Оскільки при утворенні піни під час культивування збільшується міжфазна контактна поверхня між поживним середовищем та повітрям. Піноутворення залежить від багатьох факторів: складу поживного середовища (джерела вуглецю), режиму стерилізації, аерації середовища тощо. Тому, щоб уникнути цього процесу застосовують піногасники. Вони можуть бути механічними або хімічними [39].

Серед хімічних піногасників найчастіше використовують олеїнову кислоту, адеканоль, щодо природних, то широкого застосування набули –

соняшникова, соєва та кукурудзяна олії. Природні піногасники поступово замінюються на хімічні, оскільки перші мають велику харчову цінність, тому перспективним є їх використання у харчовій промисловості. Силіконові піногасники більш ширше застосовуються у харчовій, біотехнологічній та інших галузях промисловості, ніж органічні аналоги, оскільки діють швидше та довше. Також вони відрізняються економічністю (витрата від 0,00001 до 1% вологи) – їх поверхневий натяг дуже малий і вони швидко розтікаються по середовищі. Недолік хімічних піногасників полягає в тому, що вони додатково забруднюють технологічний потік і продукт. Однак часто вони є інертними і застосовуються в таких малих кількостях, що їх використовувати можна майже завжди, навіть якщо до чистоти продукту пред'являються високі вимоги.

Для того, щоб обрати піногасник для культивування *A. vinelandii* ІБ 1, з метою отримання екзополісахариду ми повинні порівняти вартість запропонованих піногасників та розрахувати їх вартість для процесу біосинтезу (для біосинтезу альгінату потрібно 26,7 л природного піногасника, це у розрахунку 4 мл піногасника на 1 л поживного середовища, та 3,35 л силіконового піногасника «Адеканоль» з робочою концентрацією розчину – 0,001 %, у розрахунку 0,5 мл піногасника на 1 л поживного середовища) [40].

РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯУ, Фільтруючий матеріал – мати зі скловолокна, Е = 80 %, продуктивність – 1530 м ³ /год
К-3	Компресор	2	Гвинтові компресори з орбітальною спіраллю Atlas Copco GX 11 7,5, максимальний тиск 7,5 бар, продуктивність 1,62 м ³ /хв.
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol», (Німеччина) продуктивність 63 м ³ /год
Р-6	Ресивер	1	Ресивер "VSOP-CLUB" фірми «Parasol» (Німеччина), робочий тиск 10 бар
Т-7	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач з спуском конденсату "Sulzer", продуктивність 60 м ³ /год
Ф-8	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтруючий матеріал – фторопласт, Е = 99,996 %, швидкість фільтрування 0,01 м/с
РЕ-9	Реактор для миючого засобу	1	Реактор. Циліндричний апарат без сорочки нагріву, з нижнім спуском. Геометричний об'єм 10 м ³ . Потужність приводу 1,5-55 кВт, частота обертання 8-500 хв ⁻¹ , геометричний об'єм 10 м ³ . Внутрішній діаметр апарата 1800 мм. Матеріал виробу: сталь 12х18Н10Т.
Н-10	Насос	1	Відцентровий, тип KRSН 32/160 Продуктивність 3 м ³ /год, потужність двигуна 2,5 кВт

НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Малко А.								1
Перевір.		Ключка Л.В.			Кафедра БТМ					
Реценз.					40					
Н. Контр.										
Затверд.		Пирог Т.П.								

ЗБ-11	Збірник для приготування розчину солей	1	Відкрита циліндрична, металева ємність призначена для приготування розчину солей. Закупний виріб. ГОСТ 5037-78., робочий об'єм – 7 л, завантаження і вивантаження вручну, габаритні розміри: діаметр 200 мм, висота 200 мм.
Ф-12	Фільтри індивідуальної очистки	1	фільтри типу ХР4 фірми «ZANDER», фільтр складаються з корпусу і фільтруючого матеріалу (фторопласту), який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04–0,06 мкм.
І-13	Інокулятор 1	1	Інокулятор BioFlo/CelliGen100 фірми «Eppendorf» (Німеччина), потужність приводу 0,25-0,75 кВт, частота обертання 25-1500 хв-1, геометричний об'єм 10 л. Містить трубу перетискування та барботер. Внутрішній діаметр апарата 250 мм. Матеріал виробу: сталь 12x18Н10Т.
ЗБ-14	Збірник для приготування і стерилізації розчину меляси	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву та нижнім спуском. Геометричний об'єм 50 л. Матеріал виробу: сталь 12x18Н10Т. Габаритні розміри: довжина 1400 мм, ширина 865,5 мм, висота 1100 мм.
ЗБ-15	Збірник для приготування і стерилізації суспензії карбонату кальцію	1	Відкрита циліндрична, металева ємність призначена для приготування суспензії карбонату кальцію.. Закупний виріб. ГОСТ 5037-78. Максимальний об'єм 5 л, робочий об'єм – 3 л, завантаження і вивантаження вручну, габаритні розміри: діаметр 150 мм, висота 150 мм.
ЗБ-16	Збірник для приготування розчину солей	1	Відкрита циліндрична, металева ємність призначена для приготування розчину солей. Закупний виріб. ГОСТ 5037-78., робочий об'єм – 50 л, завантаження і вивантаження вручну, габаритні розміри: діаметр 200 мм, висота 200 мм.

Ф-17	Фільтри індивідуальної очистки	1	фільтри типу XP4 фірми «ZANDER», фільтр складаються з корпусу і фільтруючого матеріалу (фторопласту), який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04–0,06 мкм.
Ін-18	Інокулятор 2	1	Інокулятор BioFlo/CelliGen 500 фірми «Eppendorf» (Німеччина), потужність приводу 0,75-3,0 кВт, частота обертання 20-1500 хв ⁻¹ , геометричний об'єм 100 л. Містить трубу перетискування та барботер. Внутрішній діаметр апарата 500 мм. Матеріал виробу: сталь 12х18Н10Т.
ЗБ-19	Збірник для приготування і стерилізації розчину меляси	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву та нижнім спуском. Геометричний об'єм 500 л. Матеріал виробу: сталь 12х18Н10Т. Габаритні розміри: довжина 1400 мм, ширина 865,5 мм, висота 1100 мм.
Н-20	Насос перстальтичний	1	Насос перистальтичний, продуктивністю 50 л/хв
ЗБ-21	Збірник для приготування і стерилізації суспензії карбонату кальцію	1	Відкрита циліндрична, металева ємність призначена для приготування суспензії карбонату кальцію.. Закупний виріб. ГОСТ 5037-78. Максимальний об'єм 10 л, робочий об'єм – 6 л, завантаження і вивантаження вручну, габаритні розміри: діаметр 250 мм, висота 300 мм.
ЗБ-22	Збірник для приготування розчину солей	1	Відкрита циліндрична, металева ємність призначена для приготування розчину солей. Закупний виріб. ГОСТ 5037-78., робочий об'єм – 150 л, завантаження і вивантаження вручну, габаритні розміри: діаметр 200 мм, висота 200 мм.
Н-23	Насос	1	Відцентровий, тип KRSH 32/160 Продуктивність 3 м ³ /год, потужність двигуна 2,5 кВт
Ф-24	Фільтри індивідуальної очистки	1	фільтри типу XP4 фірми «ZANDER», фільтр складаються з корпусу і фільтруючого матеріалу (фторопласту), який дає змогу уловлювати частинки розміром 0,04–0,06 мкм.

ПА-25	Посівний апарат	1	Посівний апарат, «BiOENGINEERING» (Росія), потужність приводу 1,5-55 кВт, частота обертання 8-500 хв ⁻¹ , геометричний об'єм 1 м ³ . Містить трубу перетискування та барботер. Внутрішній діаметр апарата 1000 мм. Матеріал виробу: сталь 12x18H10T.
PE-26	Реактор для соляної кислоти	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву та нижнім спуском. Геометричний об'єм 2 л. Матеріал виробу: сталь 12x18H10T.
PE-27	Реактор для гідроксиду натрію	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву та нижнім спуском. Геометричний об'єм 2 л. Матеріал виробу: сталь 12x18H10T. Потужність приводу 1,5-55 кВт, частота обертання 8-500 хв ⁻¹ , внутрішній діаметр апарата 80 мм.
PE-28	Реактор для піногасника	1	Реактор. Циліндричний апарат з сорочкою нагріву і днищем, з нижнім спуском. Робочий об'єм 5 л. Потужність приводу 0,25 кВт, частота обертання 25-100 хв ⁻¹ , внутрішній діаметр апарата 150 мм. Матеріал виробу: сталь 12x18H10T.
ГФ-29 PE-30 Н-31 К-32 КЛ-33 ТВ-34 Т-35	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації складається з: реактора для змішування і підігріву компонентів, відцентрового насоса, компресора, колонки швидкісного нагріву, теплообмінника – витримувала, пластинчастого теплообмінника. Температура стерилізації 140°C, час стерилізації 40 хв, час витримання при температурі стерилізації 6 хв.
P-48	Ферментер	1	Ферментер типу «Ока МФ». Даний ферментер забезпечений турбінною мішалкою з магнітним приводом, яка забезпечує гомогенне перемішування, потужність приводу 1,5-55 кВт, частота обертання 8-500 хв ⁻¹ , геометричний об'єм 10 м ³ . Містить трубу перетискування та барботер. Внутрішній діаметр апарата 1800 мм. Матеріал виробу: сталь 12x18H10T.

РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми

Технологічна схема біосинтезу на біотехнологічному виробництві включає допоміжні роботи (підготовку персоналу, миючих та дезінфікуючих розчинів для обладнання, обладнання та комунікацій, стерильного аераційного повітря та приготування і стерилізацію поживного середовища) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез *A. vinelandii* ІБ 1 та стадії виділення та очищення полісахариду альгінатного типу).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.1.1. Приготування 0,3% розчину «Біомой»

Для миття обладнання необхідно приготувати 5,750 м³ 0,3% розчину «Біомой». Робимо розрахунок для приготування 5,750 м³ робочого розчину, знаючи, що для приготування 1 л 0,3% розчину у 1 л води розчиняють 3 мл концентрованого розчину.

Отже, для приготування 5,750 м³ розчину, нам потрібно:

3 мл (розчину) – 1 л (води)

x мл (розчину) – 5750 л (води)

x = 17,25 л (розчину)

Для приготування 5,750 м³ 0,3% робочого розчину «Біомой» у реактор–змішувач (РЕ – 9) об'ємом 10 м³ через об'ємно-рідинний дозатор відміряють 17,25 л миючого засобу та додають воду до загального об'єму 5,750 м³. Розчин перемішують. Температура при якій здійснюється приготування розчину становить 30°C. Після цього готовий робочий розчин розподіляють між обладнанням (ферментер, інокулятори, збірники).

Включають мішалки, за рахунок яких відбувається циркуляційне миття обладнання.

					НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Розроб.</i>		Малко А.					1	2
<i>Перевір.</i>		Ключка Л.В.						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.					Кафедра БТМ 44	

ДР 1.1.2 Приготування робочого розчину «Дезактін»

Оскільки підлогу на виробництві миють кожного дня, то для одного такого миття необхідно приготувати 67,8 л робочого розчину Дезактіну. Для цього на технічних вагах зважують 135,6 г концентрату Дезактіну.

Наважку поміщають в емальовану ємність об'ємом 70 л і додають 67,66 л питної води, при постійному перемішуванні.

Для запобігання резистентності мікроорганізмів до даного засобу, його необхідно змінювати кожні 3 місяці.

ДР 1.1.3 Приготування робочого розчину «Ніка-екстра М Профі»

На 1 день необхідно приготувати 67,8 л 0,5% робочого розчину «Ніка-екстра М Профі».

Для цього у емальовану ємність об'ємом 70 л поміщаємо 339 мл концентрату «Ніка-екстра М Профі», попередньо зваженого на технічних вагах і додаємо 67,46 л питної води, при постійному перемішуванні.

Д.Р.1.2. Санітарна підготовка виробничих приміщень.

Д.Р. 1.2.1. Щоденне прибирання. Щодня проводять прибирання 0,2 % розчином Дезактіну від Д.Р. 1.1.2 з розрахунку 100 мл розчину на 1 м². Відпрацьований дезрозчин подають на знешкодження.

Д.Р. 1.2.2. Генеральне прибирання. Генеральне прибирання проводять 1 раз на місяць, або за вимогою мікробіолога по мірі забруднення виробничих приміщень. Концентрація Дезактіну 0,2 % від Д.Р. 1.1.2 та час експозиції 60 хв. Відпрацьований деззасіб подають на знешкодження.

Д.Р.1.3. Санітарна підготовка персоналу.

Д.Р.1.3.1. Навчання персоналу. Персонал повинен проходити інструктажі при прийомі на роботу, поточний інструктаж, які необхідно дотримуватись на виробництві. Технологічний інструктаж проходить не рідше одного разу на місяць та ведеться облік у журналі. Також проводиться перевірка знань персоналу.

Д.Р.1.3.2. Перевірка санітарного стану персоналу. Всі особи, зайняті у виробництві, повинні пройти попередній медичний огляд та бактеріологічне обстеження відповідно до "Інструкції з проведення обов'язкових профілактичних і медичних обстежень осіб, які поступають на роботу". Наступні обстеження здійснюються не рідше 1 разу на рік. В процесі виробництва руки персоналу обробляється деззасобом Стериліум-гель за необхідністю. Верхній одяг персонал знімає в гардеробі, там же одягає технологічний одяг та миє руки.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікацій

Миття обладнання здійснюється циркуляційним способом з використанням 0,3 %-го робочого розчину «Біомой» від ДР 1.1.1, який поступає безпосередньо у ферментер, посівний апарат, інокулятори та збірники. Потім обладнання промивають питною водою.

З'ємні частини обладнання знімаються та ретельно обробляються 0,3 % розчином «Біомой» від ДР 1.1.1 при температурі 45 °С. Відпрацьований розчин передають на стадію знешкодження відходів. Працівниками проводиться ретельний огляд з'ємних частин: повинні бути відсутні вигини, вм'ятини та інші пошкодження.

ДР 1.4.2. Перевірка на герметичність

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних, перевірочних робіт та миття. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,07 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (за манометром) не знижується, обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,07 МПа.

Герметичність парових вентилів перевіряють на дотик. Обов'язково раз на тиждень на герметичність перевіряють посівну лінію з усуненням усіх можливих пропусків. Під паровим тиском перевіряють всі матеріальні,

посівні і конденсатні вентиля та трубопроводи.

ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання та комунікацій

Після перевірки обладнання та комунікацій на герметичність через барботер подають гостру пару. Перед подачею пари закривають вентиля зливу, подачі розчинів для титрування та патрубок відведення відпрацьованого повітря. Вентиль скидання тиску залишають відкритим. Після заповнення ферментера парою вентиль закривають. Обладнання стерилізують протягом 1 години, при температурі – 125–130°C та тиску 0,2 МПа.

Після закінчення стерилізації припиняють подачу гострої пари, поступово знижують тиск в апараті шляхом відкриття патрубка відпрацьованого повітря. Температуру в ферментері знижують до 40–50°C шляхом подачі холодної води в сорочку апарату.

ДР 2. Підготовка очищеного аераційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери

Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через повітрозбірник (ПЗ-1) на висоті 3 м, від даху будівлі.

ДР 2.2. Попереднє очищення повітря

Попередня очистка повітря здійснюється на фільтрах грубої очистки (Ф-2). У якості фільтрувального матеріалу використовують мати зі скловолокна. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор (К-3). Ступінь очищення становить $E = 80\%$.

ДР 2.3. Стискання повітря

При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується до 250°C. Тиск повітря за компресором визначають з розрахунку тиску на подолання опору в системі підготовки повітря, тиску стовпа рідини у ферментері і створення в ньому тиску 0,13–0,14 МПа.

Після компресора повітря має наступні характеристики: $P = 0,35-0,5$ МПа, $W = 60 \%$.

ДР 2.4. Охолодження повітря в теплообміннику

Перед подачею повітря, на фільтр головного очищення, його охолоджують до температури 15–25°C в теплообмінному апараті (Т-4), подачею холодної води. У конденсато-уловлювачі (КВ-5) випадає конденсат.

ДР 2.5. Видалення вологи

Далі повітря надходить у ресивер (РЕ-6), в якому остаточно видаляється надмірна волога та стабілізується потік повітря (зниження рівня пульсацій). У результаті вологість повітря повинна становити близько 40%.

ДР 2.4. Нагрівання повітря в теплообміннику

Після ресивера повітря подається на теплообмінник (Т-7), в якому нагрівається до температури 27°C подачею гарячої води. Потім стабілізоване повітря надходить на головний фільтр (Ф-8).

ДР 2.5. Очищення повітря на головних фільтрах

Далі очищення повітря здійснюється в головному фільтрі (Ф-8), фільтруючий матеріал якого складається з ультратонкого базальтового волокна. Ступінь очищення повітря становить 99,5%.

ДР 2.6. Очищення повітря на індивідуальних фільтрах

Заключна стадія очищення повітря від контамінантів здійснюється в індивідуальних фільтрах (Ф-39, Ф-41, Ф-43, Ф-45) типу ХР4.

Як фільтруючий матеріал використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Ступінь очищення становить $E = 99,9999\%$.

ДР 3. Приготування допоміжних розчинів

ДР 3.1. Приготування та стерилізація розчину сульфату феруму

На технічних терезах зважують 1г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважку переносять у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води (щоб отримати розчин з концентрацією солі 0,01 г/мл), перемішують, закривають колбу марлевым корком і стерилізують в автоклаві за температури 131 °С (50 хв).

ДР 3.2. Приготування розчину 6%-ї соляної кислоти

Рочин соляної кислоти готується для того, щоб запобігти випаданню фосфорних солей в осад, при їх сумісній стерилізації із солями Ca^{2+} і Mg^{2+} , процес здійснюють при рН 4, для чого використовується 6% розчин HCl . Даний розчин соляної кислоти також готується розведенням з більш концентрованого 35% розчину до встановлення необхідної концентрації

ДР 3.2.1 Приготування розчину 6%-ї соляної кислоти для інокулятора об'ємом 10 л

На даному етапі необхідно приготувати 12 мл 6% соляної кислоти. Для цього у колбу об'ємом 50 відміряють 9,6 мл води, обережно невеликими порціями доливають 2,4 мл 35% соляної кислоти. Розчин ретельно перемішують.

ДР 3.2.2 Приготування розчину 6%-ї соляної кислоти для інокулятора об'ємом 100 л

На даному етапі необхідно приготувати 120 мл 6% соляної кислоти. Для цього у колбу об'ємом 50 відміряють 96 мл води, обережно невеликими порціями доливають 24 мл 35% соляної кислоти. Розчин ретельно перемішують.

ДР 3.2.3 Приготування розчину 6%-ї соляної кислоти для інокулятора об'ємом 1 м³

На даному етапі необхідно приготувати 1200 мл 6% соляної кислоти. Для цього у збіник об'ємом 2 л відміряють 960 мл води, обережно невеликими порціями 240 мл 35% соляної кислоти.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для титрування поживного середовища після стерилізації.

Для нейтралізації сульфатної кислоти та стабілізації рН готують 6% розчин гідроксиду натрію.

ДР 3.3.1. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для інокулятора об'ємом 10 л.

На технічних вагах зважують 2,7 г кристалічного NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 50 мл, мірним циліндром добавляють 9,3 мл

дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 3.3.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для інокулятора об'ємом 100 л.

На технічних вагах зважують 7,3 г кристалічного NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 250 мл, мірним циліндром додають 113 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 2.2.2. Приготування та стерилізація 6%-го розчину NaOH для інокулятора об'ємом 1 м³.

На технічних вагах зважують 64,8 г кристалічного NaOH. Наважку переносять в колбу об'ємом 2 л, мірним циліндром додають 1015 мл дистильованої води і перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131°C упродовж 40 хв.

ДР 3.4. Приготування та стерилізація піногасника

У реактор (Р-28) місткістю 5 л наливають 3,35 л піногасника «Адеканоль», герметично закривають та стерилізують парою при температурі 121°C і тиску 0,11 МПа на протязі 30 хвилин.

ДР 4. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в колбах на качалках 1

Для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках потрібно приготувати 0,6 л культуральної рідини

Таблиця 4.1.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 мл поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Меляса	40	24	А	100
CaCO ₃	5	3	Б	200
KH ₂ PO ₄	0,3	0,18	В	100
CaHPO ₄	0,2	0,12		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	0,18	Г	200
K ₂ SO ₄	0,2	0,12		
NaCl	0,5	0,3		

ДР 4.1. 1. Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування розчину меляси на електронних вагах у мірному стаканчику об'ємом 500 мл зважують 24 г меляси та додають питну воду об'ємом 65 мл. Розчин перемішують та переносять в колбу об'ємом 250 мл. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112⁰С протягом 30 хв.

ДР 4.1. 2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на електронних вагах 3 г карбонату кальцію, наважку переносять в металевий стакан об'ємом 1 л та подрібнюють до утворення однорідної маси. Подрібнений матеріал переносять в колбу об'ємом 500 мл та додають питну воду (температура 50⁰С) об'ємом 200 мл та інтенсивно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131⁰С протягом 30 хв.

ДР 4.1. 3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину фосфорнокислих солей зважують на електронних вагах 0,18 г двозаміщеного фосфату калію та 0,12 г гідрофосфату кальцію. Переносять наважки солей у колбу об'ємом 250 мл. В колбу додають питну воду об'ємом 100 мл. Розчин перемішують. Колбу закривають ватною-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 130⁰С протягом 1 години.

ДР 4.1. 4. Приготування та стерилізація композиції Г

Для приготування розчину солей зважують на електронних вагах 0,18 г сульфату магнію, 0,12 г сульфату калію, 0,3 г хлориду натрію. Переносять наважки солей у мірну колбу об'ємом 1000 л та додають питну воду об'ємом 200 мл. Розчин перемішують. Колбу закривають ватною-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 131⁰С протягом 30 хв.

ДР 4.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 10 л

Враховуючи об'єм конденсату (10%) та кількість посівного матеріалу (10 %) необхідна кількість води для розчинення складе 4.8 л

Таблиця 4.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
М'яса	40	240	А	1000
CaCO ₃	5	30	Б	500

KH_2PO_4	0,3	1,8	В	3300
CaHPO_4	0,2	1,2		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	1,8		
K_2SO_4	0,2	1,2		
NaCl	0,5	3		

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

Для приготування розчину меляси на електронних вагах у мірному стаканчику об'ємом 2 л зважують 240 г меляси та додають питну воду об'ємом 750 мл. Розчин перемішують та переносять в колбу об'ємом 2 л. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 112°C протягом 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на електронних вагах 30 г карбонату кальцію, наважку переносять в металевий стакан об'ємом 1 л та подрібнюють до утворення однорідної маси. Подрібнений матеріал переносять в колбу об'ємом 1 л та додають питну воду (температура 50°C) об'ємом 500 мл та інтенсивно перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131°C протягом 30 хв.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину зважують на електронних вагах 1,8 г двозаміщеного фосфату калію та 1,2 г гідрофосфату кальцію, 1,8 г сульфату магнію, 1,2 г сульфату калію, 3 г хлориду натрію. Переносять наважки солей у збірник (Зб-11) об'ємом 7 л, додають питну воду об'ємом 3300 мл. Розчин перемішують та перекачують самоплином у інокулятор (Ін-13) та додають 12 мл розчину хлоридної кислоти (від ДР 3.2.1). Стерилізують в збірнику при температурі 130°C протягом 1 години.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 100 л Враховуючи об'єм конденсату (10%) та кількість посівного матеріалу (10 %) необхідна кількість води для розчинення складе 48 л

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 60 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 60 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	40	2400	А	7,5
CaCO ₃	5	300	Б	3
KH ₂ PO ₄	0,3	18	В	37,5
CaHPO ₄	0,2	12		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	18		
K ₂ SO ₄	0,2	12		
NaCl	0,5	30		

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у збірник (Зб-14) вносять 2400 г меляси, подають додають питну воду об'ємом 5,1 л. Розчин перемішують та і стерилізують при температурі 112⁰С протягом 30 хв.

ДР 4.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на електронних вагах 33 г карбонату кальцію, наважку переносять в збірник (Зб-15) об'ємом 5 л. та додають питну воду (температура 50⁰С) об'ємом 3 л. Стерилізують в збірнику при температурі 131⁰С протягом 30 хв.

ДР 4.3.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину зважують на електронних вагах 18 г двозаміщеного фосфату калію та 12 г гідрофосфату кальцію, 18 г сульфату магнію, 12 г сульфату калію, 30 г хлориду натрію. Переносять наважки солей у збірник (Зб-16) об'ємом 100 л, додають питну воду об'ємом 37.5 л. Розчин перемішують та подають в інокулятор (Ін-17), додають додають хлорину

кислоту (від ДР 3.2.2.). Стерилізують в інокуляторі при температурі 130⁰С протягом 1 години.

ДР 4.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в інокуляторі об'ємом 1000 л. Враховуючи об'єм конденсату (10%) та кількість посівного матеріалу (10 %) необхідна кількість води для розчинення складе 480 л

Таблиця 4.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 600 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	40	24000	А	74
CaCO ₃	5	3000	Б	8
KH ₂ PO ₄	0,3	180	В	398
CaHPO ₄	0,2	120		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	180		
K ₂ SO ₄	0,2	120		
NaCl	0,5	300		

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор у збірник (Зб-19) вносять 24000 г меляси, подають додають питну воду об'ємом 50 л. Розчин перемішують та і стерилізують в автоклаві при температурі 112⁰С протягом 30 хв.

ДР 4.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

Для приготування суспензії карбонату кальцію зважують на електронних вагах 33 г карбонату кальцію, наважку переносять в збірник (Зб-21) об'ємом 10 л та додають питну воду (температура 50⁰С) об'ємом 5 л. Стерилізують в збірнику при температурі 131⁰С протягом 30 хв.

ДР 4.4.3. Приготування та стерилізація композиції В

Для приготування розчину зважують на електронних вагах 180 г двозаміщеного фосфату калію та 120 г гідрофосфату кальцію, 180 г сульфату магнію, 120 г сульфату калію, 300 г хлориду натрію. Переносять наважки солей у збірник (ЗБ-22) об'ємом 500 , додають питну воду об'ємом 398 л. Перекачують у посівний апарат (ПА -24), додають хлорину кислоту від ДР 3.2.3. Стерилізують в посівному апараті при температурі 130⁰С протягом 1 години.

ДР 4.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для культивування в виробничому ферментері об'ємом 10 м³

Враховуючи об'єм конденсату (10%) та кількість посівного матеріалу (10 %) необхідна кількість води для розчинення складе 4800 л

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6000 л поживного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6000 л поживного середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Меляса	40	240000	А	4800
CaCO ₃	5	30000		
KH ₂ PO ₄	0,3	1800		
CaHPO ₄	0,2	1200		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	1800		
K ₂ SO ₄	0,2	1200		
NaCl	0,5	3000		

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

У збірник (ЗБ-33) об'ємом 10 м³ через об'ємно ваговий дозатор подають кг меляси, (прописати кількості іназви усіх солей), додають та передають на стерилізацію в УБС-10. Процес стерилізації проходить при температурі 160⁰С впродовж 5 хвилин. Нестерильне поживне середовище зі

збірника передається на колонку швидкісного нагріву за допомогою насоса (Н-34). Потім поживне середовище надходить у теплообмінник, де охолоджується до температури культивування 25⁰С, після цього стерильне та охолоджене середовище за допомогою насоса подається у інокулятор 2 (Р-44), посівний апарат (Р-46) та ферментер (Р-48).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

Посівний матеріал готують глибинним способом.

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Культуру мікроорганізму *A. vinelandii* ІБ 13 зберігають у пробірках зі скошеним МПА (м'ясо-пептонний агар) при температурі 4⁰С. Всі роботи з культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 5.2. Розсів до ізолюваних колоній

Для отримання робочої культури, необхідно колекційну культуру, що зберігається в пробірках з скошеним м'ясо-пептонний агар, розсіяти на чашки Петрі з поживним середовищем такого ж складу до ізолюваних колоній, вирощуючи бактерії при температурі 37⁰С упродовж 24 год.

ТП 5.3. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Ізолювані колонії з чашок Петрі пересівають петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агаром. Одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки. Використовуються колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см одна від одної. Тривалість вирощування – 24 години при 37⁰С.

ТП 5.4. Отримання посівного матеріалу в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у стерильну колб об'ємом 1 л вносять розчин композиції А (від ДР 4.1.1), розчин композиції Б (від ДР 4.1.2), розчин композиції В (від ДР 4.1.3), розчин композиції Г (від ДР 4.1.3), стерильною піпеткою 0,6 мл сульфату феруму (від ДР 3.1). Перемішують і розливають по 150 мл у 4 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірки з робочою культурою *A. vinelandii* ІБ 13 вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колби. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою.

Штами вирощують у колбах на качалці (160 об/хв) упродовж 24 год.

Після перевірки посівного матеріалу на відсутність сторонньої мікробіоти, в лабораторному боксі посівний матеріал зливають в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л. Обов'язковою стадією є мікробіологічний контроль поживного середовища.

ТП 5.5. Приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Для одержання інокуляту, у інокулятор Ін –13 в якому міститься стерильний розчин композиції В (від ДР 4.2.3), подають самоплином стерильний розчин композиції А (ДР 4.2.1) та Б (ДР 4.2.2.), та через засівну колбу стерильний розчин (6 мл) сульфату феруму (від ДР 3.1). Після цього вносять розчин гідроксиду натрію для вирівнювання рН середовища до 7,0 (від ДР 3.3.1) та вносять посівний матеріал від ТП 5.4 через засівну колбу об'ємом 1 л. Піногасник подають дозовано з реактора (Р-17), по сигналу датчика піни. Культивування проводиться протягом 24 год при t 25°C, рН 6,0 при постійному перемішуванні (200 об/хв) та аерації (значення pO_2 20–25% від насиченого повітря).

ТП 5.6. Приготування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

Для одержання інокуляту, у інокулятор Ін –18 в якому міститься стерильний розчин композиції В (від ДР 4.3.3), подають самоплином стерильний розчин композиції А (ДР 4.3.1) та Б (ДР 4.3.2.), та через засівну колбу стерильний розчин (60 мл) сульфату феруму (від ДР 3.1). Після цього вносять розчин гідроксиду натрію для вирівнювання рН середовища до 7,0 (від ДР 3.3.2) та вносять посівний матеріал від ТП 5.5 через трубу перетискування. Піногасник подають дозовано з реактора (Р-17), по сигналу

датчика піни. Культивування проводиться протягом 24 год при t 25°C, рН 6,0 при постійному перемішуванні (200 об/хв) та аерації (значення pO_2 20–25% від насиченого повітря).

ТП 5.7. Приготування посівного матеріалу в посівному апараті

Для одержання інокуляту, в посівному апараті ПА–25 в якому міститься стерильний розчин композиції В (від ДР 4.4.3), подають самоплином стерильний розчин композиції А (ДР 4.4.1) та Б (ДР 4.4.2.). Після цього вносять розчин гідроксиду натрію для вирівнювання рН середовища до 7,0 (від ДР 3.3.3) та вносять посівний матеріал через трубу перетискування від ТП 5.6. Піногасник подають дозовано з реактора (Р-17), по сигналу датчика піни. Культивування проводиться протягом 24 год при t 25°C, рН 6,0 при постійному перемішуванні (200 об/хв) та аерації (значення pO_2 20–25% від насиченого повітря).

ТП 6. Біосинтез

ТП.6.1. Виробниче культивування

У попередньо простерилізований ферментер (Р-48) об'ємом 10 м³ подають стерильне поживне середовище, яке було попередньо приготовлене (ДР 4.2.2.). Засів здійснюють через трубу перетискування посівним матеріалом, вирощениму на попередньому етапі. Піногасник буде подаватися дозовано, по сигналу датчика піни з реактора (Р-17).

Культивування проводять протягом 40 год при t 25°C, рН 6,0 при постійному перемішуванні (300 об/хв) та аерації. (значення pO_2 25–40% від насиченого повітря).

Культивування припиняють при досягненні 20 г/л альгінату.

РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

7.1 Мікробіологічний контроль.

Для перевірки зразка культуральної рідини на наявність сторонньої мікрофлори здійснюють мікроскопіювання у світловому мікроскопі, використовуючи фіксований препарат, використовуючи об'єктив 90X.

Клітини *A. vinelandii* еліпсоподібні або кокоподібні, розміри 1,6-2,5x3-5 мкм (рис. 5.1).

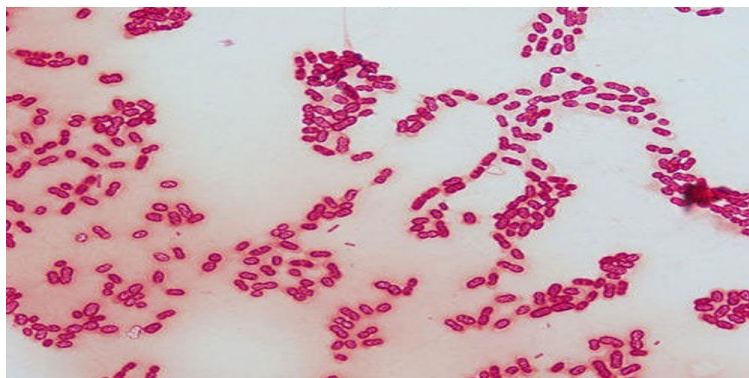


Рисунок 7.1. Клітини *Azotobacter vinelandii* у світловому мікроскопі

У разі виявлення клітин, які мають відмінну морфологічну будову здійснюється висів зразка культуральної рідини на щільні поживні середовища.

У кожену чашку Петрі діаметром 9 см вносять 1 мл випробуваного зразка і від 15 мл до 20 мл розплавленого густого поживного середовища для вирощування бактерій (наприклад, середовище МПА) або від 15 мл до 20 мл розплавленого густого поживного середовища для вирощування грибів (наприклад, середовище Сабуро). Температура поживного середовища повинна становити не більше 45°C. Для кожного розведення використовують не менше двох чашок Петрі з поживним середовищем. Посіви інкубують при температурі 37°C протягом 24 годин для виявлення бактерій та 25°C протягом 48-72 год для виявлення дріжджів та міцеліальних грибів.

					НУХТ БТЕК 05.01.07. ДП ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Малко А.				РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Ключка Л.В.						1	2
Реценз.						60		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.	Пирог Т.П.							

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії із наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

У пробірки із 9 мл дистильованої води вносимо по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм). Кількість абсолютно сухої біомаси (г/л) визначають за допомогою калібрувального графіка.

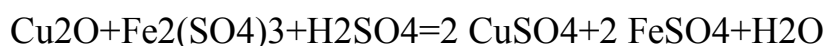
Визначення концентрації альгінату здійснюється графіметричним методом. Для цього 100 мл відцентрованої культуральної рідини обробляють ізопропанолом у співвідношенні 3:1 при температурі -5°C та рН 6. Пробу центрифугують при 300 об/хв. протягом 15 хв утворений осад, промивають ізопропанолом та холодною водою, висушують і зважують [7].

7.3. Визначення концентрації джерела вуглецю

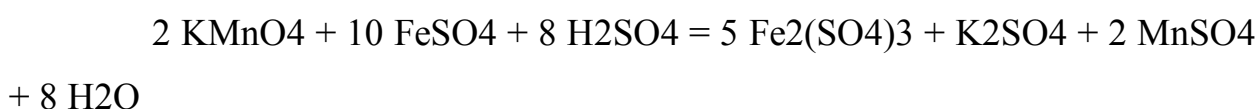
Оскільки *A. vinelandii* належить до азотфіксуючих мікроорганізмів і отримує азотне живлення безпосередньо з аераційного повітря, то поживне середовище не містить джерела азоту.

Меяса, як джерело вуглецю, містить в основному сахарозу та глюкозу, то для їх визначення необхідний метод, який буде фіксувати значення концентрації як глюкози, так і сахарози.

Суть методу полягає в тому, що для аналізу беруть рівні об'єми (по 20 мл) розчинів Фелінг I та II і цукру. Загальний об'єм суміші повинен бути завжди 60 мл. Суміш кип'ятять рівно 3 хв. Випадає червоний осад оксиду міді (I), який відфільтровують, промивають та розчиняють сульфатом заліза (III) в присутності сірчаної к-ти: при цьому оксид міді (I) кількісно окислюється трьохвалентним залізом, відновлюючи його в двохвалентне по рівнянню



K-сть сульфату заліза (III), еквівалентне к-сті оксиду міді (I) визначають титруванням перманганатом калію, який окислює його в сульфат заліза (III).



За цим методом можна визначити вміст мальтози, глюкози та інвертного цукру. К-сть цукру в аналізованій пробі повинно бути не менше 10 і не більше 100 мг. Оптимальний вміст цукру лежить в межах 40-60 мг (0,2-0,3 % концентрація).

Техніка визначення. В конічну колбу відмір. 20 мл культуральної рідини і по 20 мл Фелінгу I і II. Суміш переміш, нагрів. до кипіння і кип 3 хв. Після цього приступають до фільтрації. Повністю зливають синю рідину на фільтр, в колбу зразу налив 30-60 мл гарячої дист води, осаду дають відстоятися, а потім промивну воду також переводять на фільтр. Промивку повторюють 2-3 рази, а потім осад в колбі промивають 15-20 мл розчину залізо амонійних галунів. Після цього змінюють колбу на чисту і розсин сульфату заліза переводять на фільтр. Потім колбу і фільтр промив хол дист водою. Фільтрат одразу титрують перманганатом калію до зміни зелен забарв на рожеве.

Зразок наливають в кювету з довжиною оптичного шляху 1 см. Оптичну густину вимірюють в області довжин хвиль 650 нм. Концентрацію цукрів визначають за калібрувальним графіком.

7.4. Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кх, Кт 1.1.1. Підготовка 0,3% розчину «Біомой»	Концентрація розчину «Біомой»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C= 0,3 %.
Кх, Кт 1.1.2. Підготовка 0,2% розчину «Дезактину»	Концентрація розчину «Дезактину»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C= 0,2 %.
Кх, Кт 1.1.3. Підготовка 0,5% розчину «Ніка-екстра М Профі»	Концентрація розчину «Ніка-екстра М Профі»	Хімічний метод	Після приготування розчину	C= 0,5 %.
Кх 1.2.1, Кх 1.2.2 Санітарна підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.4.1. Миття та ополіскування обладнання та комунікації	Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота, швидкість подачі миючого розчину	Термометр технічний, годинник, датчик контролю швидкості	Під час проведення операції обробки	t = 45 °C τ = 1 – 2 год
Кт 1.4.2. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначаються безперервно під час перевірки на герметичність	P = 0,07 МПа τ = 30 хв

Кт 1.4.2. Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Манометр технічний, годинник	Тиск визначаються безперервно під час перевірки на герметичність	$P = 0,07$ МПа $\tau = 30$ хв
Кт 1.4.3. Стерилізація комунікацій та обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації, тиск	Термометр технічний, годинник, манометр	Температура та тиск визначаються безперервно під час стерилізації	$P = 0,2$ МПа $t = 125-130$ °С $\tau = 1$ год
Кт 2.1. Забір повітря з атмосфери	Атмосферне повітря		Під час забору повітря	$H = 3$ м
Кт 2.2. Попереднє очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	$E = 80\%$, тиск згідно паспорту
Кт 2.3. Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	$P=0,35-0,5$ МПа $t=250$ °С
Кт 2.4. Охолодження повітря в теплообміннику	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	$t = 15-25$ °С
Кт 2.5. Видалення вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	$W=40$ %
Кт 2.6. Нагрівання в теплообміннику	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	$t = 27$ °С

Кт 2.7. Очищення повітря в головних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	E = 99,5 %
Кт 2.8. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,9999 %
Кх, Кт 3.1. Приготування 10% розчину сірчаної кислоти	Концентрація розчину сульфатної кислотим	Хімічний метод	Після приготування розчину	t = 50 °C C = 10%
Кх, Кт 3.2. Приготування 6% розчину соляної кислоти	Концентрація розчину соляної кислотим	Хімічний метод	Після приготування розчину	t = 50 °C C = 6%
Кх, Кт 3.3. Приготування 10% розчину гідроксиду натрію	Концентрація розчину гідроксиду натрію	Хімічний метод	Після приготування розчину	t = 50 °C C = 10%
Кх, Кт 3.4. Приготування і стерилізація піногасника	Концентрація розчину піногасника	Хімічний метод термометр технічний, годинник	Після приготування розчину	t = 121 °C, τ = 30 хв,

Кт, Км, Кх 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, концентрація, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, рН-метр	Концентрація розчину визначається після приготування, а температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, рН = 6,0 відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 130 °С, τ = 1 година, відсутність мікробіоти
Км 4.1.5. Змішування розчинів	Стерильність розчинів	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після змішування розчинів	Відсутність мікробіоти

Кх 4.2.1. Приготування композиції А	Композиція А, концентрація	рН-метр	Концентрація розчину визначається після приготування	рН = 6,0
Кт, Кх 4.2.2. Передача композицій в збірник та їх стерилізація в УБС-10.	Розчини, температура, час, стерильність	Термометр технічний, рН-метр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	рН=6,0, t = 140 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.2 Приготування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, рН середовища, перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН середовища, швидкість перемішування контролюється безпосередньо під час процесу, а мікробіологічна чистота культури після вирощування культури в колбах на качалках	t = 25 °С, рН=6,0, w = 160 об/хв., τ = 2 доби, відсутність сторонньої мікрофлори

Кт, Км, Кх 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, концентрація, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль, рН-метр	Концентрація розчину визначається після приготування, а температура безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 30 хв, рН = 6,0 відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В	Композиція В, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.4. Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 130 °С, τ = 1 година, відсутність мікробіоти
Км 4.1.5. Змішування розчинів	Стерильність розчинів	Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль після змішування розчинів	Відсутність мікробіоти

Кх 4.2.1. Приготування композиції А	Композиція А, концентрація	рН-метр	Концентрація розчину визначається після приготування	рН = 6,0
Кт, Кх 4.2.2. Передача композицій в збірник та їх стерилізація в УБС-10.	Розчини, температура, час, стерильність	Термометр технічний, рН-метр, годинник, мікробіологічний контроль	Концентрація визначається після приготування розчину, температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	рН=6,0, t = 140 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 5.2 Приготування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, рН середовища, перемішування, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, тахометр, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН середовища, швидкість перемішування контролюється безпосередньо під час процесу, а мікробіологічна чистота культури після вирощування культури в колбах на качалках	t = 25 °С, рН=6,0, w = 160 об/хв., τ = 2 доби, відсутність сторонньої мікрофлори

ЛІТЕРАТУРА

1. Hay I.D., Rehman Z.U., Moradali M.F. et al. Microbial alginate production, modification and its applications // *Microb. Biotechnol.* – 2013. – V.6, N 6. – P. 637–650.
2. Abdasalizadeh F., Moghaddam S.V., Alizadeh E. et al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting // *Microbiology.* – 2020. – V 14. – P. 8 – 30.
3. Gomez C.G., Pérez Lambrecht M.V., Lozano J.E. Influence of the extraction–purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*) // *Journal of Biological Engineering.* – 2009. – V. 44, N 4. – P. 365 – 371.
4. Galindo E., Peña C., Núñez C., et al. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* // *Microb. Cell. Fact.* – 2007. – V. 6, N 7. – P. 168–180.
5. *Справочник по гидроколлоидам* / Г.О. Филлипс, П.А. Вильямс (ред.) Перевод с англ. под. ред. А.А. Кочетковой и Л.А. Сарафановой. – СПб: ГИОРД, 2006. – 536 с.
6. Pacheco-Leyva I., Pezoa F.G., Diaz-Barrera A. Alginate Biosynthesis *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanism in Connection with the Oxygen Availability // *International Journal of Polymer Science* , 2016. – V.2016. – 12 p. - <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2062360>
7. Логинов Я. О. Биосинтез и свойства *Azotobacter vinelandii* ИБ 1: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Щелково, 2011. – 147 с.
8. Четвериков С.П., Логинов Я.О., Пигильцова С.А. и др. Оптимизация условий культивирования и биосинтеза экзополисахарида *Azotobacter vinelandii* // *Башкирский химический журнал.* – 2006. – Т.13, №5 – С. 8-11.
9. Яхницька М. М. Особливості електролітного обміну в пацієнтів з гастроєзофагеальною рефлюксною хворобою. Дис. на здобуття наук. ступеня

канд.. мед.х наук за спеціальністю 14.01.36 «Гастроентерологія» (222 – Медицина). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, 2020.

10. Карлаш Ю. В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. Основи проектування фармацевтичних виробництв [Електронний ресурс] [Текст] : метод. рекомендації до викон. курсов. пр. для студ. напр. підгот. 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заочн. форм навч. / уклад., В. О. Красінько, І. М. Волошина ; Нац. ун-т харч. технол. — К. : НУХТ, 2013. — 85 с. .

11. Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів [Електронний ресурс] [Текст] : метод. рекомендації до викон. курсової роботи для здобувачів освіт. ступ. "Бакалавр" спец. 162 "Біотехнології та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна" ден. форми навч. / уклад. :, В. О. Красінько, С. М. Тетеріна ; Нац. ун-т харч. технол. — Київ : НУХТ, 2020. — 55 с.

12. *Urtuvia V., Maturana N., Acevedo F., Peña C., Díaz-Barrera A.* Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production // *World J. Microb. Biotechnol.* 2017. – V. 198 – 33 p. – <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>

13. *Draget I., Taylor C.* Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications // *Food Hydroc.* – 2011. – V. 25. N 7. – P. 251 – 256.

14. *Yabur R., Bashan Y., Hernández-Carmona G.* Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion // *J. Appl. Phycol.* – 2007. – V. 19, N 1. – P. 43–53.

15. *Vakil N. T.* The Montreal Definition and Classification of Gastroesophageal Reflux Disease: A Global Evidence Based Consensus // *Am. J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 101. – P. 1900 – 1920.

16. Ramos P.E., Silva P., Alario M.M., et al. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics // Food Hydrocoll., 2018. –V. 77 – P. 8–16.
17. Mohammadi N.S., Khiabani M.S., Ghanbarzadeh B, Mokarram R.R. Enhancement of biochemical aspects of lipase adsorbed on halloysite nanotubes and entrapped in a polyvinyl alcohol/alginate hydrogel: strategies to reuse the most stable lipase // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2020. – V. 36. – 15 p. – <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02817-2>
18. Sabra W. Microaerophilic production of alginate by *Azotobacter vinelandii* : diss.... dr. rer. nat. : def. 17.12.1998. / Sabra Wael. – 1999. – 143 p.
19. Westermeier R., Patiño D., Piel M.I. et al. A new approach to kelp mariculture in Chile: production of free-floating sporophyte seedlings from gametophyte cultures of *Lessonia trabeculata* and *Macrocystis pyrifera* // Aquac. Res. – 2006. – V. 37, N 2. – P. 164–171.
20. Rehm B.H.A. *Pseudomonas*: model organism, pathogen, cell factory. – John Wiley & Sons: 2008. – 424 p.
21. Patent N 2009134368 US. Methods of producing bacterial alginates / H.D.Yu, D.Qiu, F.Heath Damron. – Publ. 5.11.2009.
22. Пат. № 2073712 РФ. Штамм бактерій *Azotobacter vinelandii* (Lipman) – продуцент экзополисахарида / Краснопевцева Н.В.; Чернягин А.В.; Яроцкий С.В. – Оpubл. 20.02.1997.
23. Пат. № 2073712 РФ Штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* АТСС 478 – экзополисахарида / Краснопевцева Н.В.; Чернягин А.В.; Яроцкий С.В. – Оpubл. 20.02.2008.
24. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
25. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Vol.2: The *Proteobacteria*. – Springer: 2005. – 2816 p.

26. *Bandyopadhyay, S., Naik S. G., O'Carroll I. P., et al.* Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes // *Journal of Bacteriology*. – 2009. – V. 195. – P. 305 – 421.

27. *Mazinani Z., Aminafshar M., Asgharzadeh A., Chamani M.* Effect of *Azotobacter* population on physico-chemical characteristics of some soil samples in Iran // *Ann. Biol. Res.* – 2012. – V. 3, N 7. – P. 3120–3125.

28. *Якуба Ю.Ф., Марковский М.Г.* Определение глюкозы, сахарозы и фруктозы методом капиллярного электрофореза // *Вопрос питания*. – 2015. – № 1. – С. 89–94.