

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології _____

«До захисту в ЕК»

Директор інституту(декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« ____ » _____ лютого _____ 2024 р.

« ____ » _____ лютого _____ 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

на тему: «Культивація *Acinetobacter* sp. для одержання етаполану»

Виконав: здобувач 5 курсу, групи 1

ГРЕНКО Микита Данилович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник КЛЮЧКА Лілія Вікторівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

Рецензент

_____ (ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2024 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

«30» жовтня 2023

року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ГІРЕНКА Микити Даниловича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Культивування *Acinetobacter* sp. для одержання етаполану»

керівник роботи КЛЮЧКА Лілія Вікторівна, старший викладач.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від «б» листопада 2023 року № 915-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 29.01.2024

3. Вихідні дані до роботи: біологічний агент: *Acinetobacter* sp.; цільовий продукт: етаполан; геометричний об'єм ферментера: 6,3 м³; коефіцієнт заповнення: 0,6

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

Характеристика цільового продукту; обґрунтування вибору та характеристика

біологічного агента; техніко-економічне обґрунтування; обґрунтування вибору технологічної схеми; специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; опис технологічної схеми

доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу;

контроль виробництва;

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема біосинтезу етаполану - 1 аркуш формату А1

Апаратна схема біосинтезу етаполану - 1 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика цільового продукту</i>	<i>30.10.2023– 05.11.2023</i>	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>06.11.2023-29.11.2023</i>	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>20.11.2023-03.12.2023</i>	
4.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва</i>	<i>04.12.2023-10.12.2023</i>	
5.	<i>Специфікація обладнання</i>	<i>11.12.2023-24.12.2023</i>	
6.	<i>Опис технологічної схеми</i>	<i>25.12.2023-30.12.2023</i>	
7.	<i>Контроль виробництва</i>	<i>01.01.2024-07.01.2024</i>	
8.	<i>Оформлення кваліфікаційної роботи</i>	<i>08.01.2024-14.01.2024</i>	
9.	<i>Оформлення графічної частини</i>	<i>15.01.2024-22.01.2024</i>	

Здобувач

(підпис)

Микита ГІРЕНКО

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Лілія КЛЮЧКА

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено проектуванню ділянки виробничого біосинтезу одержання етаполану на основі *Acinetobacter sp. B-7005*.

Для здійснення культивування з метою одержання етаполану обрано штам *Acinetobacter sp. B-7005*- цей штам характеризується більшим виходом цільового продукту (14,4 г/л етаполану, у порівнянні із *Acinetobacter sp. 12S*, який має вихід 9,4 г етаполану), меншим часом культивування (120 годин) та низькою вартістю 1 л поживного середовища (22,64 грн за 1 л).

Техніко-економічне обґрунтування розраховувалося виходячи із потреб нафтовидобувної промисловості, оскільки основне використання етаполану – в якості бурового розчину. Таким чином, розрахунок здійснювався на основі даних щодо діючих нафтових свердловин, які можна обробляти буровими розчинами з метою збільшення виходу нафти при її видобутку. Річний об'єм культуральної рідини, який є необхідним щоб задовольнити потреби, які розраховану у роботі, складає 200,34 м³ з урахуванням втрат в процесі виділення продукту.

Проект складається зі вступу, восьми розділів, графічної частини (технологічної та апаратурної схеми) та списку використаної літератури. Загальний обсяг проекту – 65 сторінок, 10 таблиць, 2 креслення формату А3.

Ключові слова: етаполан, екзополісахариди, виробництво, біосинтез, *Acinetobacter sp. B-7005*, ацинетобактерії.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	13
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	13
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	15
2.3. Таксономічний статус біологічного агента	17
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	19
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	19
3.2. Розрахунок потужності виробництва	20
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера.....	21
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу	22
3.5. Біосинтез цільового продукту	23
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	25
4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	25
4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	26
4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	27
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	30
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	37
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	50
7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу.....	50
7.2. Мікробіологічний контроль.....	54
7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	55
7.3.1. Концентрація біомаси.....	55
7.3.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту	55

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	57
8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцях емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	57
8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	58
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	58
8.2.2. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів	60
8.2.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	61
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	63

ВСТУП

Екзополісахариди (гр. *exo* - поза, *poly* - багато, *saccharon* – цукор) - високомолекулярні полімери, що складаються із залишків цукру, які виділяються мікроорганізмами в навколишнє середовище. Вони діють як бар'єр між клітинами та навколишнім середовищем, вони виступають резервуаром, відіграючи захисну роль від висихання та запобігаючи стресу в екстремальних умовах. Екзополісахариди виконують роль саморегуляторів процесів росту і розвитку.

Бурхливий розвиток біотехнології на основі мікроорганізмів сприяє значному розширенню досліджень з пошуку нових продуцентів полісахаридів, що використовуються в різних галузях народного господарства та медицини. У свою чергу, все зростаючі потреби в полісахаридах впливають на розвиток біотехнології. Світове виробництво екзополісахаридів сягає десятків тисяч тон. Збільшення їх випуску обумовлено тим, що діапазон використання розширюється вже в традиційних галузях народного господарства. Виявлено і нові галузі, в яких застосування екзополісахаридів може дати значний економічний ефект. Зараз легше назвати галузі народного господарства, у яких би не використовували чи не було б рекомендацій щодо використання мікробних полісахаридів.

Мікробні екзополісахариди і полісахариди, що виділяються в навколишнє середовище, виробляються великою кількістю бактерій і грибів. Більшість ЕПС мало вивчені, але серед тих, чії фізико-хімічні властивості добре охарактеризовані, є багато біополімерів, які можуть бути придатними для широкого спектру застосувань у різних галузях економіки. Промислове виробництво бактеріальних екзополісахаридів у розвинених країнах (США, Німеччина, Франція, Японія та ін.) набуло великих масштабів. Світове виробництво полісахаридів з мікробних джерел

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Гіренко М.Д.				Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив	Ключка Л.В.						
Реценз.					ВСТУП Кафедра БТМ		
Н. контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

зростає в середньому на 10% на рік. Можливі галузі застосування мікробних екзополісахаридів надзвичайно різноманітні: нафтова та гірничодобувна промисловість, текстильна, харчова, фармацевтична, хімічна промисловість та медицина. Попит на ці полімери зростає, але не задовольняється повністю [1].

Етаполан - екзоклітинний мікробний полісахарид, що виробляється непатогенним продуцентом, має унікальні фізико-хімічні властивості, які визначаються наявністю в макромолекулах гідрофобних ацильних залишків. Склад екзополісахариду можна широко варіювати шляхом контролю його біосинтезу. Все це є основою для різноманітних технологічних застосувань полісахариду. Этаполан вже використовується нафтовою промисловістю для збільшення вилучення нафти. Этаполан нетоксичний і відноситься до перспективних харчових гідроколоїдів для використання як функціональна добавка та харчова клітковина [2].

У кваліфікаційній роботі розглянуто використання етаполану у нафтовидобувній галузі промисловості. На основі етаполану розроблено спосіб ізоляції притоку пластових вод, який дає змогу при застосуванні 1 т етаполану видобути додатково до 240 т нафти [3]. В цих же цілях використовується ЕПС ксантан, один із найвідоміших полісахаридів, річне виробництво якого становить 30 000 тон. Але серед великої кількості технологій, описаних у літературі, для аналізу були обрані технології отримання цього ЕПС на промислових відходах, оскільки середовище для отримання етаполану також містить відпрацьоване масло. Варто зазначити, що ксантан, на відміну від етаполану, не має здатності підвищувати в'язкість розчину в присутності солей міді, відповідно, для отримання необхідної в'язкості культуральної рідини ксантану слід використовувати в 10 разів більше порівняно з етаполаном [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА КІНЦЕВОЇ ПРОДУКЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

Фізико-хімічна характеристика етаполану. Полісахарид, що має назву "етаполан", у порівнянні з відомими полісахаридами характеризується більш високою молекулярною масою (926,0 – 1441,0 кДа), що забезпечує більш високі значення в'язкості водяних розчинів. Цей препарат більш очищений – вміст вуглеводів досягає 87%. Перевагою мікробного екзополісахариду етаполану, в порівнянні з відомими у світі полісахаридами, є можливість його отримання на широкому наборі різних C₂-C₆-субстратів (вуглеводи, етанол, ацетат, органічні кислоти), а також на рафінованій та відпрацьованій оліях

Етаполан це порошок світлого кольору без смаку і запаху, нетоксичний і не має сенсibiliзуючої активності. Високов'язкі розчини етаполану характеризуються високою стабільністю в широкому діапазоні значень рН і температури, псевдопластичністю та тиксотропністю. Він має здатність адсорбувати та виводити з організму солі важких металів; відсутні тератогенність, мутагенність, ембріотоксичність та алергенність.

Етаполан має ацильовані (містить C₁₂ –C₁₈ жирні кислоти) і неацильовані компоненти, з однаковим складом моносахаридів, вмістом глюкуронової кислоти та пірвату. Завдяки наявності жирних кислот сполуки мають здатність емульгувати та підвищувати в'язкість за наявності катіонів та низького рН у системі Cu²⁺-гліцин, що визначає практичне використання цього екзополісахариду в нафтовидобутку (використовуючи 1 кг етаполану, можна отримати 240 кг нафти) [1].

Етаполан відрізняється від інших полісахаридів, які використовуються в нафтовидобуванні (ксантан, склероглюкан та емульсан), більш підвищеною в'язкістю розчину в мінералізованому середовищі. Важливою характеристикою

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Гіренко М.Д.			Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Ключка Л.В.					
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
РОЗДІЛ 1. Характеристика кінцевої продукції виробництва							

розчинів етаполану є їх підвищена в'язкість при кислотній обробці, що відкриває можливість використання для подовження кислотної обробки в забійних зонах пластів. Розчини етаполану більш термостійкі, ніж розчини ксантану і склероглюкану, що дозволяє використовувати їх на родовищах з високою пластовою температурою [5].

Комплексний полісахаридний препарат етаполан складається з нейтрального і кислого полісахаридів [1,6]. Нейтральний полісахарид, до складу якого входить глюкоза, маноза, галактоза (3:2:1) є мінорним компонентом - його вміст не перевищує 5-6 %. За даними газо-рідинної хроматографії у складі кислого ЕПС виявлені залишки глюкози, манози, галактози і рамнози у молярному співвідношенні 3:2:1:1. У кислому ЕПС встановлена наявність уронових і піровиноградної кислот. У процесі лужної обробки кислого ЕПС виділена суміш жирних кислот, основними компонентами якої були додеканова, гексадеканова, гексадеценова, октадеканова та цис-октадеценева кислоти у співвідношенні 10:29:12:7:20 [1, 6]. Слід зазначити, що наявність жирних кислот, які етерифікують вуглеводний ланцюг, не характерна для мікробних ЕПС. Кислий ЕПС вміщує 40-50% вуглеводів, білок не виявлено; також виявлено 20-30% мінеральних компонентів [6].

Сфери використання етаполану. Більшість мікробних екзополісахаридів використовуються як стабілізатори. Вони необхідні для покращення споживчої привабливості продукту, зміцнення його структури та забезпечення стійкості при зберіганні. Дія полісахаридів у ролі стабілізаторів проявляється у їх здатності зв'язувати воду, взаємодіючи з компонентами продукту, переважно з білками, формуючи структурні елементи гелевого каркаса. Крім того, використання стабілізуючих компонентів дає можливість покращити якісні характеристики та знизити собівартість готової продукції.

Екзополісахариди відрізняються великою різноманітністю структурних комбінацій, що зумовлюють унікальні індивідуальні біологічні властивості. Лабораторні та клінічні дослідження довели антиоксидантні, імуномодельючі та протипухлинні властивості екзополісахаридів. Враховуючи широкий спектр

фармакологічної активності та низької токсичності, дані сполуки розглядаються як активні субстанції у виробництві лікарських та косметичних препаратів.

На сьогоднішній день світові виробники косметичної сировини створюють запатентовані активи на основі екзополісахаридів з ідентифікованих планктонних мікроорганізмів шляхом біотехнологічного культивування та сучасної системи очищення. У результаті отримують 100% натуральні та чисті молекули.

У побутовій хімії й косметології використовуються препарати етаполан, розчинам яких притаманна висока емульгувальна активність. Дозволяє освіжати шкіру, підтримує пружність, вологість, скорочує пори. Виступає сильним антиоксидантом. Застосовується у складі оболонки для лікарських капсул. Через високий вміст неацильованого полісахариду етаполан можуть використовувати в якості загущувального агенту в лужних середовищах миючих засобів, пральних паст, кремів та ін. На основі етаполану виготовлено технічний миючий засіб БІМС-1 та косметичний крем «Екол» [6].

Важливість екзополісахаридів, як для бактерій, які їх виробляють, так і для потреб людини, зокрема у виробництві харчових продуктів. Вони відіграють роль природних загусників у технологіях виробництва біопродуктів із ряжанки, а також виступають саморегуляторами процесів росту та розмноження мікроорганізмів. Використовується як загусник для заливання тортів, фруктових начинок, повидла, джему, варення, фруктових напоїв, для зв'язування вологи в борошняних кондитерських та хлібобулочних виробках.

Одним із найперспективніших напрямів використання полісахаридів є хлібопекарська промисловість. Найпоширенішим недоліком пшеничного борошна є низький вміст клейковини. Існуючі методи підвищення якості такого борошна є трудомісткими та економічно недоцільними. Ефективним способом підвищення якості хліба з борошна з низьким вмістом клейковини є використання в якості покращувачів гідрофільних добавок різного походження, у тому числі мікробних полісахаридів. Для виробництва хлібопродуктів розробили добавки К-1, К-2, К-3 на основі етаполану.

Також екзополісахариди використовують для підвищення урожайності та економії добрива. Препарати етаполану в концентрації 500-2000 мкг/мл здатні індукувати стійкість надчутливих рослин тютюну та дурману до ВТМ-інфекції. Здатні індукувати резистентність організму до вірусних інфекції *de novo*, завдяки поліаніонівій структурі.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

Acinetobacter – це грамнегативні, неферментуючі, часто коккобацилярні бактерії, які належать до родини *Moraxellaceae*. В даний час рід включає 34 види, 25 з них мають дійсні назви, а 9 названі за їх геномною групою.

Екзополісахариди, що синтезуються *Acinetobacter sp.* в оптимальних для зростання бактерій умовах, захищають клітини продуцента від дії важких металів, біоцидів, детергентів, високих та низьких значень рН та інших несприятливих факторів.

Acinetobacter sp. є природним ауксотрофом — потребує пантотенової кислоти та неідентифікованого ростового фактора, що міститься в дріжджовому автолізаті [6]. Ці бактерії легко утворюють стійкі асоціації з мікроорганізмами, продукти метаболізму яких можуть бути для *Acinetobacter sp.* джерелами необхідних чинників зростання [7,8].

Етаполан може виконувати захисні функції не тільки стосовно продуцента, але й інших мікроорганізмів, що знаходяться в трофічних взаєминах з *Acinetobacter sp.* Також може бути джерелом мінеральних компонентів для мікроорганізмів в умовах зниженої їх концентрації.

Штам *Acinetobacter sp.* депоновано в Українській колекції мікроорганізмів під номером В-7005. Штам виділено з ЕПС-утворювальної накопичувальної культури, отриманої шляхом декількох послідовних пересівів зразка активного мулу станції

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Гіренко М.Д.				Лт.	Арк.
Перевірив		Ключка Л.В.					Аркушів
Реценз.					РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента		
Н. контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Кафедра БТМ		

біологічної очистки стічних вод Надворнянського нафтопереробного заводу (Україна) на мінеральному середовищі з етанолом [1, 5].

Також відомим мікроорганізмом-продуцентом етаполану є штам *Acinetobacter* sp. 12S. З даних таблиці 2.1 видно, що вартість середовищ для культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 та *Acinetobacter* sp. 12S є майже однаковою. Але тривалість культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 нижча, ніж в іншого продуценту.

Таблиця 2.1

Вартість поживних середовищ для культивування *Acinetobacter* sp.3

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища
<i>Acinetobacter</i> sp. B-7005	KH ₂ PO ₄	6,8	366	2,5
	KOH	0,9	150	0,13
	MgSO ₄ ×7 H ₂ O	0,4	168	0,06
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,1	75	0,007
	NH ₄ NO ₃	0,2	61	0,012
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	46	0,0004
	Дріжджовий автолізат	5	3 984	19,92
	Пангетонат	0,0085	1290	0,01
	Вартість 1 л середовища – 22,64 грн			
<i>Acinetobacter</i> sp. 12S	KH ₂ PO ₄	6,8	366	2,5
	KOH	0,9	150	0,13
	NaCl	1,1	20	0,022
	MgSO ₄ ×7 H ₂ O	0,4	168	0,06
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,1	75	0,007
	NH ₄ NO ₃	0,6	61	0,036
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,001	46	0,0004
	Дріжджовий автолізат	5	3 984	19,92
	Пангетонат	0,006	1290	0,007
Вартість 1 л середовища – 22,68 грн				

Отже, для остаточного вибору біологічного агенту розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.2). Дані таблиці 2.2 свідчать, що умовна вартість етаполану, синтезованого *Acinetobacter* sp. B-7005 нижча (188,66), ніж *Acinetobacter* sp. 12S (231,43). Тому для отримання цільового продукту вважаю доцільним використовувати штам *Acinetobacter* sp. B-7005.

Таблиця 2.2

Умовна вартість 1 г етаполану, синтезованого на поживних середовищах

Біологічний агент	Концентрація етаполану, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного етаполану за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Acinetobacter</i> sp. B-7005	14,4	120	0,12	22,64	188,66
<i>Acinetobacter</i> sp. 12S	9,4	96	0,098	22,68	231,43

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

За морфолого-культуральними властивостями штам *Acinetobacter* sp. B-7005 відноситься до грамнегативних нерухливих клітин. Штам оксидазонегативний та каталазопозитивний. В стаціонарній фазі росту клітини кокоподібні, розташовані парами або короткими ланцюжками, а в експоненційній – це товсті короткі палички (рис. 3.1). Розмір клітин 0,95-1,5×1,2-2 мкм, спор не утворюють [10]. Клітини розмножуються бінарним поділом.

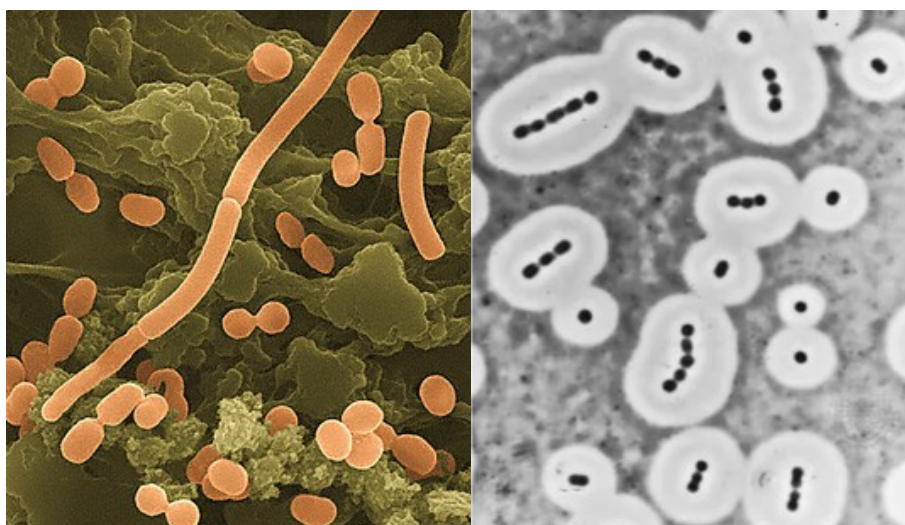


Рисунок 2.1 – Клітини *Acinetobacter* sp. B-7005

Під час росту на агаризованому сусловому середовищі утворюють гладенькі блискучі слизоподібні колонії кремового кольору, озміром 4-5 мм (рис. 3.2).

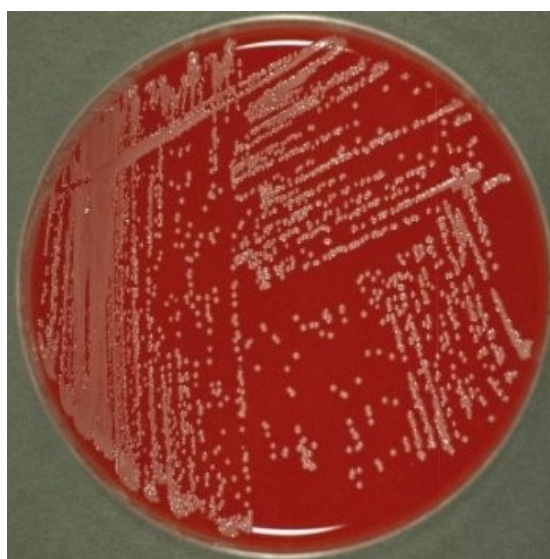


Рисунок 2.2 – Колонії *Acinetobacter* на агаризованому сусловому середовищі

На агаризованому мінеральному середовищі з етанолом або сахарозою колонії мукоїдні та блискучі, розміром 1-2 мм. На м'ясопептонному агарі вони гладенькі, білі, опуклі, мукоїдні, білого кольору, розміром 3 мм (рис. 3.3). Під час культивування на рідкому середовищі клітини утворюють в'язку гомогенну суспензію. Росте на складних органічних середовищах, накопичує ацетат при рості на мінеральному середовищі з етанолом без внесення факторів росту в культуральній рідині.

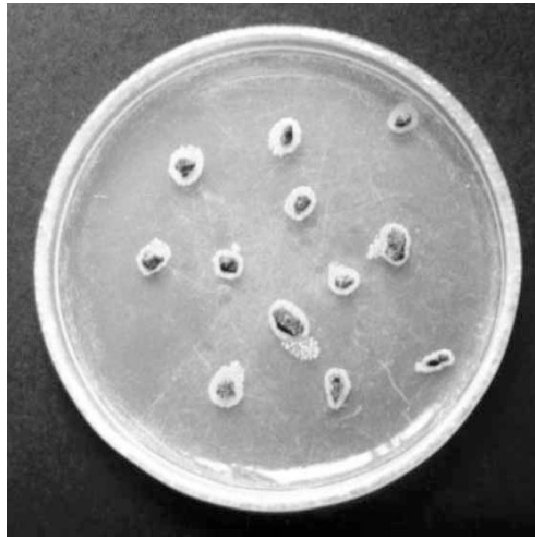


Рисунок 2.3 – Колонії *Acinetobacter* на м'ясопептонному агарі

Мезофіл. Оптимальна температура для зростання 30-32°C. Оптимальні значення рН росту та біосинтезу колоній повинен знижуватися до кінця процесу з 7,4 до 5,5. Але синтез бактерій при значенні рН 7,0 – 8,2 привело до збільшення кількості екзополісахариду в 2-3 рази.

Бактерії-прототрофи. Асимілюють D-галактозу, 2-ацетамідо-2-деоксі-D-галактозу, 2-ацетамідо-2-деоксі-D-глюкозу, 3-деоксі-3-(D-3-гідроксибутирамід)-D-хіновозу, D-галактозу, N-ацетил-D-галактозамін, N-ацетил-D-глюкозамін. Можуть розкласти D-глюкозу, D-рибозу, D-ксилозу, D-арабінозу.

Облігатний аероб, тому потребує інтенсивної аерації під час глибинного культивування.

2.3. Таксономічний статус біологічного агента

Довгий час рід *Acinetobacter* ділили на ДНК-групи або геномні види, даючи їм цифрову арабську нумерацію. Сучасна таксономія оперує класичними поняттями видів ацінетобактерій. Класифікатор Bergey, який кардинально змінював таксономію протеобактерій у 2004 р., налічував про 16 видів *Acinetobacter* [11]. У 2010 р. їх нарахували уже 23 види. На сьогодні окремі джерела нараховують понад 50 видів цього роду бактерій.

Штам *Acinetobacter sp.* депоновано в Українській колекції мікроорганізмів під номером В-7005. Штам виділено з ЕПС-утворювальної накопичувальної культури,

отриманої внаслідок декількох послідовних пересівів зразка активного мулу станції біологічного очищення стічних вод Надворнянського нафтопереробного заводу (Україна) на мінеральному середовищі з етанолом [1]

Бактерії роду *Acinetobacter* мають таке систематичне положення:

Домен: *Prokaryota*

Царство: *Bacteria*

Відділ: *Proteobacteria*

Клас: *Gamma proteobacteria*

Порядок: *Pseudomonadales*

Родина: *Moraxellaceae*

Рід: *Acinetobacter*

Вид: *sp.*

Штам: B-7005

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Acinetobacter sp. В-7005 є продуцентом етаполану - комплексного екзополісахариду (ЕПС), який використовується як емульгувальний, суспендуючий, стабілізуючий та змінює реологічні характеристики водних систем агент у нафтовидобувній, парфумерно-косметичній та харчовій промисловості [12].

Етаполан має ряд суттєвих переваг перед іншими мікробними екзополісахаридами, що використовуються в процесі видобутку нафти:

1. Його розчини мають вищу в'язкість;
2. Завдяки тому, що в присутності Cu^{2+} та гліцину підвищується в'язкість розчину етаполану, витрата етаполану значно зменшується (в 10 разів у порівнянні з ксантаном), це також призводить до стабілізації розчинів етаполану, подовжуючи термін придатності розчинів.;
3. Наявність одно- та двовалентних катіонів у концентраціях, властивих водній товщі, підвищує в'язкість розчинів етаполану, при цьому в тих же умовах в'язкість більшості полісахаридів знижується;
4. В'язкість розчинів етаполану значно зростає в області низьких швидкостей зсуву;
5. Розчини етаполану мають характеристики, притаманні псевдопластичним рідинам як у деіонізованій воді, так і в присутності солей;
6. Етаполан винятково стійкий до кислотних середовищ, на відміну від більшості інших біополімерів, які розкладаються за 2-5 год в тих же умовах;

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Гіренко М.Д.				Лт.	Арк.
Перевірив		Ключка Л.В.					Аркушів
Реценз.					РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування		
Н. контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.					

7. Етаполан стійкий до нагрівання. З огляду на це можна зробити висновок, що етаполан є універсальним і цілком конкурентоспроможним мікробним екзополісахаридом для нафтової промисловості [13].

Етаполан використовується в нафтодобувній промисловості в якості бурового розчину. Застосування водних бурових розчинів історично одне із перших технологічних рішень у сфері промивки свердловин. Досвід застосування бурових розчинів на водній основі пройшов шлях від використання як промивної рідини технічної води до складних багатокomпонентних систем, отриманих завдяки детальному проектуванню та дослідно-лабораторним дослідженням. В цілому, найпоширенішими буровими розчинами на водній основі, з будь-яких застосовуваних, є наступні: глинисті, полімерні, полімер-глинисті, інгібуючі, соленасичені, а також біополімерні системи. Вплив на проникність привибійної зони пласта буровими розчинами на водній основі залежить, перш за все, від типу і компонентного складу застосовуваних систем [14].

На основі етаполану розроблено спосіб ізоляції притоку пластових вод, який дає змогу при застосуванні 1 т етаполану видобути додатково до 240 т нафти та знизити її обводнення з 84 до 15 % [3].

В Україні видобуток нафти за 2020 рік становив 1,7 млн. тон [15]. Згідно звіту про управління публічного акціонерного товариства «Укрнафта» за 2020 рік, на балансі підприємства перебуває 1813 діючих нафтових свердловин [16]. Для дослідження використаємо для обробки 4,4% свердловин, а саме – 80.

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Для розрахунку річної потреби необхідно дослідити подібні наукові джерела по обробці нафтових свердловин, оскільки розрахунок у цій області промисловості є досить специфічним. Використаємо дані дослідження, які опиралися на патент 1726732A1 SU, де було проведено розрахунок кількості річного об'єму культуральної рідини для свердловин «Охтирконафтогаз», нафтогазовидобувного

управління публічного акціонерного товариства "Укрнафта" [17,4]. Розрахунок річної потреби культуральної рідини за рік будемо проводити за наступною формулою:

$$G (\text{м}^3) = \frac{15000 \times 0,5 \times 80 \times 4}{X_{EPS} \times 1000}, \text{ де}$$

15 000 - необхідна кількість розчину культуральної рідини для обробки однієї нафтової свердловини відповідно за патентом №1726732A1 SU, л;

0,5 - концентрація розчину полісахариду, яким будуть оброблятися свердловини, г/л;

80 – кількість свердловин;

4 – кількість обробок свердловин на рік;

X_{EPS} - концентрація полісахариду в культуральній рідині, г/л;

1000 - перерахунок літрів у м^3 .

Отже,

$$G (\text{м}^3) = \frac{15000 \times 0,5 \times 80 \times 4}{14,4 \times 1000} = 166,95 \text{ м}^3$$

Окрім цього, нам необхідно врахувати втрати, які можуть виникнути в процесі виробництва, вони становлять 20%, отже, з урахуванням втрат річний об'єм культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{к.р. річ}} = 166,95 \times 1,2 = 200,34 \text{ м}^3$$

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби продукту і геометричного об'єму ферментера

1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300.

Ефективний фонд робочого часу $N_{\text{еф}} = 300 \times 24 = 7200 \text{ год.}$

2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 120 + 14 = 134 \text{ (год), де}$$

$T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (4 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (2 год), засів (1 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = N_{\text{эф}} / T_{\text{цф}} = 7200 / 134 = 52,9 \approx 53$$

4. Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{\text{к.р. цикл}} = V_{\text{к.р. річ}} / n_{\text{ц}} = 200,34 / 53 = 3,78 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ із коефіцієнтом заповнення 0,6. Об'єм культуральної рідини становить $V_{\text{к.р.}} = 3,78 \text{ м}^3$.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Біосинтез *Acinetobacter sp. B-7005* для одержання етаполану проходить у ферментері об'єм, якого становить $6,3 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Так робочий об'єм ферментеру становить:

$$V_{\text{роб}} = 6,3 \cdot 0,6 = 3,78 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу (доза) становить 10 % від об'єму поживного середовища. Отже, для одержання $3,78 \text{ м}^3$ культуральної рідини потрібно:

$$V_{\text{роб1}} = 3,78 \cdot 0,1 = 0,378 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати під час культивування бактерій у посівному апараті об'ємом 500 л з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Для засіву посівного апарату (одержання $0,378 \text{ м}^3$ культуральної рідини) необхідно:

$$V_{\text{роб2}} = 0,378 \cdot 0,1 = 0,0378 \text{ м}^3 \text{ посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна одержати у процесі вирощування бактерій у посівному апараті об'ємом $0,05 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6.

$0,0378 \text{ м}^3$ (37,8 л) культуральної рідини можна одержати з використанням

$$V_{\text{роб3}} = 37,8 \cdot 0,1 = 3,78 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Таку кількість посівного одержують культивуванням біологічного агента в інокуляторі об'ємом 5 л.

Для одержання 3,78 л культуральної рідини потрібно мати:

$$V_{\text{роб4}} = 3,78 \cdot 0,1 = 0,378 \text{ л посівного матеріалу}$$

Таку кількість інокуляту можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу етаполану у ферментері об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у чотири етапи.

3.5. Біосинтез цільового продукту

На рис. 1 показано передбачувані схеми синтезу повторюваної одиниці ацильованого полісахариду *Acinetobacter sp*, пов'язані відповідно з гліколітичним і KDPG шляхами катаболізму глюкози. У цих шляхах утворюється АТФ, яка використовується для синтезу моносахаридів і жирних кислот.

1. Витрати енергії на синтез моносахаридів. Один моль АТФ (або його еквівалент) використовується для утворення глюкозо-6-фосфату і один моль використовується для утворення нуклеозид-дифосфат-сахаридів. До складу АП (ацильованого полісахариду) етаполану входять залишки семи нейтральних моносахаридів і залишок глюкуронової кислоти. Для їх синтезу потрібно вісім молекул глюкози. Для синтезу одного моносахаридного компонента АП з глюкози потрібні дві молекули АТФ. Загальна витрата АТФ на синтез моносахаридних компонентів повторюваної одиниці АП і на приєднання цієї одиниці до молекули ЕПС становить $8 \times 2 + 1 = 17$ моль АТФ.

2. Витрати енергії на синтез жирних кислот з ацетил-КоА. Синтез жирних кислот здійснюється таким чином: з ацетил-КоА і CO₂ за допомогою АТФ-залежної реакції утворюється малоніл-КоА, а потім в результаті трьох послідовних реакцій утворюється бутирил-КоА, який взаємодіє з послідовною молекулою малоніл-КоА з утворенням CH₃-(CH₂)₄-CO-SCoA. У наступному повороті циклу утворюється CH₃-(CH₂)₆-CO-SCoA. Таким чином, шляхом послідовної аккреції ацетил-КоА двовуглецевим фрагментом (шляхом взаємодії з малоніл-КоА і подальшої втрати CO₂) синтезуються вищі жирні кислоти у вигляді їх похідних КоА. Отже, синтез лауринової кислоти (C₁₂) вимагає п'яти обертів циклу, а утворення пальмітинової кислоти (C₁₆) вимагає семи обертів циклу. Один моль АТФ використовується на кожному повороті циклу. Таким чином, енерговитрати на синтез складових жирних кислот повторюваної одиниці АП становлять 5 + 7 = 12 моль АТФ [18].

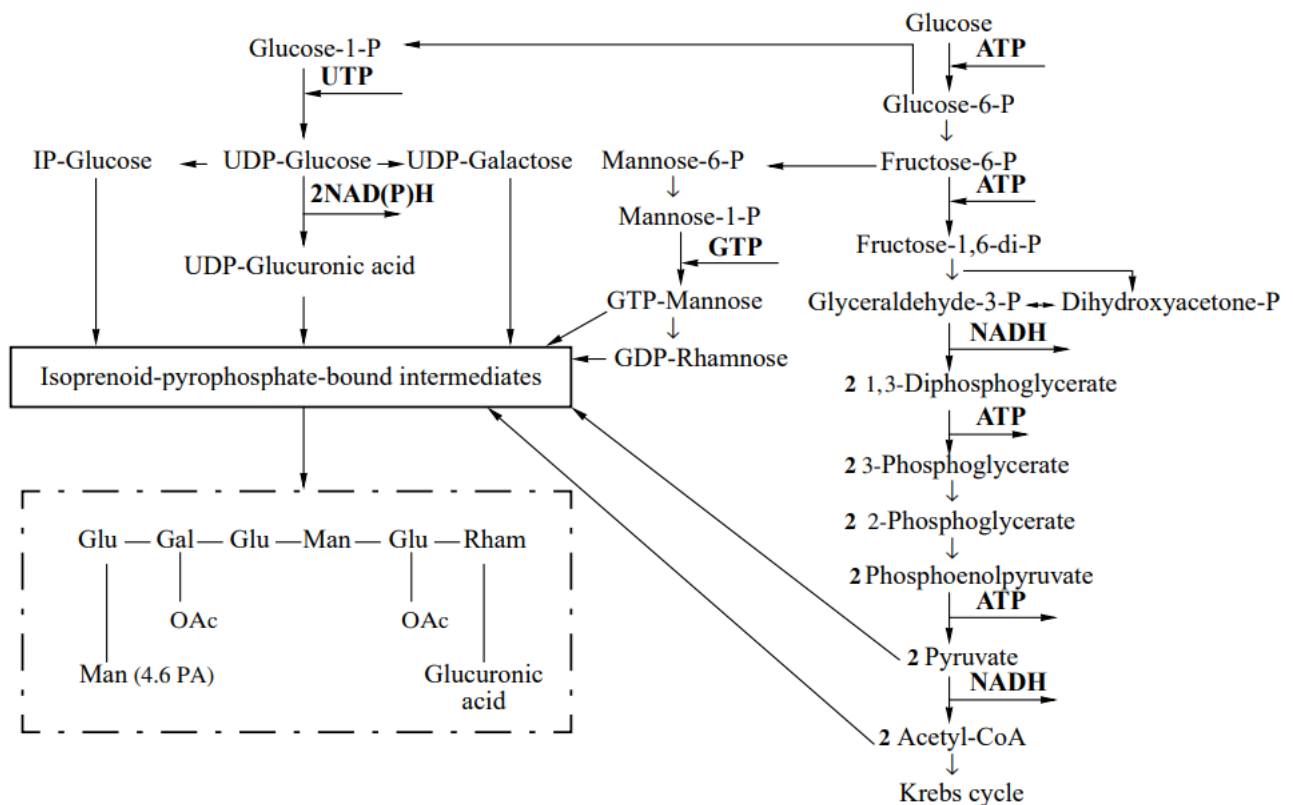


Рис. 3.1. Біосинтез етаполану [18]

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Бактерії роду *Acinetobacter spp.* є хемоорганотрофами з окисним метаболізмом. Здатність використовувати органічні сполуки як джерела енергії та вуглецю непостійна. Оксидази не утворюють, каталазопозитивні. Ацетону, індолу та сірководню не утворюють. В якості джерела енергії використовували моносубстрати, суміш м'яса та соняшникової олії (1,5%). Оптимальна температура для зростання 30-32°C. У дослідженнях, що передбачають приготування суміші ацетату натрію із соняшниковою олією у певних співвідношеннях, під час культивування ацинетобактерій рН середовища знижується до кінця процесу з 7,4 до 5,5, що можливо пов'язано із ацетатом, який під час транспортування до клітин продуцента через симпорт із протоном призводив до підвищення рН культуральної рідини [19]. Але цільове дослідження передбачає склад середовища без використання ацетату, лише із використанням м'яса та олії у об'ємних співвідношеннях 1,5%. Таким чином, зростання чи зниження значення рН не передбачається, синтез бактерій проводиться при значенні рН 7,0 – 8,2 [20]. Суворі аероби, на початку процесу бактерії чутливі до високої концентрації розчиненого O₂, його рівень не повинен перевищувати 20-30%. Культивування триває 120 год. при 320 об/хв. Облігатний аероб, тому потребує інтенсивної аерації під час глибинного культивування [21].

Умови для культивування біологічного агенту створюють ризик контамінації сторонньою мікрофлорою ($t = 30-32^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7-8,2$), тому робимо висновок про необхідність дотримання правил асептики під час усього процесу глибинного культивування.

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ		
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Гіренко М.Д.				Лт.	Арк.
Перевірив		Ключка Л.В.					Аркушів
Реценз.					РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми		
Н. контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					
					Кафедра БТМ		

Культивування *Acinetobacter sp.* В-7005 буде проводитися глибинним способом у аеробних умовах. За таких потреб, ферментер, в якому буде проводитися культивування повинен бути оснащений: барботером для забезпечення необхідного рівня розчиненого кисню; мішалкою для забезпечення перемішування та рівномірного розподілення компонентів; сорочкою для подачі глухої пари, щоб забезпечити стерилізацію та підтримку температури; датчиками вимірювання рН, розчиненого кисню, температури, тиску, рівня, тощо.

Щоб задовольнити річну потребу у цільовому продукті, буде використано ферментер CRT-169 об'ємом 6,3 м³ від фірми Xiamen CRTOP Machine Co., Ltd [22]. Фірма володіє сертифікацією CE, SGE, ISO та ін. Матеріал виготовлення ферментеру CRT-169 - нержавіюча сталь 316L, оснащений турбінної мішалкою, системою подачі повітря із контролем витрати та глибинною аерацією, забезпечено наявність датчиків для контролю наступних параметрів культивування - температура, об/хв, рН, DO, тиск. Конструкційне виконання ферментеру забезпечує стабільний рівень культуральної рідини в ферментері і його асептичний захист при реалізації періодичного режиму ферментації.

Отже, ферментер CRT-169 буде використовуватися для здійснення процесу виробничого культивування *Acinetobacter sp.* В-7005 з метою одержання етаполану.

4.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Acinetobacter sp. В-7005 є облигатним аеробом, тому забезпечення процесу культивування киснем є важливою умовою здійснення процесу. Також необхідною умовою є контролю витрати кисню, оскільки бактерії чутливі до його рівня на початку процесу культивування, його концентрація не має перевищувати 20-30%. Оскільки необхідною умовою культивування є забезпечення асептичності, кисень, що подається, має бути стерильним.

1. **Забір атмосферного повітря.** Повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті 20-30 м, оскільки концентрація мікроорганізмів на цій висоті є стабільною.

2. **Грубе очищення повітря.** Тут повітря звільняється від грубого аерозолі – пилу. Фільтри грубого очищення не тільки захищають компресори від забруднення, а і істотно знижують кількість контамінантів.
3. **Стабілізація термодинамічних показників повітря.** Повітря стискається у турбокомпресорі до 0,35 - 0,5 МПа. Стиснення повітря у компресорі призводить до підвищення його температури до 120-250 °С і збільшенню вмісту вологи на одиницю об'єму. Оскільки осідання вологи на фільтрах є неприпустиме, бо це погіршує осадження часток та створює ризик контамінації, то необхідно забезпечити випадання вологи в краплевловлювачі. Для цього повітря охолоджують до 25-40 °С в теплообмінному апараті. Надалі для забезпечення надійної роботи головного та індивідуальних фільтрів, повітря нагрівають до 70-90 °С. При таких температурах не відбувається конденсація води на волокнах фільтра.
4. **Попередня очистка повітря в головному фільтрі.** Головний фільтр здійснює попереднє очищення від пилу та мікроорганізмів (розмір частинок > 1 мкм). Головний фільтр повітря зазвичай розміщений на території заводу чи цеху, з нього повітря колектором подається в індивідуальні фільтри.
5. **Очистка повітря в індивідуальному фільтрі.** Здійснюється Видалення контамінантів (розмір частинок більше 0,2 мкм). Конструкція індивідуального фільтру залежить від типу використовуваного фільтрувального матеріалу. У процесі експлуатації фільтрів необхідна їх стерилізація, частіше за все це нагрівання вологою парою і витримка впродовж певного часу при 120-130 °С. Після стерилізації фільтрувальний матеріал просушують гарячим повітрям [23].

4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для вирощування *Acinetobacter* sp. В-7005 використовують поживне середовище наступного складу (г/л): KH_2PO_4 — 6,8; KOH — 0,9; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NH_4NO_3 — 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; М'яса — 0,5 об. %. У

середовище додатково вносили 0,5% (об'ємна частка) дріжджового автолізу, а також мультивітамінний комплекс «Комплевіт» в концентрації 0,00085 % (масова частка в перерахунку на пантотенат). Як субстрат використовували: мелясу з об'ємною часткою 0.5% (за вуглеводами) для перших трьох етапів та суміш меляси (1,5%) і соняшникової олії(1,5%) для етапу виробничого біосинтезу.

Стерилізація компонентів поживного середовища проводиться термічним способом в автоклаві. Мелясу стерилізують 30 хв при 112°C, дигідрофосфат калію (K_2HPO_4), нітрат амонію (NH_4NO_3), гідроксид калію (KOH), сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) стерилізують при 131°C, 50 хв. Хлорид кальцію ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) та сульфат магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) стерилізують при 131°C, 50 хв, але окремо, оскільки за умови спільної стерилізації із іншими солями можливе утворення нерозчинного фосфату магнію та кальцію.

Отримане поживне середовище стерилізують в автоклаві при 1,5-2,0 атм, протягом 30 хв із закритими пробками.

Для культивування хемоорганотрофних з окисним метаболізмом бактерій роду *Acinetobacter spp.* підібрані такі умови: температура – 30-32°C, рівень рН – 7,0-8,2, інтенсивність перемішування 320 об/хв, протягом 120 год.

Розраховано, що для виробничого культивування продуцента у ферментері об'ємом 6,3 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 процес одержання посівного матеріалу буде проходити у чотири етапи.

Для вирощування *Acinetobacter sp.* В-7005 використовують поживне середовище наступного складу (г/л): K_2HPO_4 — 6,8; KOH — 0,9; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NH_4NO_3 — 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; Меляса — 1,5 об. %; Соняшникова олія — 1,5 об. %;

Для приготування такого середовища його потрібно розділити на композиції:

Композиція I: дріжджовий автолізат, пантотенат (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв)

Композиція II: дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), нітрат амонію (NH_4NO_3), гідроксид калію (KOH), сульфат заліза ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) стерилізують при 131°C , 50 хв.

Композиція III: хлорид кальцію ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) та сульфат магнію ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) стерилізують при 131°C , 50 хв.

Композиція IV: суміш меляси (1,5%) і соняшникової олії (1,5%), 30 хв при 112°C .

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	BRV 15/15 відцентровий вентилятор BVN з двостороннім забором повітря Виробник: «ВАНСІVAN»; Напруга: 380 В; Швидкість обертів: 800 об/хв; Продуктивність: 18 000 м ³ /год. [24]
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр попередньої очистки ФВК Виробник: «TWE Group»; Клас очистки: G4; Фільтроматеріал: поліестр, мікроскловолокно; Кількість кишень -12; Продуктивність: 8000 м ³ /год; Робочий тиск: 45 Па; Габарити, мм: 1200×600×200. [25]
К-3	Компресор	1	Компресор гвинтовий CompAir L160-7 Виробник: «CompAir»; Продуктивність: 28,4 м ³ /хв; Робочий тиск: 0,75 МПа; Габарити: 2970×2070×2190. [26]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач МТА 5MP2400 Виробник: «Marco Polo»; Продуктивність: 540 м ³ /год; Габарити: 780×735×940.

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ							
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання							
Розробив	Гіренко М.Д.									Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірів	Ключка Л.В.											
Реценз.												
Н. контр.												
Затверд.	Стабніков В.П.				Кафедра БТМ							

			[27]
P-5	Ресивер	1	Ресивер для стисненого повітря РВ6300 Виробник: ТОВ "Ентех Україна"; Об'єм: 6300 л Робочий тиск: 10 бар. [28]
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Пластинчастий теплообмінник IMS В3-020-30 Виробник: «IMS»; Матеріал: Сталь ANSI 304; Кількість панелей – 30; Робочий тиск: 16 бар. [29]
Ф-7	Головний фільтр	1	Панельний фільтр тонкої очистки F7 Виробник: «Еімо»; Клас очистки: F7; Матеріал: хімволокно; Продуктивність: 2800 м3/год; Робочий тиск: 85 Па; Габарити, мм: 595×595×600. [30]
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	1	High performance filter Виробник: «AstroCeb»; Клас очистки: H12 Матеріал: скловолокно; Матеріал прокладки: неопрен, ПУ, силікон, поліхлоропрен; Продуктивність: 3000 м3/год. [31]
I-9	Інокулятор об'ємом 5 л	1	Biostat Cplus RCP-M0 5L Виробник: «Sartorius»; Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304; Датчик рН, тиску, температури, розчиненого кисню. Контроль температури здійснюється за допомогою системи замкнутого циклу з рециркуляційним насосом і теплообмінником для опалення та охолодження. Оснащений сорочкою, 6-лопатевою дисковою мішалкою. Потужність приводу: 0,5 кВт; Габарити, м: 0,9×1,3×0,7. [32]
ІФ-10	Індивідуальний фільтр	1	High performance filter Виробник: «AstroCeb»;

			<p>Клас очистки: H12 Матеріал: скловолокно; Матеріал прокладки: неопрен, ПУ, силікон, поліхлоропрен; Продуктивність: 3000 м3/год. [31]</p>
I-11	Інокулятор об'ємом 50 л	1	<p>Biostat D-DCU 50 L Виробник: «Sartorius»; Датчик рН, тиску, температури, розчиненого кисню. Контроль температури здійснюється за допомогою системи замкнутого циклу з рециркуляційним насосом і теплообмінником для опалення та охолодження. Оснащений сорочкою, барботером, 6-лопатевою дисковою мішалкою. Потужність приводу: 4,2 кВт; Габарити, м: 1,95×2,36×1,57. [33]</p>
Д-12	Дозатор води для інокулятору об'ємом 50 л	1	<p>Дозатор води DOX 30 07055070 Виробник: «Bongart»; Продуктивність: 55 л/год; Потужність: 0,03 кВт; Робочий тиск: 0,5-5 бар. [34]</p>
ВД-13	Ваговий дозатор для інокулятору об'ємом 50 л	1	<p>СВЕДА ДВС-301-50-3 Виробник: «СВЕДА»; Границі дозування: 10-50 кг; Клас точності: від 0,2; Габарити, мм: 805×615×610. [35]</p>
ІФ-14	Індивідуальний фільтр		<p>High performance filter Виробник: «AstroCeb»; Клас очистки: H12 Матеріал: скловолокно; Матеріал прокладки: неопрен, ПУ, силікон, поліхлоропрен; Продуктивність: 3000 м3/год. [31]</p>
I-15	Інокулятор об'ємом 500 л	1	<p>Bioreactor 500 L Виробник: «BIOFLEX»; Оснащений датчиками рН, температури, тиску, розчиненого кисню. Конструкційно оснащений мішалкою,</p>

			<p>сорочкою, барботером; Потужність приводу: 0,75-11 кВт; Частота обертання: 16-1000 об/хв; Габарити, м: 1,00 (внутрішній діаметр) на 0,6 (висота). [36]</p>
Д-16	Дозатор води для інокулятора об'ємом 500 л	1	<p>Дозатор вод TriDOMIX 100 Виробник: «STM Products S.r.l.»; Дозування: до 1000 л; Потужність: 0,06 кВт; Робочий тиск: 5 бар. [37]</p>
ВД-17	Ваговий дозатор для інокулятора об'ємом 500 л	1	<p>Ваговий дозатор ДВС-301-1000-1 Виробник: «СВЕДА»; Границі дозування: до 2000 кг; Клас точності 0,2; Габарити, мм: 1650×1975×3800. [38]</p>
Р-18	Реактор об'ємом 10 л для підготування композиції II	1	<p>Реактор miniPilot 10 л Виробник: «Donau Lab»; Матеріал: боросилікатне скло 3.3; Матеріал рами: нержавіюча сталь; Діапазон температур: -60 до +200 °С; Частота обертів: до 600 об/хв; Оснащений датчиками температури, рН, тиску. Габарити, м: 0,25 (вн. діаметр) × 0,2. [39]</p>
Д-19	Дозатор води для реактору на 10 л	1	<p>Дозатор води DOX 30 07055070 Виробник: «Bongart»; Продуктивність: 55 л/год; Потужність: 0,03 кВт; Робочий тиск: 0,5-5 бар. [34]</p>
ВД-20	Ваговий дозатор для реактору на 10 л	1	<p>СВЕДА ДВС-301-50-3 Виробник: «СВЕДА»; Границі дозування: 10-50 кг; Клас точності: від 0,2; Габарити, мм: 805×615×610. [35]</p>
Р-21	Реактор об'ємом 12 л для підготування композиції IV	1	<p>Реактор 12,5 л Виробник: «Wise Master»; Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304;</p>

			Частота обертів: 25-1500 об/хв; Потужність приводу: 0,25-0,75 кВт; Габарити, м: 0,25×0,2. [40]
Д-22	Дозатор води для реактору на 12 л	1	Дозатор води DOX 30 07055070 Виробник: «Bongart»; Продуктивність: 55 л/год; Потужність: 0,03 кВт; Робочий тиск: 0,5-5 бар. [34]
ВД-23	Ваговий дозатор для реактору на 12 л	1	СВЕДА ДВС-301-50-3 Виробник: «СВЕДА»; Границі дозування: 10-50 кг; Клас точності: від 0,2; Габарити, мм: 805×615×610. [35]
ІФ-24	Індивідуальний фільтр	1	High performance filter Виробник: «AstroCeb»; Клас очистки: Н12 Матеріал: скловолокно; Матеріал прокладки: неопрен, ПУ, силікон, поліхлоропрен; Продуктивність: 3000 м3/год. [31]
Ф-25	Ферментер об'ємом 6,3 м ³	1	Ферментер CRT-169 під замовлення Виробник: «Xiamen CRTOP Machine Co., Ltd»; Матеріал: нержавіюча сталь 316L; Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою, барботером. Датчики контролю рН, тиску, температури, розчиненого кисню. Частота обертів: 8-500 об/хв Потужність приводу: 1,5-45 кВт; Габарити, м: 1,8×2,5. [22]
Д-26	Дозатор води для ферментеру	1	Автоматичний дозатор води SERV_W40 Виробник: «НВП Servo техніка»; Точність дозування: 1,5% Максимальне дозування: 100 000 л; [41]
ВД-27	Ваговий дозатор для ферментеру	1	Ваговий дозатор ДВС-301-1000-1 Виробник: «СВЕДА»;

			<p>Границі дозування: від 500 до 2000 кг; Клас точності 0,2; Габарити, мм: 1650×1975×3800. [38]</p>
P-28	Реактор на 100 л для підготування композиції II	1	<p>Реактор 100 л Виробник: «Промвіт»; Матеріал: сталь AISI 304; Робочий тиск: 1 бар; Мішалка якорного типу; Частота обертів: 900 об/хв; Потужність приводу: 0,75 кВт; Габарити, м: 0,5×0,5. [42]</p>
Д-29	Дозатор води для реактору на 100 л	1	<p>Дозатор води TriDOMIX 100 Виробник: «STM Products S.r.l.»; Дозування: до 1000 л; Потужність: 0,06 кВт; Робочий тиск: 5 бар. [37]</p>
ВД-30	Ваговий дозатор для реактору на 100 л	1	<p>Ваговий дозатор ДВС-301-1000-1 Виробник: «СВЕДА»; Границі дозування: до 2000 кг; Клас точності 0,2; Габарити, мм: 1650×1975×3800. [38]</p>
Н-31	Насос від реактору на 100 л	1	<p>Перистальтичний насос SEKO серії PSH Виробник: «SEKO S.P.A.»; Продуктивність: 120 л/год; [43]</p>
P-32	Реактор на 500 л для підготування композиції IV	1	<p>Реактор хімічний 500 л Виробник: «Wise master»; Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304; Оснащений сорочкою, мішалкою, датчиками контролю температури, тиску, рН. Потужність приводу: 0,75-11 кВт; Габарити, м: 0,8×0,7. [44]</p>
Д-33	Дозатор води для реактору на 500 л	1	<p>Дозатор вод TriDOMIX 100 Виробник: «STM Products S.r.l.»; Дозування: до 1000 л; Потужність: 0,06 кВт; Робочий тиск: 5 бар. [37]</p>

ВД-34	Ваговий дозатор для реактору на 500 л	1	Ваговий дозатор ДВС-301-1000-1 Виробник: «СВЕДА»; Границі дозування: до 2000 кг; Клас точності 0,2; Габарити, мм: 1650×1975×3800. [38]
Н-35	Насос від реактору на 500 л	1	Industrial hose pump JXHIN-32-CI+ABS Plastic-CSM-P Виробник: «BTS Engineering»; Продуктивність: 1,65 м ³ /год; Робочий тиск: 16 бар; Габарити, мм: 722,5×601×514,5. [45]
Р-36	Реактор на 5 л для підготування композиції Ш	1	Скляний хімічний реактор на 5 л із сорочкою Виробник: «UkrChemGroup»; Матеріал: боросилікатне скло 3.3; Матеріал рами: нержавіюча сталь; Датчик температури, рН, тиску. Частота обертів: 25-1500 об/хв; Потужність приводу: 0,25-0,75 кВт; Габарити, м: 0,250×200. [46]

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Здійснюється за допомогою турбокомпресору (ПЗ-1) на висоті 30 м.

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

За допомогою фільтру (Ф-2) грубого очищення повітря затримується пил та крупні частки. Використовується фільтр класу G4 з ефективністю очищення E=90%.

ДР 1.3. Компресіонування

Повітря стискається за допомогою компресора (К-3) з його нагріванням до 120-150 °С та встановленням тиску 0,35 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря

Повітря охолоджується у теплообміннику (Т-4) до температури 25-30 °С, щоб видалити зайву вологу, яка в подальшому може осісти на фільтрах та створити ризик контамінації. Волога видаляється у ресивері (Р-5).

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівають у теплообміннику (Т-6) до 70-90 °С.

ДР 1.6. Попередня очистка повітря в головному фільтрі

Головний фільтр (Ф-7) класу F7 очищує повітря з ефективністю E=99%, затримуючи частки розміром > 1 мкм.

ДР 1.7. Очистка повітря в індивідуальному фільтрі

					НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ			
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Гіренко М.Д.				Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірив		Ключка Л.В.						
Реценз.					РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми			
Н. контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Стабніков В.П.						

Індивідуальний фільтр (ІФ-8) очищує повітря від часток розміром більше 0,2 мкм, E=99,9%, клас фільтру – Н12.

ДР 2. Приготування поживного середовища

ДР 2.1 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,378 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 0,378 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий автолізат	5	1,89	I	171,0466
Вода	-	169,1534		
KH ₂ PO ₄	6,8	2,57	II	102,9854
NH ₄ NO ₃	0,2	0,075		
KOH	0,9	0,34		
Вода	-	100		
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,1	0,038	III	50,188
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	0,15		
Вода	-	50		
Меляса	1 об. %	3,78	IV	53,78
Вода	-	50		
Усього: 0,378 л (378 мл)				

ДР 2.1.1 Приготування і стерилізація композиції I

На технічних терезах зважують 1,89 г дріжджового автолізату. Наважку поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 169,1534 мл води питної. Одержаний розчин композиції I перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно-марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: t = 112 °С, час = 30 хв. (Кт, Км 1.1.1)

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 2,57 г KH_2PO_4 , 0,075 г NH_4NO_3 , 0,34 г КОН. Наважки поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 100 мл води питної. Одержаний розчин композиції II перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно–марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$, час = 50 хв. (Кт, Км 1.1.2)

ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація композиції III.

На технічних терезах зважують 0,038 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 0,15 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл дистильованої води. Одержаний розчин композиції III перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно–марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$, час = 50 хв. (Кт, Км 1.1.3)

ДР 2.1.3. Приготування і стерилізація композиції IV

На технічних терезах зважують 0,00378 мл меляси. Наважку поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл питної води. Одержаний розчин композиції IV перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно–марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 112\text{ }^\circ\text{C}$, час = 30 хв. (Кт, Км 1.1.4)

ДР 2.2 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту в інокуляторі на 5 л.

Для вирощування інокуляту необхідно приготувати 3,78 л поживного середовища. Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу наведений у таблиці 4.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3,78 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 3,78 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий автолізат	5	18,9	I	630,466
Вода	-	611,534		
KH_2PO_4	6,8	25,7	II	1029,854
NH_4NO_3	0,2	0,75		
КОН	0,9	3,4		
Вода	-	1000		
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,38	III	1001,88
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	1,5		
Вода	-	1000		
Меляса	1 об. %	37,8	IV	1037,8
Вода	-	1000		
Усього: 3,7 л (3700 мл)				

ДР 2.2.1 Приготування і стерилізація композиції I

На технічних терезах зважують 18,9 г дріжджового автолізату. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 611,534 мл води питної, перемішують. Одержаний розчин композиції I перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно–марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 112\text{ }^\circ\text{C}$, час = 30 хв. (Кт, Км 1.1.1)

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 25,7 г KH_2PO_4 , 0,75 г NH_4NO_3 , 3,4 г КОН. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 1000 мл води питної. Одержаний розчин композиції II перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно–марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$, час = 50 хв. (Кт, Км 1.2.2)

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація композиції III

На технічних терезах зважують 0,38 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 1,5 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 1000 мл дистильованої води. Одержаний розчин композиції III перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно-марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 131^\circ\text{C}$, час = 50 хв. (Кт, Км 1.2.3)

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація композиції IV

На технічних терезах зважують 0,0378 мл меляси. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 1000 мл питної води. Одержаний розчин композиції IV перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно-марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 112^\circ\text{C}$, час = 30 хв. (Кт, Км 1.2.4)

ДР 2.3 Приготування поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 50 л. Вміст компонентів для отримання 37,8 л поживного середовища аналогічного складу наведено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 37,8 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 37,8 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий автолізат	5	189	I	33 304,66
Вода	-	33 115,34		
KH_2PO_4	6,8	257	II	1298,54
NH_4NO_3	0,2	7,5		
KOH	0,9	34		
Вода	-	1000		
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	3,8	III	1018,8
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	15		
Вода	-	1000		
Меляса	1 об. %	378	IV	1378
Вода	-	1000		
Усього: 37 л (37 000 мл)				

ДР 2.3.1 Приготування і стерилізація композиції I

189 г дріжджового автолізату завантажують у інокулятор на 50 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають 33 115,34 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10 ± 1 хвилин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра (Кт, Км 1.3.1) починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У сорочку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара.

ДР 2.3.2 Приготування і стерилізація композиції II

На технічних терезах зважують 257 г KH_2PO_4 , 7,5 г NH_4NO_3 , 34 г КОН. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 1000 мл води питної. Одержаний розчин композиції II перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно-марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 131$ °С, час = 50 хв. (Кт, Км 1.3.2).

ДР 2.3.3 Приготування і стерилізація композиції III

На технічних терезах зважують 3,8 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 15 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 1000 мл дистильованої води. Одержаний розчин композиції III перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно-марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 131$ °С, час = 50 хв. (Кт, Км 1.3.3).

ДР 2.3.4. Приготування і стерилізація композиції IV

На технічних терезах зважують 0,378 мл меляси. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 1000 мл питної води. Одержаний розчин композиції IV перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно-марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 112$ °С, час = 30 хв. (Кт, Км 1.3.4)

ДР 2.4 Приготування поживного середовища для вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 500 л. Вміст компонентів для отримання 378 л поживного середовища аналогічного складу наведено в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 378 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 378 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий автолізат	5	1890	I	359 046,6
Вода	-	357 153,4		
KH ₂ PO ₄	6,8	2570	II	7985,4
NH ₄ NO ₃	0,2	75		
KOH	0,9	340		
Вода	-	5000		
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,1	38	III	1188
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,4	150		
Вода	-	1000		
Меляса	1 об. %	3 780	IV	9 780
Вода	-	6 000		
Усього: 378 л (378 000 мл)				

ДР 2.4.1 Приготування і стерилізація композиції I

1890 г дріжджового автолізату через об'ємно-ваговий дозатор завантажують у інокулятор на 500 л. Відкривають вентиль подачі води питної і подають 357 153,4 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10±1 хвилин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра (Кт, Км 1.4.1) починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У сорочку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара.

ДР 2.4.2 Приготування і стерилізація композиції II

За допомогою вагового дозатору зважують 2570 г KH_2PO_4 , 7,5 г NH_4NO_3 , 34 г КОН. Наважки поміщають у реактор об'ємом 10 л, додають 5 000 мл води питної, перемішують, стерилізують при $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$ (50 хв). (Кт, Км 1.4.2).

ДР 2.4.3 Приготування і стерилізація композиції III

На технічних терезах зважують 38 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 150 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2000 мл, додають 1000 мл дистильованої води. Одержаний розчин композиції III перемішують у колбі, колбу закривають за допомогою ватно–марлевого корка, та проводять стерилізацію в автоклаві за таких показників: $t = 131\text{ }^\circ\text{C}$, час = 50 хв. (Кт, Км 1.4.3).

ДР 2.4.4. Приготування і стерилізація композиції IV

За допомогою вагового дозатору зважують 3,78 л меляси. Наважку поміщають у реактор об'ємом 12 л, додають 6000 мл питної води, перемішують, стерилізують при $t = 112\text{ }^\circ\text{C}$ (30 хв). (Кт, Км 1.4.4)

ДР 2.5 Приготування поживного середовища для виробничого культивування у ферментері об'ємом 6,3 м³ (6300 л). Виробниче культивування проводять у ферментері об'ємом 6,3 м³, для чого готують 3780 л середовища складу, наведеного у таблиці 4.6.

ДР 2.5.1 Приготування і стерилізація композиції I

18 900 г дріжджового автолізату завантажують у інокулятор на 6,3 м³. Відкривають вентиль подачі води питної і подають 3 372 934 л води. Вмикають мішалку і проводять перемішування протягом 10 ± 1 хвилин. Після цього починають процес стерилізації подачею гострої пари через нижній спуск апарату. Після досягнення тиску усередині апарату 0,05 МПа за показниками манометра (Кт, Км 1.5.1) починають відлік часу стерилізації. Процес стерилізації триває 30 хв при температурі 112 °С. У сорочку апарату для зменшення енерговтрат подається глуха пара.

ДР 2.5.2 Приготування і стерилізація композиції II

За допомогою вагового дозатору зважують 25 700 г KH_2PO_4 , 750 г NH_4NO_3 , 3 400 г KOH . Наважки поміщають у реактор об'ємом 100 л, додають 50 000 мл води питної, перемішують, і стерилізують при $t = 131^\circ\text{C}$ (50 хв). (Кт, Км 1.5.2).

Таблиця 4.6

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3780 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента в 3780 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Дріжджовий автолізат	5	18 900	I	3 391 866
Вода	-	3 372 934		
KH_2PO_4	6,8	25 700	II	79 854
NH_4NO_3	0,2	750		
KOH	0,9	3 400		
Вода	-	50 000		
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	380	III	3880
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	1 500		
Вода	-	2000		
Меляса	1,5 об. %	56 700	IV	313 400
Соняшникова олія	1,5 об. %	56 700		
Вода	-	200 000		
Усього: 3 789 л (3 789 000 мл)				

ДР 2.5.3 Приготування і стерилізація композиції III

За допомогою вагового дозатору зважують 380 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 1 500 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у реактор 5 л, додають 2000 мл дистильованої води, перемішують, і стерилізують при $t = 131^\circ\text{C}$ (50 хв). (Кт, Км 1.5.3).

ДР 2.5.4. Приготування і стерилізація композиції IV

За допомогою вагового дозатору зважують 56, 700 л меляси та 56, 700 л соняшникової олії. Наважку поміщають реактор об'ємом 500 л, додають 200 000 мл питної води, перемішують, стерилізують при $t = 112^\circ\text{C}$ (30 хв). (Кт, Км 1.5.4)

ДР 2.6. Приготування запасних розчинів

ДР 2.6.1. Приготування запасного розчину пантотенату

Мультивітамінний комплект «Комплевіт» необхідний в концентрації 0,00085%, він є джерелом пантотенату. Вміст однієї капсули (концентрація пантотенату кальцію у одній капсулі – 25 мг) розчиняються у 50 мл дистильованої води, та стерилізують вологим жаром за температури 112 °С, при тиску 0,5 атм протягом 30 хв.

ДР 2.6.2. Приготування запасного розчину $FeSO_4 \times 7H_2O$

Таблиця 4.7

Розрахунок вмісту $FeSO_4 \times 7H_2O$ у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст $FeSO_4 \times 7H_2O$
3,78	3,78 мг
37,8	37,8 мг
378	378 мг
3 780	3,78 г

На технічних терезах зважуються 4,2 г $FeSO_4 \times 7H_2O$. Наважку розчиняють у 50 мл дистильованої води у колбі, та стерилізують у автоклаві при $t = 131$ °С (50 хв).

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Acinetobacter* sp. ІМВ В–7005 зберігають у пробірці, яка містить скошений щільний агаризоване середовище (МПА – м'ясо–пептонний агар), у темряві при температурі 4 ± 2 °С. Пересіви на свіже поживне середовище виконують 1-2 рази на місяць. Усі маніпуляції з колекційною культурою виконуються виключно в асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури

Для отримання ізольованих колоній, колекційну культуру пересівають методом виснажувального штриха на чашку Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА). Культивують отримані колонії в термостаті при температурі $t = 30 \pm 1$ °С протягом 48 годин.

ТП 3.3. Вирощування інокуляту на агаризованих поживних середовищах

Ізольовані колонії, отримані з чашки Петрі (від ТП 5.2), пересівають петлею в пробірки, які містять скошений м'ясо–пептонний агар (МПА). Для засіву однієї пробірки використовується одна ізольована колонія. При цьому ізольовані колонії пересівають в пробірки на відстані не менше 1 см одна від одної. Культивують ці пробірки в термостаті при температурі $t = 30 \pm 1$ °С протягом 24 годин.

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 5 л з стерильною композицією I (від ДР 1.1.1) зливають простерилізовані композиції II, III, IV (від ДР 1.1.2–1.1.4), перемішують і розливають по 150 мл у качалочні колби об'ємом 750 мл. У пробірку з робочою культурою *Acinetobacter sp.* ІМВ В–7005 (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (320 об/хв) при $t = 30 \pm 1$ °С (24 год). (Кт, Км 5.4).

ТП 3.5. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 5 л

В боксі в асептичних умовах у спеціальний балон для асептичної передачі зливають дріжджовий автолізат і пантотенат (від ДР 1.2.1), перемішують і отриманий розчин асептично через конектор передають у інокулятор з розчином солей (від ДР 1.2.2). Вмикають перемішуючий пристрій і доводять 6%–м розчином КОН рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Через засівну колбу вносять 5 л посівного матеріалу від ТП 5.4. Культивують до концентрації біомаси 3,7 г/л при $t = 30 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і постійною аерацією (значення $pO_2 = 20\text{--}30$ % від насиченого повітря) впродовж 16 год. (Кх, Кт, Км 5.5).

ТП 3.6. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 50 л

Охолоджений до кімнатної температури розчин дріжджового автолізату і пантотенату (композиція І) від ДР 1.3.1 асептично перекачують у інокулятор об'ємом 50 л, у якому міститься стерильний розчин солей тієї ж температури від ДР 1.3.2, 1.3.3 та меляси від 1.3.4. та доводять рівень рН до рН=7 стерильним розчином КОН. Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з інокулятора (від ТП 5.3) через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 ± 1 °С, швидкість перемішування – 320 об/хв, час вирощування – 16 год., з постійною аерацією, до концентрації біомаси 3,7 г/л. (Кх, Кт, Км 5.5).

ТП 3.7. Вирощування культури у посівному апараті об'ємом 500 л

Охолоджений до кімнатної температури розчин дріжджового автолізату і пантотенату (композиція І) від ДР 1.4.1 асептично перекачують у посівний апарат об'ємом 500 л, у якому міститься стерильний розчин солей тієї ж температури від ДР 1.4.2, 1.4.3 та меляси від 1.4.4. та доводять рівень рН до рН=7 стерильним розчином КОН. Засів проводиться перетискуванням стерильним стисненим повітрям посівного матеріалу з інокулятора (від ТП 5.3) через трубу перетискання до посівного апарату. Процес культивування ведуть за наступних умов: температура – 30 ± 1 °С, швидкість перемішування – 320 об/хв, час вирощування – 16 год., з постійною аерацією, до концентрації біомаси 3,7 г/л. (Кх, Кт, Км 5.5).

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1. Виробничий біосинтез (отримання культуральної рідини)

У попередньо простерилізований ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ перекачують простерилізоване поживне середовище (від ДР 1.5.1, 1.5.2, 1.5.3). За допомогою відцентрового насосу з магнітною муфтою в ферментер з реактора–змішувача подають соняшникову олію та мелясу від ДР 1.5.4.. Вмикають перемішувач і доводять 6%–м розчином КОН рН середовища за показником датчика рН до 7,0. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора інокулят від ТП 5.6.

Культивують до концентрації полісахариду етаполану та біомаси 10,4 і 7,3 г/л, відповідно, при $t = 30 \pm 1$ °С з частотою обертів перемішуючого пристрою 320 об/хв і постійною аерацією (значення $pO_2 = 20\text{--}30$ % від насиченого повітря) впродовж 33 год. (Кх, Кт, Км 6.1)

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів та процесу виробничого біосинтезу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кт, Км 1.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції I</i>	Композиція I - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів.	- Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль	Протягом усієї стерилізації: - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: - Відсутність сторонніх мікроорганізмів	- Тиск 0,05 МПа; - Температура 112 °С; - Час 30 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 1.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції I</i>	Композиція II - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів.	- Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль	Протягом усієї стерилізації: - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: - Відсутність сторонніх мікроорганізмів	- Тиск 0,15 МПа; - Температура 131 °С; - Час 40 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 1.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції I</i>	Композиція III - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів.	- Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль	Протягом усієї стерилізації: - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: - Відсутність сторонніх мікроорганізмів	- Тиск 0,15 МПа; - Температура 131 °С; - Час 40 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 2.1.1 <i>Приготування і стерилізація</i>	Композиція I - Тиск; - Температура;	- Манометр; - Термометр; - Годинник;	Протягом усієї стерилізації: - Тиск;	- Тиск 0,05 МПа; - Температура 112 °С;

НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ				
Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата
Розробив		Гіренко М.Д.		
Перевірів		Ключка Л.В.		
Реценз.				
Н. контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва				
			Лт.	Арк.
			Аркушів	
Кафедра БТМ				

<i>композиції I</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Мікробіологічний контроль 	<ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Час 30 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 2.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції II</i>	Композиція II <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль 	Протягом усієї стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Тиск 0,15 МПа; - Температура 131 °С; - Час 40 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 2.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції III</i>	Композиція III <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль 	Протягом усієї стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Тиск 0,15 МПа; - Температура 131 °С; - Час 40 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 3.1.1 <i>Приготування і стерилізація композиції I</i>	Композиція I <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль 	Протягом усієї стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Тиск 0,05 МПа; - Температура 112 °С; - Час 30 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт Км 3.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції II</i>	Композиція II <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль 	Протягом усієї стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Тиск 0,15 МПа; - Температура 131 °С; - Час 40 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 4.1.1 <i>Приготування</i>	Композиція I <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; 	<ul style="list-style-type: none"> - Манометр; - Термометр; 	Протягом усієї стерилізації:	<ul style="list-style-type: none"> - Тиск 0,05 МПа; - Температура 112

<i>і стерилізація композиції I</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Годинник; - Мікробіологічний контроль 	<ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> °С; - Час 30 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 4.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції II</i>	Композиція II <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Час протягом якого відбувається стерилізація; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Манометр; - Термометр; - Годинник; - Мікробіологічний контроль 	Протягом усієї стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Тиск; - Температура; - Засікається час. Після завершення стерилізації: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Тиск 0,15 МПа; - Температура 131 °С; - Час 40 хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кт, Км 5.4. <i>Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал <ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Тривалість вирощування (час); - Частота обертів качалки; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів. 	<ul style="list-style-type: none"> - Термометр; - Годинник; - Тахометр; - Мікробіологічний контроль 	Протягом усього процесу культивування у колбах на качалках: <ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Засікається час; - Автоматично контролюється частота обертів. Після завершення культивування: <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Температура 30±1 °С; - Час 24 год; Швидкість обертання качалок 320 об/хв; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кх, Кт, Км 5.5. <i>Вирощування культури у інокуляторі.</i>	Поживне середовище в інокуляторі, посівний матеріал <ul style="list-style-type: none"> - рН - Температура; - Тривалість вирощування (час); - Частота обертів; - Швидкість та кратність подачі повітря; - Надлишковий тиск; - Мікробіологічна чистота культури та морфологічна відповідність 	<ul style="list-style-type: none"> - Датчик рН; - Термометр; - Годинник; - Тахометр; - Витратомір; - Манометр; - Мікробіологічний контроль 	При змішуванні всіх компонентів поживного середовища у інокуляторі визначають: <ul style="list-style-type: none"> - рН; Протягом усього процесу культивування у інокуляторі: <ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Засікається час; - Автоматично контролюється частота обертів; - Автоматично контролюється 	<ul style="list-style-type: none"> - рН 7; - Температура; 30±1 °С; - Час 16 год; - Частота обертів 320 об/хв; - Подача кисню 20–30 %; - Надлишковий тиск 0,02 МПа; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів

	організмів		подача повітря; Після завершення культивування: - Відсутність сторонніх мікроорганізмів	
Кх, Кт, Км 5.6. <i>Вирощування культури у посівному апараті</i>	<p>Поживне середовище в інокуляторі, посівний матеріал</p> <p>-рН</p> <ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Тривалість вирощування (час); - Частота обертів; - Швидкість та кратність подачі повітря; - Надлишковий тиск; - Мікробіологічна чистота культури та морфологічна відповідність організмів 	<ul style="list-style-type: none"> - Датчик рН; - Термометр; - Годинник; - Тахометр; - Витратомір; - Манометр; - Мікробіологічний контроль 	<p>При змішуванні всіх компонентів поживного середовища у інокуляторі визначають:</p> <ul style="list-style-type: none"> - рН; <p>Протягом усього процесу культивування у інокуляторі:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Засікається час; - Автоматично контролюється частота обертів; - Автоматично контролюється подача повітря; <p>Після завершення культивування:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Відсутність сторонніх мікроорганізмів 	<ul style="list-style-type: none"> - рН 7; - Температура; 30±1 °С; - Час 16 год; - Частота обертів 320 об/хв; - Подача кисню 20–30 %; - Надлишковий тиск 0,02 МПа; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів
Кх, Кт, Км 6 <i>Виробниче культивування</i>	<p>Поживне середовище в ферментері, культуральна рідина</p> <p>-рН</p> <ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Тривалість вирощування (час); - Частота обертів; - Швидкість та кратність подачі повітря; - Надлишковий тиск; - Мікробіологічна чистота культури та морфологічна відповідність організмів; 	<ul style="list-style-type: none"> - Датчик рН; - Термометр; - Годинник; - Тахометр; - Витратомір; - Манометр; - Мікробіологічний контроль; - ФЕК 	<p>При змішуванні всіх компонентів поживного середовища у ферментері визначають:</p> <ul style="list-style-type: none"> - рН; <p>Протягом усього процесу культивування у інокуляторі:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Температура; - Засікається час; - Автоматично контролюється частота обертів; - Автоматично контролюється подача повітря; <p>Після завершення</p>	<ul style="list-style-type: none"> - рН 7; - Температура; 30±1 °С; - Час 16 год; - Частота обертів 320 об/хв; - Подача кисню 20–30 %; - Надлишковий тиск 0,02 МПа; - Відсутність сторонніх мікроорганізмів; - Концентрація клітин - <i>Acinetobacter sp.</i> 10,4 ·10¹⁰ КУО/мл; - Концентрація етаполану 14,4

	- Концентрація клітин <i>Acinetobacter</i> sp. B-7005; - Концентрація цільового продукту.		культивування: - Відсутність сторонніх мікроорганізмів; - Відбір проб культуральної рідини кожні 4 год.	г/л.
--	--	--	---	------

7.2. Мікробіологічний контроль

Переглянути культивування бактерії *Acinetobacter* sp. B-7005 для отримання етагополану проводиться в стерильних умовах, необхідно проводити мікробіологічний контроль на всіх етапах, щоб переконатися, що немає контамінації.

Зразки культуральної рідини відбирали з інокулята та ферментера кожні 8 годин для аналізу. Мікробний контроль проводили двома способами: прямим посівом на агаризовані поживні середовища та мікроскопічним дослідженням.

Пряма інокуляція відбувається шляхом посіву ізольованих колоній культури на чашки Петрі, що містять м'ясо-пептонний агар для бактерій і глюкозно-картопляний агар або сусло-агар для грибів і дріжджів.

Мікроскопію проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препаратів асептично нанесіть невелику краплю культури на чисте, знежирене предметне скло за допомогою стерильної петлі. Використовуйте бактеріальну петлю, щоб розподілити краплі, що містять мікроби, на склі (мазок діаметром приблизно 1 см). Мазки висушували при кімнатній температурі без нагрівання до повного випаровування води. Потім за допомогою скляної палички нанесіть 1-2 краплі імерсійної олії на повністю сухий препарат. Після закінчення роботи ватою, змоченою в спирті, видаліть залишки масляних плям на кузовному дзеркалі.

За відсутності чужорідної мікробіоти у зразку клітини *Acinetobacter* були видні під мікроскопом. Бактерії розташовані парами (диплоїди) або невеликими ланцюжками і мають паличкоподібну форму (короткі палички) під час фази

експоненціального росту та кокосову форму, коли нерухомі. Клітини розміром 0,95–1,5×1,2–2,0 мкм, нерухомі, неспороутворюючі, грамнегативні [48].

7.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.3.1. Концентрація біомаси

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії у спектрофотометрі з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин (АСБ) у відповідності з калібрувальним графіком. Ефективність трансформації вуглецю субстратів в ЕПС оцінюють за такими показниками: кількість синтезованих ЕПС і ЕПС-синтезувальна здатність. Кількість синтезованого полісахариду встановлюють ваговим методом. ЕПС-синтезувальну здатність розраховують як відношення кількості синтезованого ЕПС до біомаси та виражають у г ЕПС/ г АСБ [48].

7.3.2. Концентрація джерела вуглецю та азоту

Для визначення вмісту вуглеводів у мелясі застосовується високоефективна рідинна хроматографія, а саме рідинна хроматографія. Інструментарій для аналізу включає хроматограф з модулем для розчинника (модель 240), модулем для установки колонки (модель 500), колонкою Shodex KS–801, яка розділяє вуглеводи за молекулярною масою, інфрачервоним датчиком (модель 350) та програмним забезпеченням версії 5.0. Робоча температура колонки встановлена на рівні 80 °С. В якості рухомої фази використовується ультрачиста вода зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв.

Концентрації стандартних зразків вуглеводів (відповідних визначуваним цукрам вуглеводам аналітичної чистоти) складають 1 г/л та 5 г/л. Введення зразків здійснюється у кількості 15 мкл. Розрахунок концентрацій проводиться за допомогою відношення кривих стандартних концентрацій до площі піків. Загальна кількість вуглеводів визначається як сума окремих концентрацій. [48].

7.2.3. Концентрація цільового продукту

Кількість синтезованого етаполану визначали ваговим методом. Для цього до 10 см³ культуральної рідини:

- 1) Додавали 1,5–2 об'єми ізопропанолу;
- 2) Осад ЕПС промивали чистим ізопропанолом і висушували при кімнатній температурі упродовж 24 год;
- 3) ЕПС-синтезувальну здатність визначали як відношення концентрації ЕПС до концентрації біомаси (г ЕПС/г АСБ) [48].

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місцях емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Біотехнологічне виробництво етаполану передбачає утворення рідких, твердих та газоподібних відходів на різних етапах. Проаналізуємо технологічну схему, щоб визначити місця утворення відходів. Таким чином:

- Рідкі відходи – залишки культуральної рідини; розчини миючих засобів, які використовують для миття обладнання; оборотна вода; конденсат.
- Газоподібні відходи – відпрацьоване повітря, що використовувалося для аерації культурального середовища під час вирощування біологічного агенту. Таке повітря може містити клітини продуцента та летючі речовини; відпрацьовані гази, які утворюються внаслідок життєдіяльності мікроорганізмів;
- Тверді відходи – біомаса мікроорганізмів.

Зм	Арк	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 05.01.22 КР ПЗ			
Розробив		Гіренко М.Д.			РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля	Лт.	Арк.	Аркушів
Перевірів		Ключка Л.В.						
Реценз.								
Н. контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						
						Кафедра БТМ		

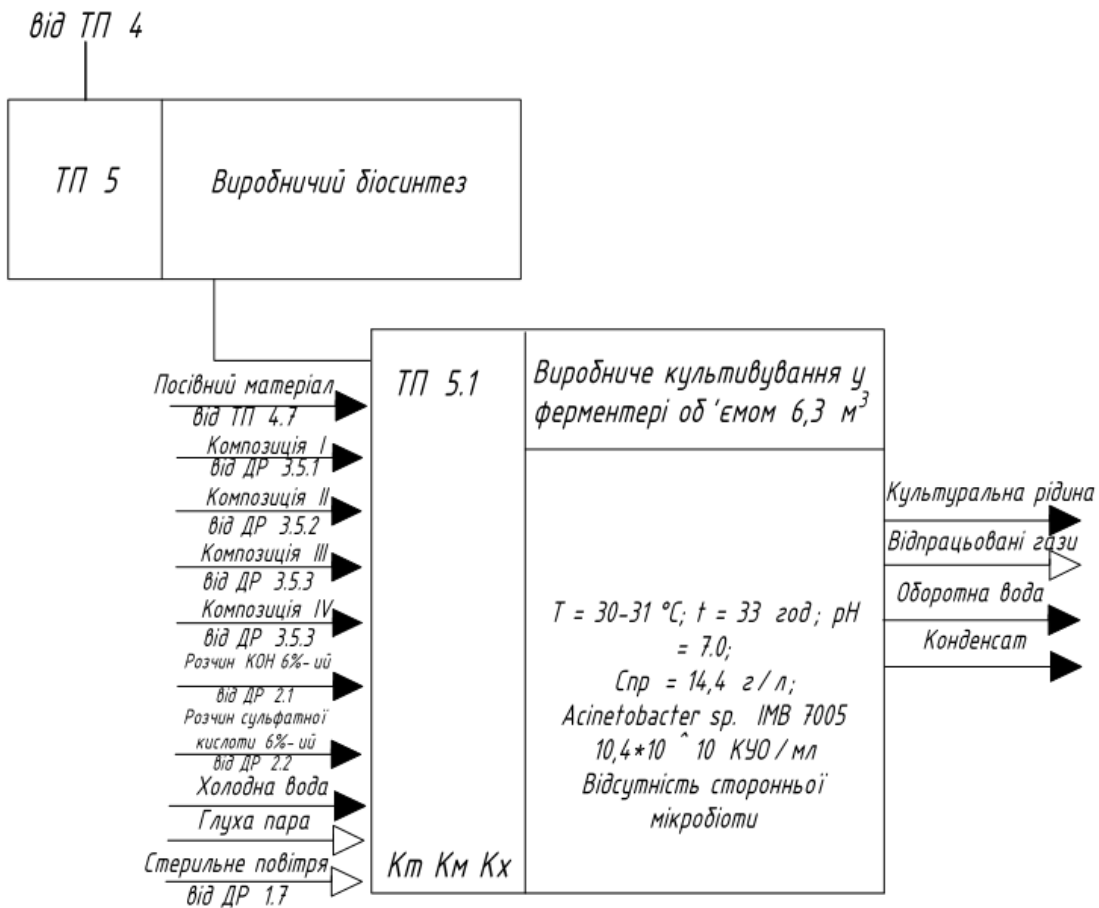


Рис. 8.1. Фрагмент етапу технологічної схеми, де утворюються відходи

8.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Біосорбційна технологія очищення води втілена у біологічних фільтрах з легким плаваючим завантаженням із закріпленою на ньому біомасою. Її ефективність обумовлена протіканням ряду технологічних процесів: фільтрування з поступовим закупорюванням пор твердими нерозчинними частками забруднень, які затримуються у вільному просторі між гранулами завантаження; сорбція, в основному, розчинених забруднень, біоценозом біологічної плівки; біологічні ферментативні процеси деструкції органічних забруднень та накопиченої біомаси.

Слід відзначити вирішальну роль у очищенні води за вказаною технологією саме сорбційних процесів. За короткий час перебування у апараті, який не перевищує 20...60 хв., вода позбувається 90...95% розчинених органічних

забруднень. Експериментально встановлено, що протягом 15 с до 85% розчинених органічних забруднень мігрує з води до біомаси. Аналіз біомаси, яка вимивається з фільтра, свідчить про те, що від 75 до 79% знешкоджених забруднень залишаються неокисленими, тобто процеси біологічної деструкції не встигають завершитись за цикл роботи апарату. Величина питомої сорбції для процесу повного біологічного очищення господарсько-побутових стічних вод, як свідчать розрахунки, становить 1,5...1,8 гБПК/г активної біомаси, константа розподілення 2500...3400.

Процес фільтрування практично відбувається при постійній швидкості, яка підтримується при збільшенні діючого тиску шару води, який повинен компенсувати зростання опору осаду, що накопичується між порами, яке становить 1,0...1,5 м водяного стовпа. Слід відзначити, що біомаса частково вимивається під час промивання біофільтра, а ступінь її окислення внаслідок скорочення тривалості циклу умовами фільтрування не перевищує 30%. Інтенсивність вимивання завантаження не перевищує 10 л/с на 1 м² і регулюється з урахуванням фільтрувальних властивостей та потреб збереження активності біоценозу.

Технологія біосорбційно – фільтраційного (БІОСОФ) глибокого очищення стічних вод застосовується для знешкодження органічних за природою забруднень стічних вод.

Для очищення стічних вод технологія має декілька ступенів. Накопичування та усереднення стічних вод забезпечується в резервуарі-акумуляторі, який, залежно від конкретних умов, може виконувати функції попереднього відстоювання, біокоагуляції, аерації. На очисну установку стічні води подаються з постійною витратою через розподільну камеру, яка забезпечує також рециркуляцію частини очищеної води через гідравлічний регулятор витрати. Якість очищеної води відповідає вимогам скиду до водойми за БПК, яке не перевищує 3...6 мг/л. Перед скидом вода проходить знезараження, зокрема, в проточному електролізері. Можливе спрямування очищених вод у природні ставки, на підґрунтову фільтрацію, у фільтраційні канали тощо [49].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації газоповітряних відходів

Найбільшого поширення для очищення газів в промисловості отримали циклони. Виділення пилу в циклонах відбувається під дією відцентрових сил, що виникають внаслідок обертання газової течії в корпусі апарата. Основні частини циклону, незалежно від їх конструктивних особливостей, зображені на рис. 1.3.

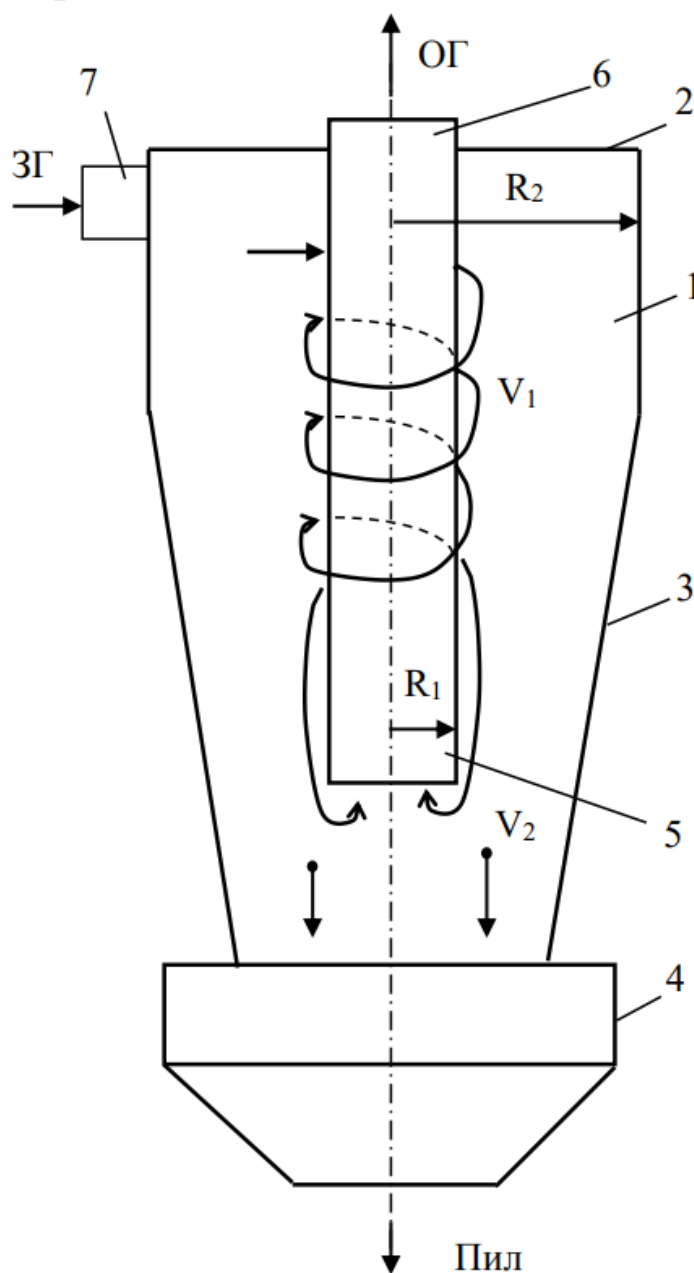


Рис. 8.2. Будова циклону [50]

Запилений газ надходить в циклон по тангенціальному патрубку 7, в результаті чого він отримує обертовий рух. Після виконання двох чи трьох обертів в кільцевій щілині між корпусом 1 та центральною трубою 5 виткоподібно опускається вниз. Причому в конусній частині 3 апарата внаслідок зменшення діаметра швидкість обертання течії збільшується ($V_2 > V_1$). Під дією відцентрової сили частинки пилу відкидаються до стінок циклону. Завдяки цьому основна маса частинок пилу зосереджується в течії газу, що рухається безпосередньо біля стінок апарата. Цей потік направляє в нижню конічну частину корпусу 3. Частинки пилу при цьому потрапляють в пилозбірник 4. Очищений газ після виконання крутого розвороту по центральній трубі 5 виводиться з апарата [50].

8.2.3. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Практично всі види "сирої" біомаси досить швидко розкладаються, тому мало придатні для довготривалого зберігання. Через відносно низьку енергетичну щільність транспортування біомаси на великі відстані недоцільна. Тому в останні роки значні зусилля були зроблені для пошуків оптимальних методів її використання. Методи отримання енергії з біомаси ґрунтуються на наступних процесах: пряме спалювання біомаси; термохімічне перетворення для отримання збагаченого палива. Процеси цієї категорії включають піроліз, газифікацію і скраплення; біологічне перетворення. Такі природні процеси, як анаеробне зброджування і ферментація призводять до утворення корисного газоподібного або рідкого палива. У деяких з перерахованих процесів побічним продуктом є тепло. Воно зазвичай використовується на місці утворення або на невеликому видаленні для теплопостачання, в хімічних процесах або для виробництва пари і подальшого отримання електроенергії. Основним продуктом процесів є тверде, рідке або газоподібне паливо: деревне вугілля, замітники або добавки до бензину, газ для продажу або виробництва електроенергії з використанням парових або газових турбін. Серед біологічних способів переробки біомаси особливу увагу привертає

здатність різних груп фотосинтезуючих організмів утворювати водень, а також утворення водню в процесах за умов відсутності кисню в середовищі [51].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т.П., Корж Ю.В. Етаполан – мікробний екзополісахарид мультифункціонального призначення. – К.: Інститут мікробіології і вірусології НАН України. – 31 с.
2. Grinberg, T. A., Pirog, T. P., & Braudo, E. E. (2000). Ethapolan-an amphiphilic microbial exopolysaccharide. *Developments in Food Science*, 331–359. doi:10.1016/s0167-4501(00)80015-1
3. *В.А. Аверкієв*. Підвищення ефективності первинного розтину продуктивних пластів біополімерними розчинами. Томський політехнічний інститут. -2022.
4. Mykola Ivakhniuk, Tetyana Pirog. Comparative characteristics of ethapolan and xanthan exopolysaccharides as agents for the increasing secondary oil extraction. *Microbiology, Biotechnology. Ukrainian Journal of Food Science*. 2018. Volume 6. Issue 1: 62-71. 10.24263/2310-1008-2018-6-1-9
5. Grinberg T.A., Pirog T.P., Malashenko Yu.R., Vlasov S.A. Ethapolan: A New Microbial Exopolysaccharide for Oil Industry // *Energy & Fuels*. – 1995. – Vol.9, № 6.– P. 1086-1089.
6. Пирог Т.П. Принципи регуляції складу та фізико-хімічних властивостей екзополісахаридів, синтезованих *Acinetobacter* sp. – Дис. докт. біол. наук. – К.: Інститут мікробіології та вірусології НАН України, 1999. – 450 с
7. Буценко, Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посібник / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – К.:НУХТ, 2010. – 323 с.
8. 5. Characterization of plant growth promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum* / F. Rokhbakhsh-Zamin, D. Sachdev, N. Kazemi–Pour [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 21, № 6. — P. 556–566.
9. 6. Gene-Silencing Antisense Oligomers Inhibit *Acinetobacter* Growth In Vitro and In Vivo / B.L. Geller, K. Marshall-Batty, F.J. Schnell [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2013. — Vol. 208, № 10. — P. 1553–1560.

10. Т. П. Пирог, Ю. В. Кузьмінська Вплив умов культивування мікроорганізмів — продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості. — К.:НУХТ, 2013. — №5.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. URL: <http://www.bergeys.org/outlines.html> (available: 31.07.2014).
12. Т.П. Пирог, Ю.В. Корж. Влияние ацетата на синтез экзополисахарида этаполана при культивировании *Acinetobacter* sp. B-7005 на среде с этанолом. Микробиол. журнал. -2006. -68 (5): 12-19. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/6308>
13. Tamara A. Grinberg, Tatiana P. Pirog, Yuri R. Malashenko, and Sergei A. Vlasov. Ethapolan: A New Microbial Exopolysaccharide for Oil Industry. Energy & Fuels. -1995. -9: 1086-1089. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ef00054a023>
14. Т. Пирог, Ю. Олєфіренко. Синтез екзополісахариду етаполану на соняшниковій олії залежно від якості інокуляту. Біотехнологія і мікробіологія. -2015. -21(1): 46 – 52. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&2_S21P03=FILE=&2_S21STR=Npnukht_2015_21_1_8
15. В.Р. Сердюк, К.В. Бауман. Пріоритети у використанні викопних видів палива та утриманні житлового фонду. Енергозбереження у будівництві. -2022. 211-221 с. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ir.lib.vntu.edu.ua/handle/123456789/36710>

16. Публічне акціонерне товариство «Укрнафта». Звіт про управління 31 грудня 2020 року. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.ukrnafta.com/data/Investor_docs/30.04.2021/Zvit_pro_upravlinnya2020.pdf
17. Патент SU1726732A1. Спосіб ізоляції притоку пластових вод. -1992. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/SU1726732A1/ru?q=1726732A1+SU>
18. Pirog, T. P., Kovalenko, M. A., & Kuz'minskaya, Y. V. (2003). *Microbiology*, 72(3), 305–312. doi:10.1023/a:1024247915758
19. T. P. Pirog, A. A. Voronenko, M. B. Yarosh. Production of exopolysaccharide ethapolan under *Acinetobacter* sp. imv b-7005 cultivation on the mixture of acetate and sunflower oil. *Biotechnologia acta*, V. 13, No 4, 2020. 71-81. <https://doi.org/10.15407/biotech13.04.071>
20. М.О. Івахнюк, А.А. Вороненко, Т.П. Пирог. Синтез екзополісахариду етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. Imb b-7005 на пересмаженій соняшниковій олії. *Матеріали XIX Міжнародної науково-практичної конференції «Екологія. Людина. Суспільство»*, м. Київ, Україна, 2016 р. С. 26-27.
21. Characterization of plant growth promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum* / F. Rokhbakhsh-Zamin, D. Sachdev, N. Kazemi-Pour [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 21, № 6. — P. 556–566.
22. Xiamen CRTOP Machine Co., Ltd. Stainless Steel Fermenter Bioreactor Industrial Bioreactors. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.crtopmachine.com/stainless-steel-fermenter-bioreactor-industrial-bioreactors_p469.html
23. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. *Загальна біотехнологія: Підручник.* — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.
24. Повітрозабірник. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://samsnab.com.ua/produktsiya->

dlyaventilyatsii/promyshlennyeventilyatory/tsentrobeznhnye-ventilyatory/14970-brv-15-15-tsentrobezhnye-ventilyatory-bvn-s-dvukhstoronnim-zaborom-vozdukha

25. Фільтр грубої очистки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ventfilter.kiev.ua/goods/predvaritelnye-filtry-fvk-g4-1380480280/>

26. Компресор. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://compressors.in.ua/p1540786569-kompressor-vintovoj-compair.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQiAjMKqBhCgARIsAPDgWlxp3YJ9YHcZq4Mv0YwU4LhANhITxtrcGETnU3EKtBiuOyoxJiJOaJsaAqsSEALw_wcB

27. Теплообмінник-охолоджувач. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/stysnene-povitria/refrijeratorniy-osushuvach-marco-polo.html>

28. Ресивер. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://entech-ukraine.dp.ua/ua/p1187392475-vozduhosbornik-resiver-dlya.html>

29. Теплообмінник-нагрівач. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kotelzip.com.ua/ua/p182896015-plastinchatyj-teploobmennik-ims.html>

30. Головний фільтр. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://m.ua.eimofiltermedia.com/filter/air-filter/f7-filter-material.html>

31. Індивідуальний фільтр. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://aafeurope.com/products/epa-hepa-ulpa-filters/microglass-flat-panel-filters/astrocel-r-i>

32. Інокулятор об'ємом 5 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sartorius.com/download/9612/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>

33. Інокулятор об'ємом 50 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sartorius.com/download/10102/broch-biostat-d-dcu-sbi1512-e-data.pdf>

34. Дозатор води для інокулятору об'ємом 50 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://bongard.kiev.ua/catalog/oborudovanie-dlya-zamesa-testa/dozatory-vody/dozatory-vody-dox-30>

35. Ваговий дозатор для інокулятору об'ємом 50 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sweda.com.ua/produktsiya/shnekovyi-dozator/>
36. Інокулятор об'ємом 500 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kbiotech.ch/product/sip-cip-industrial-500l-30000l/>
37. Дозатор води для інокулятору об'ємом 500 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://silence.ua/ru/dozatory-vody-tridomix-50tridomix-100.html>
38. Ваговий дозатор для інокулятору об'ємом 500 л. . [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://sweda.com.ua/produktsiya/dozator-v-meshki-big-beg/>
39. <https://sweda.com.ua/produktsiya/dozator-v-meshki-big-beg/>
40. Реактор об'ємом 10 л для підготування композиції II. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dlu.com.ua/Реактор-miniPilot>
41. Реактор об'ємом 12 л для підготування композиції IV. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://agrovektor.com/ua/physical_product/1277746-reaktor-dlya-prigotovleniya-smesi-125-l-aisi-304.html
42. Дозатор води для ферментеру. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://servotehnika.in.ua/dozator_serv_w40.html
43. Реактор на 100 л для підготування композиції II. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-100-l-dlya-prigotovleniya-farmaceuticheskix-rastvorov-i-suspenzij/>
44. Насос від реактору на 100 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dosingtech.com.ua/uk/product/peristaltichnij-nasos-seko-seriyi-psh-30-60-90-120-l-god-0-1-bar-norprene-2/>
45. Реактор на 500 л для підготування композиції IV. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://agrovektor.com/ua/physical_product/1325653-reaktor-himicheskij-500-l-farmaceuticheskij-promyshlennyu-304-nerzh-bez-davleniya.html

46. Насос від реактору на 500 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://sealing.com.ua/en/pumps/peristaltic-pumps/-ndustr-alniy-shlangoviy-nasos-jxhin-32-ci-abs-plastic-csm-p-165-m3-god-1-5-kvt-16-bar-380v/>
47. Реактор на 5 л для підготування композиції III. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://prom.ua/p1387839012-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAr8eqBhD3ARIsAJe-buPQdirs6J7yd_fbleu30RNhd_mM63_HgxIk2HPSpS9WeSDshzNptr8aAl4wEALw_wcB
48. Івахнюк М.О. Синтез мікробного полісахариду етаполану на олієвмісних промислових відходах. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук. -2019, Київ. С. 1-25. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/29232/1/Ivakhniuk.pdf>
49. Вижевська Т. В. Досвід впровадження багатоступеневої технології біологічного очищення стічних вод. Випуск 1(69) 2015 р. Серія «Технічні науки».
50. Ратушняк Г. С., Лялюк О. Г. Р 25 Засоби очищення газових викидів. Навчальний посібник. – Вінниця: УНІВЕРСУМ-Вінниця, 2008. – 207 с. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://core.ac.uk/download/pdf/52163032.pdf>
51. Подорванов В.В. Фундаментальні біологічні проблеми водневої енергетики. Науковий часопис НПУ ім. М.П. Драгоманова. –(5):53. -2016.