

**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  
(ім'я та прізвище)

«  » лютого 2022 р.

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

«  » лютого 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему: Бактерії роду *Raenibacillus* як біологічні агенти

Виконав: здобувач II курсу, групи 01

ТКАЧОВА Владислава Ігорівна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(ім'я та прізвище) (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище) (підпис)

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Артем СКРЕМІНСЬКИЙ  
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2022 р.



## 6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Виробництво біологічно активних речовин культурами <i>Paenibacillus</i>	03.11.2021	
2	Особливості культивування бактерій роду <i>Paenibacillus</i> для використання у сільському господарстві та для біоремедіації	23.11.2021	
3	Техніко-економічне обґрунтування	12.12.2021	
4	Обґрунтування вибору біологічного агента	18.12.2021	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	29.12.2021	
6	Технологічна схема	06.01.2022	
7	Опис технологічної схеми одержання 2,3-бутандіолу	12.01.2022	
8	Апаратурна схема та специфікація обладнання	22.01.2022	
9	Контроль виробництва	27.01.2022	
10	Список використаної літератури	29.01.2022	
11	Вступ. Реферат. Зміст	01.02.2022	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Владислава ТКАЧОВА**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Оксана СКРОЦЬКА**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці способу виробництва 2,3-бутандіолу при культивуванні *Paenibacillus polymyxa* DSM 365.

2,3-бутандіол – спирт, який запропоновано використовувати в якості розчинника при виробництві ефірних олій для парфумерії. Розрахована потужність виробництва 58,8 т за 70 робочих днів. Особливостями культивування є: температура 37°C, рН 6,0, перемішування 500 об/хв, необхідність додавання підживлюючого розчину сахарози. Початкова концентрація сахарози в середовищі становить 55 г/л, загальна – 285 г/л, внесення сахарози в середовище різне протягом всього процесу виробничого біосинтезу. Особливостями очищення є екстракція 2-гептанолом з наступною двостадійною ректифікацією.

Для виробництва необхідне обладнання для підготовки очищеного повітря, насоси, дозатори, збірники, установка безперервної стерилізації, ультрафільтраційна установка, три посівні апарати на 50 л, 500 л, 5 м<sup>3</sup>, ферментер на 50 м<sup>3</sup>, центрифуга екстрактор, дві ректифікаційні колони та фасувальна машина.

Технологічний процес включає проведення контролю споживання джерела вуглецю – сахарози – методом ВЕРХ, споживання джерела азоту – амонію – фотометрично, біомаси фотометричним методом та 2,3-бутандіолу методом високоефективної рідинної хроматографії. Контроль якості готового продукту передбачає визначення органолептичних показників, концентрації 2,3-бутандіолу методом високоефективної рідинної хроматографії та контроль пакування і маркування.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, семи розділів, списку використаних літературних джерел (111 найменувань), двох листів технологічної схеми (формат А1) та двох листів апаратурної схеми (формат А1). Загальний обсяг роботи – 152 сторінки, 16 рисунків, 30 таблиць.

Ключові слова: *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, 2,3-бутандіол, біосинтез 2,3-бутандіолу, бутиленгліколь, ефірні олії, парфумерія.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ВИРОБНИЦТВО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН КУЛЬТУРАМИ <i>PAENIBACILLUS</i> .....	9
1.1.Способи використання бактерій роду <i>Paenibacillus</i> для виробництва практично цінних речовин.....	10
1.1.1. Використання бактерій роду <i>Paenibacillus</i> для отримання екзополісахаридів.....	10
1.1.2. Біосинтез ферментів за допомогою <i>Paenibacillus</i> .....	13
1.1.3. Синтез білкових сполук з використанням <i>Paenibacillus</i> як біологічних агентів.....	15
1.1.4. Можливості збільшення виробництва спиртів бактеріями роду <i>Paenibacillus</i> .....	15
1.2.Роль <i>Paenibacillus polymyxa</i> в біотехнології.....	17
1.2.1. Способи підвищення продукування 2,3-бутандіолу.....	17
1.2.2. Білкові речовини синтезовані <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	20
1.2.3. Використання для виробництва екзополісахаридів.....	23
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>PAENIBACILLUS</i> ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ ТА ДЛЯ БІОРЕМЕДІАЦІЇ.....	31
2.1.Отримання біомаси <i>Paenibacillus</i> з високими фунгіцидними властивостями.....	31
2.2.Вирощування бактерій роду <i>Paenibacillus</i> для боротьби з мікробними хворобами та сприяння росту і живленню рослин.....	35
2.3.Біоремедіація з використанням <i>Paenibacillus</i> .....	38
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	46
3.1.Потреба у цільовому продукті.....	46

3.2. Розрахунок потужності виробництва 2,3-бутандіолу.....	51
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера.....	51
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	52
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	56
4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	56
4.2. Розрахунок складу поживного середовища.....	64
4.3. Обґрунтування способу культивування.....	66
4.4. Обґрунтування типу ферментера.....	68
4.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	69
4.6. Обґрунтування способу виділення та очищення 2,3-бутандіолу з продуценту <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365.....	78
4.6.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси.....	80
4.6.2. Обґрунтування стадії очистки 2,3-бутандіолу.....	82
4.7. Обґрунтування товарної форми продукту мікробного біосинтезу та стадії пакування.....	91
4.7.1. Обґрунтування вибору товарної форми 2,3-бутандіолу.....	91
4.7.2. Обґрунтування стадії фасування 2,3-бутандіолу.....	92
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	97
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ 2,3-БУТАНДІОЛУ.....	104
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	124
7.1. Карта контрольних точок виробництва 2,3-бутандіолу.....	124
7.2. Контроль виробничого процесу одержання 2,3-бутандіолу.....	133
7.2.1. Технологічний контроль.....	133
7.2.2. Мікробіологічний контроль.....	133
7.2.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	135
7.3. Контроль готового продукту.....	138

7.3.1.	Органолептичні показники.....	138
7.3.2.	Кількісне визначення 2,3-бутандіолу.....	138
7.3.3.	Контроль пакування, маркування, транспортування.....	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....		140
ДОДАТКИ		

## ВСТУП

Косметично-парфумерна промисловість розвивається з кожним роком, збільшуються обсяги виробництва і продажу. Одним з важливих напрямків розвитку косметично-парфумерної галузі є виробництво найбільш корисної продукції, що не містить шкідливих речовин та їх залишків. Важливу роль в цьому відіграють розчинники, які використовують при виробництві косметичних засобів та парфумів.

Якщо розглядати ринок України, достатньо великими є обсяги виробництва ефірних олій, 30% обсягу виробництва яких використовують при виробництві парфумів. Серед розчинників, які використовують для виробництва ефірних олій, найбільш поширеними є гексан, хлороформ, петролейний та діетиловий ефіри. Проте найбільш безпечним розчинником сьогодні є 2,3-бутандіол (бутиленгліколь), який не містить шкідливих речовин, не подразнює шкіру та має легку структуру і тому не викликає змін на клітинному та генетичному рівнях. Крім того, багато досліджень, проведені різними лабораторіями, підтверджують безпечність 2,3-бутандіолу та перевагу його використання при виробництві дитячої косметики та косметики для проблемної і чутливої шкіри [1-3].

Наразі промислового виробництва 2,3-бутандіолу в Україні немає, його закупають закордоном, в основному в Китаї. Слід також зазначити, що закордоном, особливо в азійських країнах, бутиленгліколь є дуже поширеним розчинником для косметично-парфумерної галузі, на відміну від нашої держави.

Тому запровадження промислового виробництва 2,3-бутандіолу в Україні є достатньо перспективним рішенням, що має комерційні, конкурентні та якісні переваги.

Синтез 2,3-бутандіолу можливий хімічним способом та біотехнологічним. Хімічний синтез з продуктів нафтопереробки є більш складним та дорогішим, тому перевагу віддають біотехнологічному виробництву за допомогою оригінальних та генетично модифікованих культур клітин – бактеріальних та дріжджових. Загалом дуже багато мікроорганізмів синтезують бутиленгліколь, проте за весь час

досліджень перевагу віддають *K. Pneumonia*, *K. oxytoca* та *P. Polymuxa*, останній з яких є найкращим продуцентом для біосинтезу 2,3-бутандіолу [1, 4].

Сучасні дослідження в області виробництва бутиленгліколя направлені на модифікацію типових бактерій-продуцентів або умов біосинтезу для збільшення виходу продукту біосинтезу – 2,3-бутандіолу. Це необхідно, оскільки разом з 2,3-бутандіолом продуценти синтезують також інші сполуки, які інгібують синтез 2,3-бутандіолу та можуть мати складний процес відділення [1, 4, 5].

**Актуальність роботи:** відсутність вітчизняного виробництва 2,3-бутандіолу; переваги для використання в промисловості як розчинника, що включають гіпоалергенність, пригнічення розвитку патогенної мікрофлори, відсутність токсичності та впливу на генетичному рівні та інші [2].

**Новизна роботи:** оптимізація процесу культивування штаму *Paenibacillus polymuxa* DSM 365, що не синтезує баластних речовин та синтезує цільовий продукт – 2,3-бутандіол у концентрації 111 г/л, що майже в 3-4 рази більше ніж при використанні традиційних генно-інженерних продуцентів – *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, що синтезує 30,1 г/л 2,3-бутандіолу, та *Enterobacter aerogenes* SUMI02, що синтезує 38,24 г/л спирту [5-7]; спрощення та оптимізація процесу виділення та очищення 2,3-бутандіолу, що дає найменші втрати порівняно з іншими методами, дає змогу отримати продукт найвищої чистоти (99%), при цьому зменшуючи кількість енерговитрат на 39% і при повній регенерації екстрагенту [8-12].

## РОЗДІЛ 1. ВИРОБНИЦТВО БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН КУЛЬТУРАМИ *PAENIBACILLUS*

За останнє десятиліття бактерії роду *Paenibacillus* привернули до себе увагу вчених завдяки природнім можливостям до синтезу багатьох біологічно цінних сполук з достатньо високою ефективністю. Це ферменти, спирти, екзополісахариди, антибіотики. Крім того, *Paenibacillus* виявились ефективними біодеструкторами, біофунгіцидами та пробіотиками. Можливості широкого використання різних представників роду посилюють інтерес та спонукають проводити більше досліджень з цими мікроорганізмами. Слід зазначити, що використовують не тільки оригінальні штами, а також генетично-модифіковані та мутантні. Модифікації та мутації проводять з метою надання бактеріям роду *Paenibacillus* можливостей синтезу нових речовин, або ж для того, щоб інактивувати гени синтезу певних речовин. Останнє має велике значення, оскільки *Paenibacillus* синтезують одразу багато речовин, які пригнічують синтез одне одного. При інактивації генів, що синтезують не цільову речовину, синтез необхідної речовини різко зростає, а очищення продукту біосинтезу спрощується [13].

Широке використання зумовлено також тим, що *Paenibacillus* за своїми властивостями доволі універсальні бактерії та не потребують особливих умов для вирощування. Таким чином процес біосинтезу спрощується, що є одним з ключових факторів при виборі продуцента.

У 2016 році було опубліковано огляд, в якому було описано наявні на той час літературні дані, щодо використання *Paenibacillus* та перспектив розвитку [14].

Мета даного літературного огляду – узагальнення сучасних літературних даних щодо розробок та використання бактерій роду *Paenibacillus* для різних галузей та цілей, дослідження ефективності цих мікроорганізмів для синтезу різних сполук, а також дослідження способів вирощування, фізико-хімічних та біологічних властивостей представників роду.

## **1.1. Способи використання бактерій роду *Paenibacillus* для виробництва практично цінних речовин**

Виходячи з наукової літератури останніх десяти років, основними біологічно активними речовинами, що отримують за допомогою бактерій роду *Paenibacillus* є – спирти, ферменти, екзополісахариди, антибіотики, ліпопептиди та інші важливі сполуки.

### **1.1.1. Використання бактерій роду *Paenibacillus* для отримання екзополісахаридів**

Так *Paenibacillus* синтезують велику кількість екзополісахаридів, які використовують для різних цілей, а саме для харчової промисловості, для очистки води, а також в медично-косметичній галузі. Оскільки попередні дослідження екзополісахаридів показали, що склад середовища та умови виробництва відіграють вирішальну роль у виробництві екзополісахаридів, основна частина сучасних розробок присвячена саме оптимізації цих процесів.

У 2016 році виділили *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032, що продукує екзополісахариди з високими антиоксидантними властивостями. Для оптимізації поживного середовища порівнювали вплив двох джерел вуглецю. Загальний вміст екзополісахаридів в середовищі після культивування при 37°C протягом 4 днів становив 12,3 г/л і 9,5 г/л при використанні 1% кальмарного порошку та 1% порошку голови креветок відповідно. Ці результати показали, що кальмарний порошок є кращим субстратом для виробництва екзополісахаридів за допомогою TKU032. Щоб вибрати оптимальну концентрацію субстрату, порівнювали результати при додаванні до базового середовища 0,5%–3% кальмарного порошку. На таких середовищах бактерії вирощували при 37°C протягом 6 днів. Найкращий результат (13,9 г/л) отримали при 2% кальмарного порошку в середовищі. Порівнювали також вплив температури на синтез цільового продукту. На попередньому етапі *P. mucilaginosus* TKU032 культивували при трьох різних температурах, 4, 25 та 55°C, відповідно 25°C було найбільш придатним, оскільки бактерія відноситься до мезофілів. Далі бактерії вирощували в колбах з додаванням 2% кальмарного порошку, 150 об/хв протягом 6

днів при 25°C, 30°C та 37°C. Оптимальною температурою була 37°C, при чому також виявили, що оптимальним часом культивування є 4 доби, оскільки там спостерігали експоненційний ріст культури, після чого загальний вміст екзополісахаридів був 14,8 г/л. Оскільки синтез екзополісахаридів пов'язаний з ростом культури, саме за цей час накопичується найбільша кількість продукту, а після 4-тої доби, культура проходить експоненційну фазу росту. Значення рН культури також є важливим фактором, оптимальне значення рН для виробництва екзополісахаридів становило 7,2 (некориговане), що дало змогу отримати 14,8 г/л продукту після культивування. Оскільки нейтральний рН є підходящим для виробництва, наступні експерименти проводили з некоригованим рН 7,2. Отже, за допомогою оптимізації культивування було досягнуто більшого виходу цільового продукту – 14,8 г/л. Цього досягли використанням кальмарного порошку як субстрату та оптимізацією умов культивування – 37°C, 4 доби, 150 об/хв, рН 7,2. Для очищення депротейнізованих екзополісахаридів запропоновано метод гелевої хроматографії [15].

В іншій праці досліджували вплив різних субстратів на синтез певних екзополісахаридів. Використовували наступні комбінації субстратів: глюкоза і пептон, гліцерин і пептон, сахароза і пептон та сахароза і NaNO<sub>3</sub>. Отримували чистий гетерополісахарид з глюкози, манози, галактози та глюкуронової кислоти при використанні в якості субстратів пептону та глюкози/гліцерину. При використанні сахарози з пептоном/NaNO<sub>3</sub> отримували чистий леван або суміш двох екзополісахаридів. Найбільш ефективною комбінацією субстратів виявили сахарозу з NaNO<sub>3</sub>. В такій комбінації отримали 11,3 г/л екзополісахариду, що майже в 2 рази більше, ніж при використанні інших комбінацій. Встановили також, що найбільше продукту було на 17-тій годині культивування, що відповідно є оптимальним показником. Зазначимо, що це найшвидший процес одержання екзополісахаридів з використанням бактерій роду *Paenibacillus*. Для синтезу використовували *Paenibacillus sp.* 2H2, що продукував ЕПС в кількості 11,3 г/л за наступних умов: 17 годин ферментації, 30°C, рН 7,0, перемішування 400 об/хв та підживлення сахарозою [16].

В 2018 році виділили новий штам *Paenibacillus peoriae* TS7, екзополісахариди якого можна використовувати для очистки води. Дослідили, що цей штам синтезує гомополісахарид фруктози, для чого підбрали оптимальні умови. Значення рН досліджували використовуючи рН від 2,0 до 7,0. Було відзначено, що найкращий результат отримали при рН 6,8. При цьому синтез екзополісахариду був невеликий – 0,5 г/л. Інші параметри культивування були температура 30°C та час 7 діб [17].

При використанні *Paenibacillus sp.* TKU023 отримали суміш, що складалась в основному з глюкози та мальтози. Для вирощування мікроорганізму використовували середовище, що містить 0,1%  $K_2HPO_4$  і 0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (рН 7) з додаванням різних джерел вуглецю. Досліджені джерела вуглецю включали сахарозу, кальмарний порошок та порошок голови креветок. При додаванні 1% різних джерел вуглецю виявили, що кальмарний порошок був найбільш ефективним. Підбрали також оптимальну його концентрацію за допомогою додавання концентрацій субстрату від 0,5% до 1,5%. Зі збільшенням кількості субстрату спостерігали збільшення кількості продукту, відповідно, оптимальна концентрація субстрату 1,5%. Під час досліджень виявили, що для даного штаму збільшення концентрації розчиненого кисню впливає на синтез цільового продукту. Так при перемішуванні 50 об/хв не було виявлено синтезу екзополісахариду, а при 150 об/хв ріст спостерігався. З метою вирішення оптимальної температури, проводили експерименти при 25, 30 і 37°C. Найбільша кількість екзополісахариду була при 37°C. Для визначення оптимального значення рН, використовували різні значення в межах рН = 2-12. Найкращий результат був при нерегульованому рН = 7,23. Отже, оптимальні умови це вирощування на кальмарному порошку при 37°C, рН 7,23, протягом 72 год при 180 об/хв. При цьому одержували екзополісахариди (4,55 г/л), спосіб виділення яких полягав в осадженні метанолом та депротеїнізації [18].

Крім синтезу суміші екзополісахаридів *Paenibacillus* може синтезувати суміші з екзополісахаридів та інших активних речовин. Прикладом такої розробки є виробництво екзополісахаридів та біоповірхнево-активної речовини *Paenibacillus macerans* TKU029. При виборі концентрації субстрату (кальмарного порошку)

використовували концентрації в межах 0,5-2%. Використання 2% кальмарного порошку виявили оптимальним, крім того, найбільша концентрація продуктів спостерігалась після 3 доби ферментації. Температуру обирали, порівнюючи ріст при 25, 30 і 37°C. Також виявили, що мікроорганізм є мікроаерофілом та потребує концентрації розчиненого кисню 20%. Значення рН обирали в межах 4-10. Оптимізація процесу культивування дала наступні результати – необхідно використання 2% порошку кальмару як єдиного джерела вуглецю та азоту, температура 37°C, рН 7,21, премішування 150 об/хв, час культивування 3 доби. За цих умов отримали ЕПС 3,46 г/л та БПАР 1,78 г/л. Для виділення біоповітряно-активної речовини в супернатанті рН доводили до 12, осад видаляли центрифугуванням, супернатант ліофілізували та обробляли метанолом, після чого нерозчинні домішки видаляли та проводили вакуумне сушіння. Для одержання ЕПС проводили наступні дії – осад з метанольної дисперсії збирали центрифугуванням, розчиняли в дистильованій воді, ліофілізували та проводили депротейнізацію. Проведені дослідження показали, що обидві речовини мають високу активність [19].

Одним з останніх досліджень є також одержання хітозану за допомогою *Raenibacillus jamilae* ВАТ1. Дослідження проводили з використанням в якості субстрату порошку панцира креветок. При дослідженні різних концентрацій субстрату, найкращі результати отримали при додаванні 60 г/л, також виявили, що більші концентрації порошку значно зменшують вихід продукту. Проводили оптимізацію часу культивування та значення рН. За результатами дослідів після 4-тої доби концентрація хітозану була найбільшою. Значення рН досліджували з різницею 0,05. Виявили, що нерегульоване рН 7,0 дало найвищий вихід продукту. Таким чином, були обрані оптимальні умови для одержання хітозану – 60 г/л субстрату, 30°C, рН 7,0, перемішування 150 об/хв, тривалість 4 доби [20].

### ***1.1.2. Біосинтез ферментів за допомогою Raenibacillus***

Велику увагу приділяють також синтезу ферментів бактеріями роду *Raenibacillus*. Штами *Raenibacillus* виробляють різні ферменти, які можна застосовувати в багатьох галузях промисловості, включаючи амілази, целюлази,

геміцелюлази, ліпази, пектинази. Ферменти, отримані з *Paenibacillus*, в даний час не використовують в цих процесах, проте тривають пошуки нових способів одержання ферментів, які є високоактивними в промислових масштабах, мають покращену стабільність або можуть бути вироблені за нижчою ціною, ніж доступні альтернативи.

У 2012 році було проведено дослідження по синтезу циклодекстрин глюканотрансферази *Paenibacillus ehimensis* ВКМ В-2680D (ІВ-739). Фермент виділили та очистили за допомогою адсорбції на картопляному крохмалі і хроматографії на колонці ДЕАЕ-сефарози. Вирощували *Paenibacillus ehimensis* ВКМ В-2680D в промислових умовах, при температурі 30°C, рН 7,0 [21].

В 2019 та 2020 роках досліджували синтез та виділення іншого ферменту – хітинази, за допомогою *Paenibacillus timonensis* LK-DZ15 та *Paenibacillus sp.* A1 відповідно. Максимальна активність ферменту при використанні *Paenibacillus timonensis* LK-DZ15 спостерігалась при 30°C після 44 годин інкубації – 11500 Од/мл. Проте при дослідженні в 2020 році обирали штаб з найкращою продуктивністю, яким виявився *Paenibacillus sp.* A1. При дослідженні найкращих умов для отримання продукту, порівнювали різні джерела вуглецю та виявили, що фермент має найвищу активність при використанні хітину. Корегування рН в рамках показників 3-9 показало, що найбільш сприятливим є рН 4,5. Дослідження температури проводили при 30-70°C. Для виділення використовували осадження сульфатом амонію з подальшими хроматографіями – FPLC з HPLC та іонообмінну з гель-хроматографією [22, 23].

Хітиназу отримують також з використанням *Paenibacillus sp.* AD. Метою досліду було використання хітинових відходів для синтезу хітинази. Для отримання найкращих результатів розкладання відходів креветок оптимізували середовище та умови культивування за допомогою метода OVAT. Відповідно оптимізоване середовище являло собою мінімальне середовище, доповнене 1% відходів креветок та 0,5% сульфату амонію. Оптимальні умови культивування – 96 год, температура 37°C, рН 7,0. При таких умовах деградація відходів склала 99%, а вихід хітинази 20,01 МО/мл [24].

### **1.1.3. Синтез білкових сполук з використанням *Paenibacillus* як біологічних агентів**

Білкові сполуки, що виробляються *Paenibacillus*, включають пептиди, ферменти та леткі органічні сполуки. Протимікробні пептиди надзвичайно важливі для біологічного контролю в сільському господарстві, очищені або синтезовані пептиди також можуть бути використані в медицині та харчовій промисловості. Серед них виділяють бактеріоцини (лантибіотики та педіоцини) та нерибосомні пептиди (поліміксини).

В останні роки активно досліджують антибіотики, які синтезують *Paenibacillus*. Окрім дослідження вже існуючих антибіотиків, з мікроорганізмів даного роду виділяють також нові антибіотики. Найбільш активним продуцентом різних антибіотиків є представник роду *Paenibacillus polymyxa*. Антибіотики *Paenibacillus polymyxa* відносяться до різних груп антибіотиків, що зумовлено їх активністю та структурою.

Ліпопептиди, які синтезують представники *Paenibacillus*, також мають важливе значення, оскільки вони володіють антагоністичними властивостями.

Докладніше про синтез сполук *P. Polymyxa* наведено в пункті 2 цього розділу.

### **1.1.4. Можливості збільшення виробництва спиртів бактеріями роду *Paenibacillus***

Серед спиртів бактерії роду синтезують в основному 2,3-бутандіол. Основні види бактерій, що виробляють цю сполуку, вважаються патогенними, що перешкоджає великій продуктивності.

Вид *Paenibacillus brasilensis* загалом визнаний безпечним і філогенетично подібний до *P. polymyxa*, виду, який широко використовується для виробництва 2,3-ВДО.

У 2018 році було запропоновано спосіб культивування *Paenibacillus brasilensis* для одержання 2,3-бутандіолу. Для використання порівнювали продукування 2,3-бутандіолу для п'ятнадцяти штамів. Загальна концентрація 2,3-бутандіолу для штамів *P. brasilensis* коливалась від 5,5 до 7,6 г/л після 8 годин інкубації при 32°C у

модифікованому середовищі YEPD, що містило 20 г/л глюкози. Найбільш придатним виявився штам РВ24, який і використовували в подальшому. Він виробляв 8,2 г/л продукту протягом 12-годинного періоду росту, що представляло вихід 0,43 г/г і продуктивність 0,68 г/л/год. Збільшення виробництва 2,3-бутандіолу спостерігали із застосуванням більш високих концентрацій глюкози, досягаючи 27 г/л загальної кількості цільового продукту в YEPD, що містить близько 80 г/л глюкози, протягом 72-годинного періоду росту. Тобто вихід був 0,41 г/г 2,3-бутандіолу та продуктивність 0,38 г/л/год. При цьому використовували наступні параметри культивування: температура 37°C, перемішування 180 об/хв, рН 7,0 [25, 26].

Докладніше про синтез 2,3-бутандіолу наведено в пункті 2 цього розділу.

Цікавою є розробка з виробництва нового рожевого пігменту бактерією *Raenibacillus sp.* ВРW19. Сфера застосування пігментів дуже обширна, як і багато проблем, пов'язаних з виробництвом, яке частіше всього є хімічним. Тому використання природнього продуцента є доволі актуальним. Відповідно, для нового продукту підбирали умови найбільшого синтезу. Для оптимізації виробництва біомаси та росту клітин ізольованого штаму ВРW19 було отримано дворівневий трифакторний (температура, рН, відсоток посівного матеріалу) центральний композитний дизайн. Обирали між 25°C і 37°C для температури, 6 і 8 для рН, 1,5 і 3,5 для відсотку посівного матеріалу відповідно. Загалом було сформовано більше 20-ти дослідів, для кожного протягом 4 днів культивували 150 мл культури при перемішуванні 140 об/хв. Найкращою комбінацією була температура 25°C, рН 8 і кількість посівного матеріалу 3,5%. При цьому вихід біомаси складав 0,19 г/л, а пігменту – 3,06% біомаси. Після інкубації було виявлено, що колір бульйону змінився на рожевий. Фермент виділяли з клітин шляхом лізису, після чого очищали за допомогою хроматографії [27].

## 1.2. Роль *Paenibacillus polymyxa* в біотехнології

*Paenibacillus polymyxa* є найбільш активним видом серед всього роду стосовно синтезу різних активних сполук, для використання в сільському господарстві та для інших цілей. Використання біомаси біологічного агента наведено в другому розділі.

### 1.2.1. Способи підвищення продукування 2,3-бутандіолу

Як продуцент 2,3-бутандіолу *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 відомий ще з минулого тисячоліття. Фактично, це єдиний штам *Paenibacillus*, який використовується з цією метою. Зважаючи на це, розробки останніх років присвячені вдосконаленню технологій одержання 2,3-бутандіолу, тобто спрощенню виробництва, оптимізації його та зменшення кількості домішок. Основною проблемою при культивуванні *Paenibacillus polymyxa* для синтезу 2,3-бутандіолу є одночасний синтез екзополісахаридів, що є типовим для цього роду.

Суттєвою проблемою при продукуванні 2,3-бутандіолу *Paenibacillus polymyxa* є пригнічення росту мікроорганізму та перетворення спирту на ацетоїн. При типових умовах культивування для штаму *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 провели серію дослідів, які були направлені на вивчення цього питання. Умови всіх дослідів були однакові – субстрат глюкоза, рН 6,5, перемішування 300 об/хв, температура 37°C, тривалість дослідів 140 год. В першому досліді проводили підживлення глюкозою для одержання максимального виходу 2,3-бутандіолу. Максимальна кількість була 47 г/л при наявності залишкової глюкози 13 г/л. Після досягнення максимальної концентрації продукту, він починав перетворюватись на ацетоїн. В другому досліді на початку культивування до середовища додавали різні кількості (20, 40, 60 г/л) 2,3-бутандіолу з метою стимулювання синтезу продукту. Проте така дія лише пригнічувала ріст мікроорганізму, у випадку додавання 60 г/л – повністю. В останньому досліді також з метою стимулювання поступово під час культивування додавали все більші концентрації 2,3-бутандіолу (20, 40 і 60 г/л через 12, 24 і 36 год відповідно). Відповідно було певне пригнічення росту *Paenibacillus polymyxa* DSM 365, а при досягненні концентрації спирту 60 г/л, він починав перетворюватись на ацетоїн. Тобто, даний ефект є суттєвою перепоною в отриманні чистого продукту 2,3-

бутандіолу та в отриманні більших його кількостей. В наступних статтях розглянуто способи попередження даного ефекту та оптимізацію процесу для усунення домішок [28].

В тому ж році проводили дослідження щодо керування виходом 2,3-бутандіолу та ацетоїну. Для цього культивували змішану культуру, що складалась з *Paenibacillus polymyxa* CJX518 та *Escherichia coli* LS02T (продуцент рибофлавіну). В порівнянні з використанням окремо *Paenibacillus polymyxa* CJX518, змішана культура дала результат на 74,2% кращий щодо загального продукування продуктів метаболізму. При дослідженні різних варіантів культивування було обрано оптимальний за ефективністю, який передбачає спочатку 4 год культивування *E. coli*, а потім внесення *P. polymyxa*. Виявили, що при додаванні *E. coli* на 0, 12 та 24 годині культивування *P. Polymyxa*, збільшення синтезу ацетоїну відбувається по мірі збільшення концентрації кишкової палички. Відповідно, найбільш ефективним виявився наступний спосіб. Культивування починають з використанням монокультури кишкової палички на середовищі з джерелом вуглецю глюкозою та пептоном в якості джерела азоту. Монокультуру вирощують протягом 4 год при 37°C та рН 7,0. Потім додають поживне середовище для культивування бацил та другу культуру. В цьому середовищі джерелом вуглецю є крохмаль, а джерелом азоту – пептон та дріжджовий екстракт. Дослідивши вплив, обрали наступні параметри культивування змішаної культури – 192 год, перемішування 500 об/хв, аерація 0,4 об/хв, рН 9,0, підживлення глюкози. При таких умовах вихід ацетоїну збільшили на 76% - 57,2 г/л, а 2,3-бутандіол залишився фактично на рівні з чистою культурою – 17,76 г/л. Такий винахід не є ефективним для синтезу цільового продукту – 2,3-бутандіолу, хоча є таким для отримання ацетоїну [29].

Ще одну розробку присвятили зменшенню синтезу домішок при культивуванні з метою одержання 2,3-бутандіолу. З цією метою у *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 було зруйновано гени, що кодують синтез екзополісахариду левансахарози та ферменту, що відповідає за його синтез. Трансформацію клітин проводили з використанням плазмід, що містить гени інактивації методом електротрансформації.

Трансформовані клітини вирощували на двох середовищах з джерелами вуглецю відповідно глюкозою та сахарозою 24 год при 37°C. В обох випадках синтез левансахарози був майже непомітний, а синтез 2,3-бутандіолу збільшився відповідно в 1,7 та 1,3 рази. Дана розробка дає змогу не тільки підвищити чистоту отриманого продукту, а й його кількість, що дає великі перспективи для промислового виробництва 2,3-бутандіолу [30].

Проблема чистоти отриманого бутандіолу є актуальною, про що свідчить і стаття 2020 року. Вона присвячена одержанню високоякісного 2,3-бутандіолу. З цією метою було створено мутанти, нульові по левану, а також оптимізовано використання вуглецю для синтезу бутандіолу та інгібування споруутворення. Спосіб включає отримання генетично-модифікованого організму, в якого зруйновано синтез левану, подальшу ферментацію та аналіз синтезу 2,3-бутандіолу. Трансформацію клітин проводили методом кон'югації з використанням плазміди. Спосіб культивування *Raenibacillus polymyxa* DSM 365 був оптимізований в попередній статті цих же авторів за допомогою серії методів оцінки впливу семи факторів (дизайн Бокса-Бенкена, дизайн Плакетта-Бермана і методологія поверхні відгуку), включаючи концентрацію триптон, дріжджового екстракту, ацетату амонію, сульфату амонію, гліцерину, а також температуру та розмір посіву виробництво 2,3-бутандіолу. За результатами встановили, що триптон, температура та розмір посівного матеріалу значно впливають на продукування бутандіолу, оптимальні рівні цих факторів встановили 3,5 г/л, 9,5% і 35°C відповідно. Оптимізований процес дав кращі результати: 51,10 г/л бутиленгліколю при періодичному і 68,54 г/л 2,3-бутандіолу при періодичному культивуванні з підживленням. Крім того, дана оптимізація призвела до зниження синтезу екзополісахаридів на 19% порівняно з початковими результатами. Це підтверджує, що чистота та кількість 2,3-бутандіолу залежить від оптимізації поживного середовища та умов культивування. Отже, трансформовані клітини, нульові по левану, вирощували на оптимізованому поживному середовищі з використанням глюкози в якості джерела вуглецю та дріжджового екстракту в якості джерела азоту. Ферментацію проводили періодичним або безперервним способом

при 35°C та постійному перемішуванні 300 об/хв без контролю рН. Під час та після процесу біосинтезу контролювали ріст біомаси та накопичення 2,3-бутандіолу. Це дозволило підвищити вихід 2,3-бутандіолу на 45% та зробити його більш чистим, що є дуже гарним результатом [31, 32].

Найкращі результати щодо оптимізації процесу культивування та підвищення виходу цільового продукту являють собою 111 г/л бутандіолу на багатому поживному середовищі, а на мінімальному – 72 г/л. З цією метою дослідили вплив різних показників на процес ферментації. Так, аерація менше 300 об/хв не дає культурі достатньо кисню, 300-500 об/хв є оптимальним, а подальше збільшення дає вдвічі менші результати. Проте, зі збільшенням розчиненого кисню в середовищі, збільшується вміст ацетоїну. Після проведення серії експериментів встановили оптимальний режим – аерація 0,2 vvm при 500 об/хв, що дає вихід бутандіолу 98±1% і максимально інгібує синтез ацетоїну. При цьому, в діапазоні температур культивування 30-40°C спостерігали зниження продукції екзополісахаридів з підвищенням температури без зниження рівня продукування 2,3-бутандіолу. Дослідили також вплив субстрату. Як джерело вуглецю використовували сахарозу, азоту – дріжджовий екстракт. Концентрація останнього впливає на синтез різних продуктів *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. При концентраціях 5, 30, 40 г/л крім 2,3-бутандіолу в середовище синтезують й інші C4-продукти. При додаванні 60 г/л дріжджового екстракту синтез нецільових сполук повністю припинявся [5].

Існує ще багато винаходів в даній області. При цьому проблема наявності домішок при вирощуванні бактерій *Paenibacillus* для синтезу 2,3-бутандіолу досі актуальна, незважаючи на вказані вище методи. Отже, задачею є оптимізація для підвищення виходу 2,3-бутандіолу при використанні оригінального штаму, а також вилучення синтезу домішок та відсутність інгібування за високих концентрацій цільового продукту.

### **1.2.2. Білкові речовини синтезовані *Paenibacillus polymyxa***

*Paenibacillus* синтезують різні ферменти. Одним з них є  $\alpha$ -1-арабінофуранозідаза, яка використовується для деградації полімерів, що містять

арабінозу. Одним з продуцентів, що синтезує фермент з високою активністю, є *P. polytuxa* KF-1, що і був обраний для виробництва в роботі, що присвячена оптимізації виробництва  $\alpha$ -1-арабінофуранозидози. З цією метою було проведено дослідження методом однофакторної оптимізації, яке включало наступні параметри: об'єм посівного матеріалу (1, 2, 3, 4 і 5%), температуру культури (20, 25, 28, 33 і 38°C), початковий рН (1,0–9,0), джерело вуглецю (декстроза, ксилоза, лактоза, фруктоза, маноза, сахароза, арабіноза та маніт), джерело азоту (пептон, дріжджовий екстракт, яловичий екстракт, сечовина, соєве борошно, знежирене молоко, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і NH<sub>4</sub>HI<sub>3</sub>), поверхнево-активні речовини (Tween-20, Tween-40, Tween-60, Tween-80, PEG, SDS і Triton X-100). Концентрація джерел вуглецю та азоту, в дослідках була 2,5 г/л, а поверхнево-активні речовини оцінювали при концентрації 1,0 г/л. Культури вирощували при 180 об/хв протягом 36 год. Таким чином було виявлено основні параметри, які впливають на біосинтез – рН, температура, маніт і соєве борошно. Ці параметри оптимізували з використанням методу Бокса-Бенкена. Під час однофакторної оптимізації отримали наступні результати: оптимальне рН – 7,0; температура – 33°C; найкраще джерело вуглецю – маніт; джерело азоту – соєве борошно. Ці результати були виведені окремо для кожного параметру, після чого встановили оптимальну їх взаємодію - рН 7,5, температура 28°C, манітол 1,5 г/л та соєве борошно 3,5 г/л. Як результат, активність ферменту досягла 25,2 Од/мл після 36 год біосинтезу. Фермент виділяли з клітин та очищали за допомогою рідинної хроматографії [33].

Бактерії роду *Paenibacillus* синтезують різні антибіотики. Частина з них на даний час вже не використовується, проте останнім часом виділяють нові антибіотики.

Одним з них є лантибіотик пенібацилін. Для отримання нового продукту було запропоновано кілька варіантів культивування *P. polytuxa* OSY-DF, що синтезує пенібацилін. Гарні результати отримали при вирощуванні на соєвому відварі з 0,6% дріжджового екстракту при 30°C і перемішуванні 200 об/хв, після чого продукт виділяли та використовували для боротьби із золотистим стафілококом. Проведені

дослідження також показали, що можна керувати виходом антибіотику в залежності від кількості клітин [34].

Іншим новим лантибіотиком є пенілан, синтезований *Paenibacillus polymyxa* EPT14. Для ефективного синтезу пенілану, проводили мутацію для видалення генів синтезу інших п'яти антибіотиків із штаму *Paenibacillus polymyxa* E681. У середовищі TSB, що типово використовують для вирощування *P. polymyxa*, рівень продукції пенілану був дуже низьким. Тому обрали інше середовище – бульйон Cal18, що дає високий вихід пенілану. Культуру *P. polymyxa* EPT14 вирощували при 30°C і рН 7,0 протягом 30 год. Очищали пенілан послідовним використанням розчинення та ВЕРХ. З 500 мл культури отримали 4,1 мг очищеного висушеного пенілану [35].

Також, використовуючи *Paenibacillus polymyxa* E681, виділили новий ліпогептапептид, що одержав назву пеніліпогептин. Досліджували оптимальні параметри для отримання продукту на трипто-соевому агарі. Час обирали за допомогою визначення концентрації продукту на 24, 48, 72 та 96 год. рН досліджували від 3 до 10, а температуру обирали між 25, 30, 35 і 40°C. Як результат, встановили температуру 30°C, час культивування 72 год та рН 7,3. Виділяли екстракцією та очищали ліпогептапептид методом високоефективної рідинної хроматографії [36].

Типовим антибіотиком для *Paenibacillus* є поліміксин. Для відносно нового дослідження з виробництва цього антибіотика, використовували штаму *P. polymyxa* C12. Для отримання антибіотику, бактерію вирощували в ферментері зі складним середовищем за наступних умов: час 96 год, рН 7,0, температура 30°C та швидкість перемішування 200 об/хв. При цьому дослідили вплив джерела вуглецю на вихід поліміксину. З метою підвищення виходу поліміксину порівнювали використання крохмалю та глюкози в якості субстрату. При використанні 45 г/л глюкози максимально змогли отримати  $8,5 \times 10^4$  Од/мл після 96 год культивування, при чому після 48 год кількість антибіотику майже не змінилась. Для порівняння використовували також 20 г/л крохмалю з 25 г/л глюкози, 30 г/л і 15 г/л, 40 г/л і 5 г/л відповідно, та 45 г/л крохмалю. Виявили, що підвищення синтезу сполуки

підвищується зі збільшенням заміни глюкози крохмалем. Найкраще виявилось використовувати 40 г/л крохмалю та 5 г/л глюкози, що дає вихід продукту  $1,66 \times 10^5$  Од/мл після 72 год. Таким чином змогли підвищити синтез поліміксину більше ніж в 2 рази [37].

### **1.2.3. Використання для виробництва екзополісахаридів**

*Raenibacillus polymyxa* синтезують велику кількість різних екзополісахаридів, як окремо, так і в суміші.

Так, для синтезу глюкану використовували *Raenibacillus polymyxa* JB115, яку культивували 3 доби при температурі 30°C з додаванням цукрози для стимулювання продукції глюкану. Найкращі результати дало додавання 10% цукрози, при чому продукція глюкану досягла 10 г/л [38].

Для синтезу курдлану використовували штам *Raenibacillus polymyxa* ATCC 21830. Для інкубації досліджували вплив шести параметрів, впливаючих на синтез екзополісахариду, а саме температуру, рН, час ферментації, швидкість перемішування, концентрацію глюкози та дріжджового екстракту. Температуру обирали в проміжку 30-50°C, рН – 5,5-8,5, час від 72 до 120 год, глюкозу додавали в кількостях 75-125 г/л, дріжджовий екстракт – 1-5 г/л, швидкість перемішування обирали між 120-180 об/хв. Для визначення оптимальних параметрів провели більше 50-тидесяти дослідів, після чого отримали наступні найкращі умови: температура 50°C, рН 7,0, час процесу 96 год, джерело вуглецю – глюкоза 100 г/л, азоту – дріжджовий екстракт 3 г/л та швидкість перемішування 150 об/хв. При таких оптимальних умовах досягли виходу курдлану 6,89 г/л, що є високим показником [39].

Екзополісахариди ж *P. polymyxa* CHL 0102 пропонують використовувати для очистки води. З цією метою бактерію вирощують на твердому поживному середовищі при 30°C протягом 5 діб. При цьому визначали вплив різних факторів на ріст та використання металів з води. Так, час контакту впливав на ріст біомаси і продукту, виявили, що після двох годин контакту з водою рівень адсорбції більше не змінювався. Даний фактор залежав і від кількості біомаси. Менші кількості біомаси (1 г/л) давали кращі результати за більші кількості (5 г/л). Причиною визначили розмір поверхні

контакту, який збільшувався при меншій кількості біомаси. Значення рН впливає на адсорбцію таким чином, що при низьких значеннях рН адсорбційна здатність металів низька, оптимальним значенням рН знайшли 5. Після оптимізаційна кінець культивування бактеріальна маса складалась на 90% з екзополісахаридів (7 г/л продукту) [40].

Узагальнення наведеної інформації викладено в *табл. 1.1*.

Синтез біологічно активних речовин бактеріями роду *Paenibacillus*

Бактерії роду <i>Paenibacillus</i>	Цільовий продукт	Середовище для культивування	Умови культивування	Концентрація продукту, г/л	Література
<i>P. polymyxa</i> DSM 365	2,3-бутандіол	дріжджовий екстракт - 60,0; Сахароза – 750; MgSO <sub>4</sub> – 0,2; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 3,0; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,2; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,2; розчин мікроелементів – 3 мл.	54 год, 37°C, рН 6,0, контролюють 12,5% NH <sub>4</sub> ОН та 6,5 н. Н <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , перемішування 500 об/хв, рівень розчиненого кисню 0,2 об/об, використовують підживлення сахарозою, початкова концентрація сахарози 55 г/л, Tween80 додають для зменшення в'язкості.	111	[5]
<i>P. mucilaginosus</i> TKU032	екзополісахариди	джерело вуглецю – 2% кальмарний порошок	4 доби, 37°C, рН 7,2, 150 об/хв	14,8 г/л	[15]
<i>P. sp.</i> 2H2	леван	сахароза та NaNO <sub>3</sub>	17 год, 30°C, рН 7,0, 400 об/хв	11,3 г/л	[16]

<i>P. sp.</i> 2H2	гетерополісахарид з глюкози, манози, галактози та глюкуронової кислоти	пептон та глюкоза/гліцерин	17 год, 30°C, рН 7,0, 400 об/хв	6 г/л	[16]
<i>Paenibacillus peoriae</i> TS7	гомополісахарид фруктози	RCV, доповнене 0,1 г/л дріжджового екстракту та 20 г/л сахарози	7 діб, 30°C, рН 6,8	0,5 г/л	[17]
<i>P. sp.</i> TKU023	глюкоза та мальтоза	1,5% кальмарний порошок, 0,1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.05% MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	37°C, рН 7,23, 72 год, 180 об/хв	4,55 г/л	[18]
<i>P. macerans</i> TKU029	суміш екзополісахаридів та ПБАР	2% порошок кальмару як єдине джерело вуглецю та азоту	3 доби, 37°C, рН 7,21, 150 об/хв	ЕПС 3,46 г/л та БПАР 1,78 г/л	[19]
<i>Paenibacillus jamilae</i> BAT1	хітозан	60 г/л порошку панцира креветок	4 доби, 30°C, рН 7,0, 150 об/хв	-	[20]

<i>Paenibacillus ehimensis</i> BKM B-2680D (IB-739)	циклодекстрин глюканотрансферази	картопляний крохмаль	30°C, рН 7,0	-	[21]
<i>P. timonensis</i> LK-DZ15	хітиназа	джерело вуглецю - хітин	44 год, 30°C, рН 4,5	11500 Од/мл	[22]
<i>Paenibacillus sp.</i> AD	хітиназа	мінімальне середовище, доповнене 1% відходів креветок та 0,5% сульфату амонію	96 год, 37°C, рН 7,0	20,01 МО/мл	[24]
<i>P. brasilensis</i> PB24	2,3-бутандіол	YEPD, що містило 27 г/л глюкози	72 год, 37°C, рН 7,0, 180 об/хв	80 г/л	[25]
<i>Paenibacillus sp.</i> BPW19	рожевий пігмент	R-2A	4 доби, 25°C, рН 8, 140 об/хв, кількість посівного матеріалу 3,5%	0,006 г/л	[27]
<i>Paenibacillus polytuxa</i> DSM 365	2,3-бутандіол	субстрат глюкоза	140 год, 37°C, рН 6,5, 300 об/хв	47 г/л	[28]

<i>P. polymyxa</i> CJX518	ацетоїн та 2,3-бутандіол	джерелом вуглецю є крохмаль, а джерелом азоту – пептон та дріжджовий екстракт	4 год культивування <i>E. coli</i> при 37°C та рН 7,0, а потім внесення <i>P. polymyxa</i> і культивування 192 год, 37°C, рН 9,0, 500 об/хв	57,2 г/л та 17,76 г/л	[29]
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	2,3-бутандіол	два середовища з джерелами вуглецю відповідно глюкозою та сахарозою	24 год, 30°C	х1,7 та х1,3	[30]
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	2,3-бутандіол	3,5 г/л триптон, дріжджовий екстракт, ацетат амонію, сульфат амонію, гліцерин	періодичне, 35°C, 300 об/хв, без контролю рН, кількість посівного матеріалу 3,5%	51,10 г/л	[31, 32]
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	2,3-бутандіол	3,5 г/л триптон, дріжджовий екстракт, ацетат амонію, сульфат амонію, гліцерин	періодичне з підживленням, 35°C, 300 об/хв, без контролю рН, кількість посівного матеріалу 3,5%	68,54 г/л	[31, 32]

<i>P. polytuxa</i> KF-1	α-1- арабінофуранозида за	манітол 1,5 г/л та соєве борошно 3,5 г/л	36 год, 28°C, рН 7,5, 180 об/хв	25,2 Од/мл	[33]
<i>P. polytuxa</i> OSY-DF	пенібацилін	соєвий відвар з 0,6% дріжджового екстракту	30°C, 200 об/хв	-	[34]
<i>Paenibacillus</i> <i>polytuxa</i> EPT14	пенілан	бульйон Cal18	30 год, 30°C, рН 7,0	4,1 мг (сухого чистого продукту)/500 мл	[35]
<i>Paenibacillus</i> <i>polytuxa</i> E681	пеніліпогептин	TSB	72 год, 30°C, рН 7,3	-	[36]
<i>P. polytuxa</i> C12	поліміксин	40 г/л крохмалю 5 г/л глюкози	72 год, рН 7,0, 30°C, 200 об/хв	1,66×10 <sup>5</sup> Од/мл	[37]
<i>P. polytuxa</i> JB115	глюкан	10% цукрози	3 доби, 30°C	10 г/л	[38]
<i>P. polytuxa</i> ATCC 21830	курдлан	джерело вуглецю – глюкоза 100 г/л, азоту – дріжджовий екстракт 3 г/л	96 год, 50°C, рН 7,0, 150 об/хв	6,89 г/л	[39]

<i>P. polytuxa</i> CHL 0102	екзополісахариди	тверде поживне середовище	5 діб, 30°C, рН 5	7 г/л	[40]
--------------------------------	------------------	------------------------------	-------------------	-------	------

## **РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *PAENIBACILLUS* ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ ТА ДЛЯ БІОРЕМЕДІАЦІЇ**

В сільському господарстві активно використовують біомасу бактерій роду *Paenibacillus*, як біодеструкторів, біофунгіцидів, біоремедіантів і, навіть, пробіотиків.

Бактерії, що належать до роду *Paenibacillus*, початково були виділені з різних середовищ, причому багато видів є в людей, тварин, рослин та навколишньому середовищі. Більшість з них міститься в ґрунті, часто це пов'язано з корінням рослин: ці ризобактерії сприяють зростанню рослин. Багато видів *Paenibacillus* виробляють антимікробні сполуки, які є корисними як пестициди, а також багато ферментів, які можна використовувати для біоремедіації або для інших цілей. Деякі види *Paenibacillus* є патогенними або умовно-патогенними для людини і тварин, що має високе значення при використанні в сільському господарстві.

Зазначимо, що цінні властивості бактерій роду *Paenibacillus* в цій сфері зумовлені різними сполуками, які вони виділяють, або ж фізико-хімічними властивостями (у випадку біодеструкції). Проте в даному розділі розглянуто використання не окремо цінних сполук, а саме біомаси бактерій *Paenibacillus*.

### **2.1. Отримання біомаси *Paenibacillus* з високими фунгіцидними властивостями**

Грибкові захворювання завдають значних втрат урожаю кожний рік. Хімічні фунгіциди, які широко використовують на плантаціях сільськогосподарських культур для боротьби з грибковими інфекціями, можуть становити загрозу навколишньому середовищу та людям. Останнім часом значний інтерес викликають біофунгіциди як альтернатива хімічним фунгіцидам завдяки своїй екологічності.

Відомий факт, що бактерії *Paenibacillus* володіють фунгіцидними властивостями. Різні види мають різно-інтенсивно виражені фунгіцидні властивості,

деякі види мають набагато більш виражені фунгіцидні властивості, що дає змогу використовувати їх як інгібітори росту грибів.

Для боротьби з фітопатогенним грибом *Penicillium expansum* був виділений штам *Paenibacillus polymyxa* НТ16, що секретував речовину білкового походження з фунгіцидними властивостями. Для одержання чистої культури, бактерію культивували за типових параметрів для бактерій роду *Paenibacillus*: 37°C, рН 6,5-7,0, 150 об/хв, час культивування був 48 годин. Ці умови визначили як оптимальні для накопичення біомаси. Проте, відомо, що оптимальна температура для грибів складає 25-27°C, а при температурі 37°C досліджуваний гриб не витримує і 24 год. Через це проводили досліди для перевірки властивостей бактерії в типових умовах росту гриба та при типовій температурі росту рослин, для яких це мало використовуватись. Після постановки серії експериментів, визначили, що *Paenibacillus polymyxa* НТ16 повністю пригнічує ріст гриба *Penicillium expansum* при 25°C, експеримент тривав 48 год. Для очищення компоненту використовували осадження та ультрафільтрацію [41].

Природний штам *Paenibacillus polymyxa* SCHC33 виявився ефективним проти *B. cinérea*. У винаході щодо цього штаму було запропоновано використання біомаси бактерії для захисту плодів. При цьому проводили також дослідження щодо безпечності використання *Paenibacillus polymyxa* SCHC33. Дослідження ефективності та безпечності проводили протягом 7 діб при температурі 20°C. Результати були такими, що даний штам є повністю безпечним, не викликає змін у рослин та є придатним для захисту від гриба. Для виробництва препарату даного штаму оптимізували склад поживного середовища та умови вирощування бактерії. Як джерело вуглецю використовували глюкозу. Відповідно, спочатку встановили оптимальну концентрацію глюкози, що робили за допомогою 6-ти експериментів. При цьому визначали питому швидкість росту, яку пов'язували з концентрацією глюкози. Ферментації були проведені з початковими концентраціями глюкози 0,1 г/л, 0,2 г/л, 0,5 г/л, 1 г/л, 2 г/л і 5 г/л в культуральному середовищі LG (дріжджовий екстракт 5 г/л, глюкоза). Типові для роду параметри використовували однакові в усіх дослідженнях: аерація (1 vvm), температура (30°C), рН (5) і перемішування (200 об/хв).

Після побудови графіків та визначення кінетичних параметрів, обрали використання глюкози в кількості 2 г/л, що виключило фазу затримки та дало 1,03 г/л біомаси після 10,5 годин культивування [42].

*Paenibacillus ehimensis* KWN38 показала сильний інгібуючий ефект грибкового росту проти багатьох різних родів. При цьому виявляв високу активність хітинази, целюлази, глюканази та протеази, що також давало ефект пригнічення грибів. В дослідженнях використовували різні поживні середовища, з яких оптимальним для виробництва всіх вищезазначених ферментів стало рідке середовище складу (г/л): порошок крабової шкаралупи 1,0, порошок желатину 1,0, повне добриво (% N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O; 21:17:17) 3,0, сахароза 3,0, дріжджовий екстракт 0,03, FeCl<sub>3</sub> 0,03]. Культивували протягом 7 днів при 30°C з перемішуванням 170 об/хв. Найвищі активності хітинази (2,37 ОД/мл\*год) і глюканази (3,4 ОД/мл\*год) були на 5 добу, целюлази (0,6 ОД/мл\*год) – на 4 добу, а протеази (110 ОД/мл\*год) – на 7 добу. Завдяки такому розподілу бактерія є ефективною для боротьби з мукорами [43].

Ліпопептиди бактерій *Paenibacillus* також володіють антагоністичними властивостями проти різних грибкових захворювань. В одній з праць на дану тему використовували *Paenibacillus ehimensis* IB-X-b, яку для перевірки фунгіцидних властивостей культивували 72 год при 28°C на картопляно-декстрозному агарі, а потім в природніх умовах. Оскільки встановили, що бактерія є ефективною, проводили нарощування біомаси у середовищі PE (0,5% колоїдного хітину з панцирів крабів, 0,2% поліпептону, 0,1% витяжки кукурудзи, 0,1% КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,1% К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub> і 0,03% CaCl<sub>2</sub>). Ферментацію проводили 60 год при 36°C, 160 об/хв та рН 6,5 [44, 45].

У дослідженні 2016 року було запропоновано використовувати *Paenibacillus lentimorbus* B-30488 проти хвороби південного *оніку*, спричиненої *Scelerotium rolfsii* у томатів. З цією метою *S. rolfsii* і бактерії вирощували на середовищі NB поодинокі та разом зі змінами різних параметрів. *Paenibacillus lentimorbus* B-30488 вирощували за 2 дні до інокуляції з грибами або інокулювали разом. Вирощували протягом 7 діб при 25, 28, 35°C, перемішуванні 100 об/хв, рН 5-9, з додаванням 15%, 30% і 45%

PEG6000 та 50, 100, 150, 250, 500 і 1000 мм NaCl (мас./об.). За результатом, рН 5, підвищення температури та додаткових компонентів збільшує пригнічення грибу, проте результати різняться в попередньо вирощеній культурі та загальній. При цьому біологічний агент продукував фермент дезаміназу, що і є ключовим для забезпечення стійкості рослин до хвороби [46].

Приблизно таке ж дослідження проводили на виявлення фунгіцидних властивостей *Paenibacillus sp.* PNM200 проти *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. З цією метою бактерію вирощували на LB протягом 48 год при перемішуванні 120 об/хв. Інші параметри визначали експериментально: температуру (25, 30, 37, 40°C), рН (6, 7, 8), концентрацію NaCl (1, 2, 3% (мас./об.)). Оптимальними визначили рН 7,0, температуру 25°C і NaCl 0,85%. При цьому кількість клітин була  $1 \times 10^6$  КУО/мл [47].

Використання бактерій як біофунгіцидів стимулює й розробки стосовно форми препаратів для використання на великих плантаціях. При цьому важливими є форма препарату та збереження життєздатності клітин бактерій. Продукти у формі порошку, зроблені за допомогою технології ліофілізації, щоб забезпечити зручність зберігання потребують захисного середовища для підтримки оптимальних життєздатних клітин. Так, один з найкращих біофунгіцидів, *Paenibacillus polymyxa* Kp10, запрямували вирощувати у бульйоні M17 при 37°C протягом 24 год при 150 об/хв. Найбільший приріст бактерій спостерігали на 22 години (8,10 log КУО/мл), проте визначили, що найвища життєздатність спостерігається при використанні клітин із стаціонарної фази, що зумовлено виснаженням ресурсів поживного середовища. По закінченню культивування кількість клітин складала 8,03 log КУО/мл. Клітини *P. polymyxa* Kp10 використовували для оптимізації захисного середовища. Зважаючи на відомі захисні агенти, що дають високий результат (10% лактоза, 20% знежирене молоко та 30% сахароза), за допомогою моделі ANOVA визначали оптимальний склад при двох змінних компонентах і одному постійному. При цьому в дослідженнях порівнювали концентрації знежиреного молока 10-30%, лактози 5-15%, сахарози 15-40%. Одержали такі результати: оптимальним захисним середовищем є 20% знежирене

молоко, 10% лактоза та 27,5% сахароза. В такому середовищі виживаність клітин після ліофілізації становила 83% [48].

## **2.2. Вирощування бактерій роду *Paenibacillus* для боротьби з мікробними хворобами та сприяння росту і живленню рослин**

Вирощування сільськогосподарських культур дуже сприйнятливим до хвороб, що передаються ґрунтом. Для боротьби з ними використання хімічних фунгіцидів не дуже вдало, оскільки спори бактерій виживають в ґрунті протягом багатьох років, а самі фунгіциди негативно впливають на здоров'я. Тому *Paenibacillus* мають велике значення для сільського господарства, оскільки є антагоністами багатьох мікроорганізмів, що спричиняють захворювання рослин. Крім того, рід *Paenibacillus* містить багато видів, які, сприяють росту рослин, включаючи кукурудзу, гарбуз, рис, томат, зернові культури та багато інших.

*Paenibacillus* часто використовують для захисту томатів від мікробних хвороб. У 2014 році в Японії проводили дослідження ефективності використання різних штамів для захисту томатів. В дослідженні використовували *Paenibacillus alginolyticus* DSM 5050, *Paenibacillus xylanilyticus* XIL14, *Paenibacillus kobensis* DSM 10249, *Paenibacillus favisporus* GMP01, *Paenibacillus lautus* JCM 9073, *Paenibacillus glycanilyticus* DS-1. Всі штами вирощували протягом 5 діб при 28°C у темряві та перемішуванні 120 об/хв. Середовищем була рідина картопляної декстрази. Потім проводили тепличні досліди протягом 4-х тижнів при 23°C на картоплі. В результаті з 20 штамів, отриманих з томатної філосфери, два штами *Paenibacillus* – 12HD2 і 42NP7, виявили значні антимікробні властивості [49].

Штам *Paenibacillus polytuxa* П, який складає основу Біополіциду, використовували для покращення врожайності винограду. З цією метою були отримані мутанти, стійкі до стрептоміцину, ампіциліну та канаміцину відповідно. Для дослідження виноград обробляли суспензією добової культури мікроорганізмів (10,2-11,5 млн. КУО/мл) у кількості 6 мл на кожен саджанець. Вирощували мутантів на гороховому агарі. Найбільша приживаність та підвищення кількості бактерій

стосовно контролю спостерігались за впливу канаміцину, найменша – стрептоміцин-резистентного мутанту штаму *P. polymyxa* П у ризосфері виноградної рослини [50].

Біомасу іншого штаму – *P. polymyxa* CR1 використовували для стимулювання росту картоплі. В даному випадку готовий препарат являв собою суспензію клітин, які було запропоновано вирощувати в 1/5 NPT при 28°C протягом 24 год, після чого можна використовувати [51].

Було виявлено, що *Paenibacillus* OSY-SE стимулює ріст рослин за допомогою фіксації азоту та одночасно фунгіцидної дії. З біомаси даного штаму виробили новий препарат для живлення – Пенібантерин. В проведених дослідженнях зазначений ізолят мав високу ефективність. Для отримання біомаси бактерії висівали на триптозний агар та інокулювали протягом 4 діб при температурі 37°C. При цьому штам показав себе як типовий представник роду – серед досліджень на оптимальні умови життєдіяльності найкращими були рН 7, температура 37°C і час культивування 24 год [52].

Приділяють увагу також можливості бактерій солюбілізації фосфору та, відповідно, фосфорного живлення рослин.

В 2012 році перевіряли фосфатну солюбілізацію бактерій роду з подальшим використанням при вирощуванні огірків. При цьому використовували шістнадцять різних штамів бактерій роду *Paenibacillus*. Для досліджень використовували рідке середовище NBRIP, яке доповнювали 5 г/л  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  або  $\text{CaHPO}_4$  або  $\text{FePO}_4$  або  $\text{AlPO}_4$  або 5 мл/л інозитулу гексафосфату в якості джерела фосфору. Бактерії вирощували протягом 5 діб до концентрації  $10^7$  КУО/мл за наступних параметрів: 28°C, рН 7,0, перемішування швидкістю 130 об/хв. Засвоєння  $\text{FePO}_4$  та  $\text{AlPO}_4$  не відбулось в жодному штамі. Найкращі результати фосфорного поглинання досягли в досліді з використанням *P. macerans* MB02-992, який найкраще засвоював інші три джерела фосфору. Непогані результати показали також *P. polymyxa* MB02-1007, що також засвоювала три джерела, але в меншій кількості, та *P. polymyxa* MB02-226, що мала високі результати засвоєння кальцієвих солей фосфору [53].

Для фосфорного живлення зернових культур використовують і *Paenibacillus polymyxa* KB. Згідно проведених досліджень по інтенсифікації кореневого живлення рослин, саме використання *Paenibacillus polymyxa* KB забезпечувало підвищення вмісту фосфору у зерні на 0,08–0,14% і зростання його виносу з урожаєм культури на 24,8–35,9%. Для збільшення кількості бактерій, їх розчиняли в  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , після чого отримали наступний результат: кількість ґрунтових бактерій зросла більш ніж в 2 рази [54].

Для підвищення живлення рослин використовують бактеріальний препарат Поліміксобактерин. Було встановлено, що обробка рослин кукурудзи, як культуральною рідиною *P. polymyxa* KB так і супернатантом культуральної рідини бактерій в однаковій мірі сприяє збільшенню висоти рослин та площі листків. Застосування мікробного препарату Поліміксобактерину у технології вирощування кукурудзи сприяє зростанню урожайності культури на 1,0–2,4 т/га, вмісту білка на 0,6-1,4 % та крохмалю в зерні – 7,9-8,9 % у залежності від способу його застосування, а також підвищує фосфатазну активність у ризосферному ґрунті рослин до 59,3 %. Крім того, штам проявляє фунгіцидну дію. Для визначення вмісту фітогормональних речовин – продуктів метаболізму, бактерії *P. polymyxa* KB культивували протягом 3-х діб за температури + 28°C у рідкому поживному середовищі складу (г/л): меласа – 40 г; кукурудзяний екстракт – 20 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,38 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5 г/л;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5 г/л;  $\text{NaCl}$  – 0,5 г/л;  $\text{CaCO}_3$  – 3-5 г;  $\text{NaOH}$  – 1-2 г. Титр клітин бактерій після культивування становив 6,5 млрд./мл. Для отримання активних речовин, що синтезує штам, культуральну рідину обробляли етилацетатом при рН 3,0. Екстракти випарювали під вакуумом при 40-45°C. Сухий залишок перерозчиняли у 80%-вому етанолі, проводили очищення та концентрування накопичувальною тонкошаровою хроматографією [55].

У цьому ж дослідженні бактерії штаму *P. polymyxa* KB використовували для виявлення інших їх властивостей. Оскільки це також відноситься до способів використання бактерій роду, зазначимо і це.

Для визначення здатності бактерій продукувати позаклітинний полісахарид амілопектин, культуру вирощували на МПА з внесенням 5% сахарози протягом 48 год. Здатність *P. polytuxa* KB синтезувати екзополісахарид леван визначали за зовнішнім виглядом колоній, які виростили на середовищі, збагаченому сахарозою. Склад поживного середовища для синтезу левану наступний: середовище № 1, г/л: сахароза – 150,0; пептон – 2,0; дріжджовий екстракт – 2,0;  $K_2HPO_4$  – 2,0;  $(NP_4)_2SO_4$  – 2,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,3; агар – 20,0. середовище № 2, г/л: сахароза – 100,0; пептон – 2,0; дріжджовий екстракт – 10,0;  $K_2HPO_4$  – 2,0;  $(NP_4)_2SO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5; агар – 20,0. Утворення ферменту пектинази бактеріями оцінювали по їх дії на пектин за появою чітких зон диетерифікованого пектинового субстрату (0,5 %) після 2-х діб культивування за температури 37°C на поживному середовищі МПА [55].

Для риболовства має значний вплив достатня кількість фосфору в середовищі, що стимулює гарний ріст водоростей та мікрофлори, тобто забезпечує кормову базу для риб. Основним джерелом фосфору у водоймах є стічні води з сільськогосподарських угідь, тобто фосфор з добрив. Згідно статті 2011 року, було проаналізовано вплив використання Поліміксобактерину як добрива для землеробства, на заміну фосфорних добрив. Як зазначено в праці, використання бактеріальних препаратів на основі ґрунтових бактерій, як добрив, є гарною альтернативою. В даному випадку, Поліміксобактерин, розроблений на основі *Raenibacillus polytuxa*, є повністю безпечним для людини і тварин, не має побічних ефектів та не накопичується в організмі. Бактерія має високу конкурентоспроможність та синтезує багато корисних речовин. Використання препарату дає змогу зменшити внесення фосфорних мінеральних добрив на 30 кг/га діючої речовини, знижуючи при цьому хімічне навантаження на ґрунт [56].

### **2.3. Біоремедіація з використанням *Raenibacillus***

З розвитком біотехнологій все більшого значення надають екологічності виробництв. При цьому досягнення біотехнологій використовують для знешкодження відходів, а також для розкладання різних речовин. Різні галузі

промисловості, включаючи нафтову, текстильну, целюлозно-паперову та інші галузі хімічної промисловості, можуть вивільняти велику кількість органічних забруднюючих сполук і важких металів. Різні види бактерій роду *Paenibacillus* можуть бути використані для видалення або деградації цих забруднювачів навколишнього середовища шляхом біофлокуляції або ферментативної діяльності.

*Paenibacillus* здатні виробляти широкий спектр речовин, які метаболізують аліфатичні та ароматичні органічні забруднювачі, також здатні руйнувати забруднювачі, отримані при видобутку, переробці та транспортуванні нафти. Крім того, ці бактерії можуть рости на великій кількості відходів, використовуючи їх як субстрат, навіть на CO.

У 2015 році досліджували види, що здатні до біоремедіації. Один з них, *Paenibacillus validus*, має здатність розщеплювати широкий спектр низькомолекулярних ПАУ, включаючи нафталін, фенантрен, біфеніл, р-гідроксибензоат та бензоат, а також ПАУ з більшою молекулярною масою, такі як пірен та фторантен. З цією метою *Paenibacillus validus* PR-P1 культивували на мінімальному середовищі з додаванням 10 мг/л фенантрону (тільки за його присутності бактерія розкладала одночасно пірен та фторантен). Культивували при 28°C та струшуванні 200 об/хв. При цьому досліджували оптимальний час культивування для розкладання ПАУ. Кожні 24 години аналізували результати. За результатами можна зробити висновок, що оптимальним періодом культивування є 3 доби, оскільки за цей час *Paenibacillus* PR-P1 розкладала 83% фторантену та 20% пірену. До сьомого ж дня ці показники зростали до 86% та 27% відповідно, що не сильно відрізняється від показників 3-го дня [57].

Властивістю іншого виду – *Paenibacillus lautus* ВНУЗ, є здатність до біодеградації целюлози та лігноцелюлози. Специфіка даної розробки полягає в тому, що можна використовувати як окремо виділений фермент, так і бактеріальну масу. Для вирощування використовували мінімальне середовище та культивували на орбітальній струшувальній мішалці протягом 7 діб при 25°C [58].

Штам *Paenibacillus sp.* САА11 також здатний до біодеградації целюлози. Крім того, він виділяє етанол та коротколанцюгові кислоти. Штам є рекомбінантним з посиленою целюлозолітичною активністю та може рости в аеробних та анаеробних умовах. Необхідно було дослідити вплив різних факторів на процес. Культивування проводили при 30, 37, 50°C при рН 7 з глюкозою (5 г/л) в якості субстрату. Оптимальною температурою серед них була 37°C, при 50°C росту фактично не було, а при 30°C ріст був подібний до оптимального, проте лаг-фаза була довшою. рН перевіряли при оптимальній температурі серед значень 5, 6, 7. Оптимальним рН, який дав найбільший ріст, було 7,0. *Paenibacillus sp.* САА11 було досліджено на предмет його здатності використовувати репрезентативну гексозу (глюкоза), пентозу (ксилозу) та дисахарид (целобіозу), отримані з лігноцелюлозної біомаси. Всі ці субстрати бактерія могла використовувати. Час культивування в усіх дослідках був 48 год. Відповідно, в аеробних умовах використання целюлози було 1,75 г/л, тоді як до цього результату не було. В анаеробних умовах рекомбінантний штам споживав у 1,83 рази більше целюлози (5,10 г/л) і виробляв у 5 разів більше етанолу (0,65 г/л) та в 5 разів більше загальної кількості кислот (1,6 г/л) порівняно з контрольними показниками. При цьому біомаса зросла в 2,73 рази [59].

Багато досліджень присвячено біодеградації ксилози. Однією з бактерій, здатних до цього, є *Paenibacillus polymyxa* SC2-M1. Метою досліджень було підвищення використання *P. polymyxa* SC2-M1 ксилози під час культивування. Для цього зробили промотор *P<sub>LH-77</sub>*, який експресували в бактерію методом електротрансформації. Вирощували бактерію на кількох поживних середовищах – LB, Difco, Ashby при постійному струшуванні та температурі 37°C. В отриманому штамі CQM1-XI (з експресованим геном) на середовищі LB кількість спожитої ксилози збільшилася на 2,5 г/л протягом 78 годин періоду бродіння, а біомаса при цьому зросла на 42%. Тим часом рівень виробництва лактату та ацетату зріс відповідно вдвічі та на 0,1 г/л. За допомогою репортерних генів флуоресценції було досліджено також, що даний ген впливає на ефективність експресії інших генів в *Paenibacillus polymyxa* [60].

*Paenibacillus glucanolyticus* SLM1 нещодавно виділений з чорного луку штам, який може метаболізувати лігноцелюлозні компоненти. При чому також може рости в аеробних та анаеробних умовах. Відповідно метою досліджень була оптимізація середовища та умов культивування для збільшення біодеградації та посилення виробництва молочної кислоти, яку синтезує бактерія. Оптимізацію середовища проводили методами Plackett-Burman та Central Composite Design з методологією відповідної поверхні (RSM). Оптимальне аеробне середовище було 6 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 г/л  $\text{NaCl}$ , 0,15 г/л  $\text{CaCl}_2$ , 10 мл/л 0,5% розчину тіаміну, 10 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10 г/л триптон, 20 г/л дріжджового екстракту і 15,45 об.% чорного лікеру у  $\text{DI H}_2\text{O}$ . Оптимальне молочнокисле середовище містило 6 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,10 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 г/л  $\text{NaCl}$ , 0,15 г/л  $\text{CaCl}_2$ , 10 мл/л 0,5% розчин тіаміну, 10 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 10 г/л триптон, 20 г/л дріжджового екстракту та 20 об./об. % чорного лікеру в  $\text{DI H}_2\text{O}$ . Час генерації зменшено з 4,1 год до 2,1 год в оптимізованих середовищах. Вирощування проводили 63 год при  $37^\circ\text{C}$ , pH 9 та перемішуванні 200 об/хв. Накопичення біомаси в оптимізованих середовищах становило  $3,6 \pm 0,40$  г/л порівняно з  $1,8 \pm 0,70$  г/л в неоптимізованих середовищах. При анаеробному культивуванні продукування молочної кислоти було на рівні  $0,26 \pm 0,05$  г/л [61].

Є також розробки, присвячені обробці води. В 2013 році досліджували використання *Paenibacillus* як біофлокулянта для попереднього очищення води перед використанням у промисловості. Біофлокулянт складався з глюкози, глюкуронової кислоти, манози та ксилози. *Paenibacillus elgii* B69 культивували 96 год при  $30^\circ\text{C}$ , 200 об/хв та підживленні сахарозою. Максимальне виробництво біофлокулянту було спочатку оптимізовано за моделлю ANOVA, а потім підтверджено експериментально, становило близько 25,63 г/л, досягнуте при сахарозі 51,35 г/л, пептоні 6,78 г/л та дріжджовому екстракті 0,47 г/л. Виділяли біофлокулянт наступним чином – нагрівали, центрифугували, потім осаджували етанолом, центрифугували, повторювали промивання етанолом ще кілька разів, після чого ліофілізували продукт [62].

Одним зі способів для покращення екологічного стану навколишнього середовища стало дослідження щодо впливу пробіотику на основі *Paenibacillus* 79R4

на виділення метану свійськими жуйними тваринами. Було досліджено, що даний штам має здатність до підвищеного перетворення нітритів, що зменшує викиди метану. Для одержання біомаси бактерію вирощували на середовищі з рН 6,8 при 39°C протягом 24 годин. Отриману біомасу можна використовувати для подальшого вирощування та споживання нітриту [63].

Використання біомаси бактерій *Paenibacillus* дуже різноманітне, узагальнена інформація щодо способів культивування наведено в *табл. 2.1*.

**Нарощування біомаси різних видів *Raenibacillus* для використання в сільському господарстві**

<b>Біологічний агент</b>	<b>Середовище для культивування</b>	<b>Умови культивування</b>	<b>Біомаса, г/л</b>	<b>Література</b>
<i>P. lentimorbus</i> NRRL B-30488	NB	7 діб, 28°C, pH 5, 100 об/хв	$1 \times 10^9$ КУО/мл	[46]
<i>P. macerans</i> MB02-992	NBRIP, доповнений 5 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ або $\text{CaHPO}_4$ або 5 мл/л інозитулу гексафосфату	5 діб, 28°C, pH 7, 130 об/хв	$10^7$ КУО/мл	[53]
<i>P. polytuxa</i> MB02-1007	NBRIP, доповнений 5 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ або $\text{CaHPO}_4$ або 5 мл/л інозитулу гексафосфату	5 діб, 28°C, pH 7, 130 об/хв	$10^7$ КУО/мл	[53]
<i>P. polytuxa</i> MB02-226	NBRIP, доповнений 5 г/л $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ або $\text{CaHPO}_4$	5 діб, 28°C, pH 7, 130 об/хв	$10^7$ КУО/мл	[53]
<i>P. polytuxa</i> HT16	Глюкоза 10 г/л; пептон 5 г/л; дріжджовий екстракт 5 г/л; NaCl 10 г/л.	48 год, 37°C, pH 6,5-7,0, 150 об/хв	34 г/л	[41]
<i>P. polytuxa</i> schc 33	LG, доповнене дріжджовим екстрактом 5 г/л та глюкозою 2 г/л	24 год, 30°C, pH 5, 200 об/хв	1,03 г/л (10,5 год)	[42]

<i>P. polymyxa</i> Кр10	М17	24 год, 37°C, 150 об/хв	8,03 log КУО/мл	[48]
<i>Paenibacillus sp.</i> PNM200	LB, доповнене NaCl 0,85%	48 год, 25°C, рН 7,0, 120 об/хв	1 × 10 <sup>6</sup> КУО/мл	[47]
<i>P. ehimensis</i> ІВ-Х- b	РЕ з джерелом вуглецю 0,5% картопляного крохмалю або 0,5% колоїдного хітину	60 год, 36°C, рН 6,0, 160 об/хв	10 г/л	[44]
<i>P. polymyxa</i> П	Гороховий агар	24 год, 28°C	10,2-11,5 млн. КУО/мл	[50]
<i>P. polymyxa</i> CR1	1/5 NPT	24 год, 28°C	-	[51]
<i>P. polymyxa</i> KB	м'яса – 40 г/л; кукурудзяний екстракт – 20 г/л; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 038 г/л; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,5 г/л; MgSO <sub>4</sub> – 0,5 г/л; NaCl – 0,5 г/л; CaCO <sub>3</sub> – 3–5 г/л; NaOH – 1-2 г/л.	3 доби, 28°C, 200 об/хв	6,5 млрд. кл./мл	[55]
<i>P. validus</i> PR-P1	мінімальне середовище з додаванням 10 мг/л фенантрону	3 доби, 28°C, 200 об/хв	-	[57]

<p><i>Paenibacillus glucanolyticus</i> SLM1</p>	<p>6 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 г/л NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 г/л NaCl, 0,15 г/л CaCl<sub>2</sub>, 10 мл/л 0,5% розчину тіаміну, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 г/л триптон, 20 г/л дріжджового екстракту і 15,45 об.% чорного лікеру у DI H<sub>2</sub>O</p>	<p>63 год, 37°C, pH 9, 200 об/хв</p>	<p>3,6±0,40 г/л</p>	<p>[61]</p>
<p><i>Paenibacillus glucanolyticus</i> SLM1</p>	<p>6 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,10 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 г/л NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 г/л NaCl, 0,15 г/л CaCl<sub>2</sub>, 10 мл/л 0,5% розчин тіаміну, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 г/л триптон, 20 г/л дріжджового екстракту та 20 об./об. % чорного лікеру в DI H<sub>2</sub>O</p>	<p>63 год, 37°C, pH 9, 200 об/хв</p>	<p>3,6±0,40 г/л</p>	<p>[61]</p>
<p><i>P. elgii</i> B69</p>	<p>Сахароза 51,35 г/л, пептон 6,78 г/л, екстракт дріжджів 0,47 г/л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 г/л, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,6 г/л</p>	<p>96 год, 30°C, 200 об/хв</p>	<p>25,63 г/л</p>	<p>[62]</p>

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

### 3.1. Потреба у цільовому продукті

2,3-бутандіол, або ж бутиленгліколь, широко використовують у промисловості, а саме таких галузях, як у фармацевтичній, парфумерно-косметичній, текстильній, хімічній, харчовій, біотехнологічній та паливній галузях. Можливі його застосування включають використання в якості розчинника, ароматизатору, консерванту, ПАР, попередника для різних пластмас, смол, пестицидів, полімерів, різних речовин, що використовують в паливній галузі (наприклад, МЕК та бутен), а також як проміжного продукту для синтезу цінних речовин [1, 2, 4].

Таке широке використання зумовлено безпечністю, гіпоалергенністю, властивістю зберігати вологу, посилювати дію інших речовин, а також можливістю синтезу з 2,3-бутандіолу інших цінних сполук [2].

Всі зазначені галузі актуальні на даний час й активно розвиваються. Згідно офіційної статистики, загальне виробництво промисловості зазнало спаду на початку епідемії в 2020 році, проте останні дванадцять місяців кількість промислової продукції зростає відповідно до попереднього місяця. Крім того, не зважаючи на загальний спад, у 2021 році приріст є також по відношенню до відповідного місяця минулого року, що також є гарним показником для вітчизняного виробництва [64].

Якщо ж розглядати по видам діяльності, в яких можливе застосування 2,3-бутандіолу, то за 2021 рік видно наступну тенденцію:

- Виробництво консервованих продуктів харчування, прянощів та приправ, текстильне виробництво, виробництво хімічної продукції (в тому числі пестицидів, косметичної та парфумерної продукції) та пластмас постійно збільшується;
- Виробництво продуктів нафтопереробки та фармацевтичної продукції зазнали невеликого спаду за останній час [65].

Індекс промислової продукції за видами діяльності та основними промисловими групами, де можливе застосування 2,3-бутандіолу, згідно статистики за січень-березень 2021 року представлено в *табл. 3.1* [65]:

## Індекс промислової продукції за перший квартал 2021 року

<i>Промисловість</i>	<i>Березень 2021р. до лютого 2021р.</i>	<i>Березень 2021р. до березня 2020р.</i>	<i>Січень-березень 2021р. до січня- березня 2020р.</i>
Консервування фруктів і овочів	108,9	102,2	105,0
Виробництво прянощів і приправ	124,6	108,8	97,5
Текстильне виробництво	114,4	117,3	101,7
Виробництво коксу, продуктів нафтоперероблення	102,1	97,1	92,8
Виробництво хімічних речовин і хімічної продукції	116,4	114,3	112,8
Виробництво основної хімічної продукції, добрив і азотних сполук, пластмас і синтетичного каучуку в первинних формах	112,6	114,2	115,7
Виробництво пестицидів та іншої агрохімічної продукції	287,8	346,4	291,6
Виробництво фарб, лаків і подібної продукції, друкарської фарби та мастик	118,8	107,3	102,2
Виробництво мила та мийних засобів, засобів для чищення та полірування, парфумних і косметичних засобів	104,8	93,7	97,8
Виробництво основних фармацевтичних продуктів і фармацевтичних препаратів	94,0	81,8	98,7
Виробництво пластмасових виробів	118,3	101,6	99,7

Щодо виробництва 2,3-бутандіолу, нині використовують:

1. хімічний синтез з продуктів нафтопереробки;
2. біотехнологічне отримання з використанням мікроорганізмів (природних та рекомбінантних штамів) [1].

Нині 2,3-бутандіол виробляють у рідкій формі або твердій у вигляді кристалів [1]. На ринку України вітчизняного виробництва бутиленгліколю немає, виробляють лише 1,4-бутандіол. 2,3-бутандіол привозять з-за кордону, з Китаю. Виробники представлені в *табл. 3.2*:

*Таблиця 3.2*

### **Закордонні постачальники 2,3-бутандіолу**

<i>Виробник</i>	<i>Форма випуску</i>	<i>Ціна, грн*</i>
Shandong Zhi Shang Chemical	каністри по 25 кг	675
Qingdao Sigma Chemical	каністри по 25 кг	205
Shanghai ZZ New Material Tech	мішки по 25 кг	587
Jinan Finer Chemical	мішки по 25 кг	540
Jinan Richnow Chemical	каністри по 25 кг	648
Shanghai Ruizheng Chemical Technology	каністри по 25 кг	90

*Примітка:* ціна наведена за 1 кг, станом на травень 2021 року згідно <https://russian.alibaba.com/>

Оскільки нове виробництво не може забезпечити всю промисловість бутиленгліколем, обираємо вузьку направленість. Повертаючись до статистичних даних, хімічна промисловість має найкращі показники щодо приросту обсягів виробництва. Виробництво пестицидів зазнало найбільшого приросту в цьому році, проте ця галузь сезонна і, зважаючи на нові реформи та зменшення обсягів сільського господарства, не є такою перспективною [64].

Перспективним направленням хімічної промисловості є косметично-парфумерна промисловість. В косметичній промисловості це вироби для догляду за шкірою, зокрема, креми, емульсії та інші зволожуючі засоби. 2,3-бутандіол почали використовувати в косметичних виробках відносно недавно, в основному це виробники корейської косметики. В Україні це поки що не дуже розвинуто, тому

імпорт для косметичної галузі не розглядаємо. Слід зазначити, що в майбутньому, при розширенні виробництва, дана галузь є дуже перспективною і може бути використана для експорту.

Загалом світова парфумерна промисловість зростає приблизно на 10% з кожним роком. Розглядаючи парфумерну промисловість, промислового виробництва парфумів в Україні немає, проте в Україні виробляють значну кількість ефірних масел, які потім використовують в різних галузях. Розділення за сегментами представлено на *рис.3.1* [3].

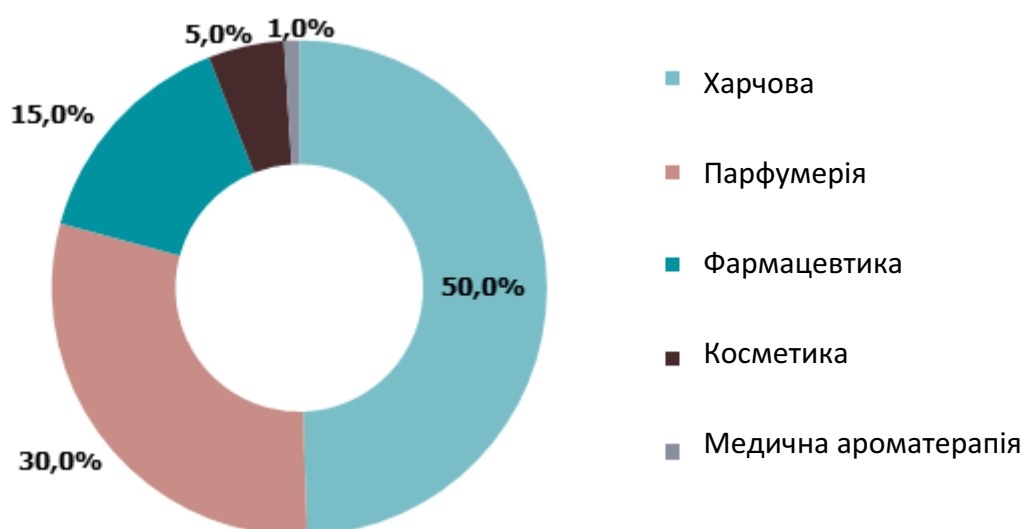


Рис. 3.1. Ринок ефірних масел за сегментами

У парфумерній промисловості 2,3-бутандіол використовують в якості розчинника при екстракції. Використовують також інші розчинники, типові розчинники представлені в *табл. 3.3* [2]:

Таблиця 3.3

### Розчинники в парфумерній галузі

Розчинник	Середня ціна, грн*
Гексан	60
Хлороформ	76
Ефір петролейний	250
Діетиловий ефір	800
2,3-бутандіол	392

*Примітка:* ціна наведена за 1 кг при випуску у формі розчину, станом на травень 2021 року згідно <https://russian.alibaba.com/> та <https://prom.ua/>

З табл. 3.3 видно, що 2,3-бутандіол є одним з дорогих розчинників в косметично-парфумерній галузі. Незважаючи на це, перевага використання 2,3-бутандіолу в косметично-парфумерній промисловості зумовлена його гіпоалергенністю та властивістю пригнічення розвитку патогенної мікрофлори. Бутиленгліколь не подразнює шкіру, не токсичний, має досить легку структуру і тому не викликає змін на клітинному та генетичному рівнях. Доводом щодо переваги використання саме 2,3-бутандіолу є проведення досліджень різними лабораторіями та підтвердження безпеки спирту, а також використання його при виробництві дитячої косметики та косметики для проблемної і чутливої шкіри [2].

Виробництво ефірних масел передбачає використання багатьох різних олій. Звернувшись до світової статистики виробництва певних видів масел, виявили, що Україна забезпечує світовий ринок в основному трьома видами масел: м'ятною, лавандовою та лавандиновою [66]. Зауважимо, що невеликий відсоток інших масел також виготовляють. Зважаючи на загальну потребу в ефірних маслах [3], відсоток використання масел в парфумерії (30%) [3] та дані щодо співвідношення використання розчинника [64] розраховуємо річну потребу в бутиленгліколі.

Річна потреба в 2,3-бутандіолі в обраній галузі на рік в Україні представлена в табл. 3.4:

Таблиця 3.4

#### Потреба в 2,3-бутандіолі

Олія	Загальна потреба, кг*	Потреба в парфумерії, кг*	Співвідношення масло:розчинник (70% 2,3-бутандіолу), кг**	70% 2,3-бутандіол, кг	2,3-бутандіол, кг
М'ятна	500 000	60 000	1:4	240 000	168 000
Лавандинова		25 000	1:3	75 000	52 500
Лавандова		35 000	1:3	105 000	73 500
<b>Разом:</b>					294 000

Примітка: дані наведені відповідно до літературних джерел: \* - [3], \*\* - [67].

### 3.2. Розрахунок потужності виробництва 2,3-бутандіолу

Згідно з даними 2021 року в Україні виробників 2,3-бутандіолу немає, спирт поставляють імпортні виробники (табл. 3.2). Також, в обраній галузі використовують й інші розчинники (табл. 3.3). З урахуванням того, що немає даних щодо кількості 2,3-бутандіолу, який поставляється та кількості проданого 2,3-бутандіолу, робимо приблизний розрахунок.

Оскільки на ринку представлено не так багато 2,3-бутандіолу різного виробництва, 2,3-бутандіол має перевагу перед іншими розчинниками, а потреба в парфумерії збільшується кожний рік, приймаємо, що нове виробництво буде забезпечувати 20% потреби парфумерії в розчинниках.

Тоді, необхідна кількість 2,3-бутандіолу:

$$G_{\text{ін}} = 294\,000 \times 0,2 = 58\,800 \text{ кг.}$$

Враховуючи, що продуцент 2,3-бутандіолу *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 синтезує 111 г/л 2,3-бутандіолу [5], для синтезу 58 800 кг необхідно:

$$V = 58\,800 \times 1000 / 111 = 529\,729,73 \text{ л культуральної рідини.}$$

Враховуючи втрати під час виділення та очищення 2,3-бутандіолу, що загалом становлять 10%, необхідно отримати культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 529\,729,73 / 0,9 = 588\,588,59 \text{ л.}$$

### 3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера

Отже, для забезпечення 20% потреби в 2,3-бутандіолі впродовж року в Україні, необхідно 588 588,59 л культуральної рідини ( $V_{\text{кр}}$ ).

Для розрахунку кількості стадій підготовки посівного матеріалу необхідно порахувати необхідність в культуральній рідині за один цикл роботи.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ( $T_{\text{рд}}$ ) 70, в інший час обладнання буде використовуватись для виробництва інших продуктів *Paenibacillus polymyxa* DSM 365.

Тож кількість отриманого продукту за добу ( $V_{\text{д}}$ ) буде:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 588\,588,59 / 70 = 8\,408,4 \text{ л.}$$

Кількість продукту за цикл:

$V_{\text{ц}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 8\,408,4 \times 64) / 24 = 24\,664,64$  л/цикл, де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, це виробничий біосинтез 54 год та підготовка ферментера 10 год,  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (прийнято 1,1).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 24 664,64 л/цикл має становити:

$V_{\text{р}} = V_{\text{ц}} / K_{\text{зап}} = 24\,664,64 / 0,6 = 41\,107,7$  л, де  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення ферментера, = 0,6.

Найближчий за розміром ферментер становить  $V_{\text{ф}} = 50\,000$  л =  $50$  м<sup>3</sup>.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{\text{зап}} = V_{\text{ц}} / V_{\text{ф}} = 24\,664,64 / 50\,000 = 0,5$ , це не перевищує заданого значення.

### **3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 24\,664,64$  л культуральної рідини.

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

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 24\,664,64 / (1 - 0,1) = 27\,405,2$  л, де  $E_{\text{ф}}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюємо у ферментері з робочим об'ємом  $V_{\text{роб.1}} = 27\,405,2$  л.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{\text{ф}}$ ), що становить  $V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 27\,405,2 / 0,6 = 45\,675,3$  л.

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер  $V_{\text{сф}} = 50\,000$  л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 27\,405,2 / 50\,000 = 0,55$ .

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1+X_{ф}) = 27\,405,2 / (1+0,1) = 24\,913,8$  л, де  $X_{ф} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу  $V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 27\,405,2 - 24\,913,8 = 2\,491,4$  л.

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати в інокуляторі.

Враховуємо втрати під час краплевиносу:

$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1-E_{ф}) = 2\,491,4 / (1-0,1) = 2\,768,2$  л, де  $E_{ф}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм інокулятора ( $V_{ф1}$ ), що становить  $V_{ф1} = V_{роб.2} / K_{зап} = 2\,768,2 / 0,6 = 4\,613,7$  л.

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер  $V_{сф2} = 5\,000$  л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап2} = V_{роб.2} / V_{сф2} = 2\,768,2 / 5\,000 = 0,55.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1+X_{ф}) = 2\,768,2 / (1+0,1) = 2\,516,5$  л, де  $X_{ф} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 2\,768,2 - 2\,516,5 = 251,7 \text{ л.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати в інокуляторі.

Враховуємо втрати під час краплевиносу:

$V_{роб.3} = V_{пм2} / (1-E_{ф}) = 251,7 / (1-0,1) = 279,7$  л, де  $E_{ф}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм інокулятора ( $V_{\text{ф}2}$ ), що становить  $V_{\text{ф}2} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 279,7 / 0,6 = 466,2$  л.

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер  $V_{\text{сф}3} = 500$  л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап}3} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сф}3} = 279,7 / 500 = 0,56.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{\text{пс}3} = V_{\text{роб.3}} / (1+X_{\text{ф}}) = 279,7 / (1+0,1) = 254,3$  л, де  $X_{\text{ф}} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

$$\text{Кількість посівного матеріалу } V_{\text{пм}3} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс}3} = 279,7 - 254,3 = 25,4 \text{ л.}$$

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати в інокуляторі.

Враховуємо втрати під час краплевиносу:

$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм}3} / (1-E_{\text{ф}}) = 25,4 / (1-0,1) = 28,2$  л, де  $E_{\text{ф}}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  розраховуємо можливий геометричний об'єм інокулятора ( $V_{\text{ф}3}$ ), що становить  $V_{\text{ф}3} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 28,2 / 0,6 = 47$  л.

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер  $V_{\text{сф}4} = 50$  л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап}4} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сф}4} = 28,2 / 50 = 0,56.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{пс4} = V_{роб.4} / (1+X_{ф}) = 28,2 / (1+0,1) = 25,64$  л, де  $X_{ф} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу  $V_{пм4} = V_{роб.4} - V_{пс4} = 28,2 - 25,64 = 2,56$  л або 2 560 мл.

Кількість інокуляту для засіву інокулятора  $V_{пм4} = 2\ 560$  мл можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме  $N_{колб} = V_{пм4} / (V_{колб} \times K_{зк}) = 2\ 560 / (750 \times 0,2) = 17,1 = 18$  колб.

## РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### 4.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Використання 2,3-бутандіолу в промисловості вже давно набуло широкого поширення. На даний час він використовується в фармацевтичній, парфумерно-косметичній, текстильній, хімічній, харчовій, біотехнологічній та паливній галузях [1].

Синтез 2,3-бутандіолу можна здійснювати хімічним або ферментативним шляхом.

Хімічний синтез відбувається наступним шляхом. В ході дегідрування бутану отримують бутілен, який потім окислюють за допомогою окиснювачів (перекис водню, органічні перекиси) та каталізаторів ( $\text{Au/TiO}_2 + \text{TS-1}$ ,  $(\text{Bu}_4\text{N})_4\text{SiW}_{10}\text{O}_{36}$ ,  $\text{Ag/Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{OsO}_4$  та ін.). Останньою стадією є гідратація отриманих епоксидів, що легко проходить у кислому середовищі [4].

Хімічний синтез 2,3-бутандіолу є дорогавартісним, тому на даний час хімічний синтез не використовують, перевагу віддають синтезу за допомогою мікроорганізмів [68].

Вперше ферментативний синтез 2,3-бутандіолу здійснили у 1906 році з використанням *Klebsiella pneumoniae*. Під час Другої світової війни 2,3-бутандіол використовували для синтезу бутадієну, тому було багато розробок в області бродіння бутандіолу. Після цього проводили багато різних досліджень, а з 1970-х років, зважаючи на довгострокову перспективу зростання цін на нафту, синтез 2,3-бутандіолу біотехнологічним способом привернув до себе ще більше уваги, особливо в США, а згодом в Китаї [4].

Серйозною перевагою використання мікроорганізмів для синтезу 2,3-бутандіолу також є те, що більшість мікроорганізмів можуть використовувати велику кількість різних речовин в якості субстрату, в тому числі відходи та CO. Це дає змогу не тільки синтезувати цінний продукт, а й переробити відходи інших виробництв та покращити екологічний стан довкілля [4].

Загалом, на сьогодні існує багато бактерій, здатних перетворювати різні субстрати на 2,3-бутандіол: *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *K. pneumonia*, *K. oxytoca*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis*, *cremoris*, *oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, *Serratia marcescens*, *B. Polymyxa*, *Klebsiella terrigena*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus licheniformis*, *Aerobacter indologenes*, ризобактерія *Pseudomonas chlororaphis* Об та морські водорості *Chlamydomonas perigranulata*. Серед них частіше використовують *K. pneumonia*, *K. oxytoca* та *P. polymyxa* [4].

*K. pneumonia* та *K. oxytoca* одні з перших мікроорганізмів, які використовували для біосинтезу 2,3-бутандіолу. Перевагами їх використання є:

- Велика кількість можливих субстратів;
- Широка поширеність в природі;
- Висока стійкість до різних умов;
- Відносна простота умов культивування [4].

Але вони також мають суттєві недоліки:

- Високі концентрації побічних продуктів (ацетоїн, молочна кислота, етанол, гліцерин);
- Патогенність;
- Неспроможність перетворення полісахаридів;
- Обмеження виходу 2,3-бутандіолу;
- Складність масштабування [4, 69].

*P. polymyxa* DSM 365 єдиний представник роду, здатний синтезувати 2,3-бутандіол. Даний штам має багато переваг:

- Високий вихід 2,3-бутандіолу;
- Один з небагатьох продуцентів 2,3-бутандіолу, що здатний до анаеробного росту;
- Може синтезувати конкретний ізомер 2,3-бутандіолу;
- Незначна кількість побічних продуктів (етанол);
- Можливість масштабного виробництва;

- Використання полісахаридів як субстратів;
- Ріст на біомасі (відходах промисловості) [4, 68].

Недоліками ж є:

- Погана стійкість до природних умов;
- Відносно складне культивування [4].

Слід зазначити, що стійкість у природних умовах не має істотного значення для біотехнологічного процесу. Крім того, вибіркового синтезу може бути дуже важливим при промисловому виробництві, зважаючи на використання дороговартісного обладнання та складних процесів для розділення ізомерів.

Щодо інших типових продуцентів, велику загрозу масштабному виробництву несе їх патогенність та ріст на простих вуглеводах.

Для остаточного рішення щодо біологічного агента порівнюємо різних продуцентів 2,3-бутандіолу з метою вибору найкращого (*табл. 4.1*):

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Вихід цільового продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	Глюкоза – 70,0; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 2,0; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 10,5; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 3,3; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 6,6; MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O – 0,25; FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O – 0,05; ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O – 0,001; MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O – 0,001; CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O – 0,01; ЕДТА – 0,05.	24	30,1	37°C, немає контролю рН, перемішування 200 об/хв, рівень розчиненого кисню 1 об/об.	Guragain Y.N., & Vadlani P.V. 2,3-Butanediol production using <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724: Evaluation of biomass derived sugars and fed-batch fermentation process. <i>Process Biochemistry</i> . 2017, 58: 25–34. doi:10.1016/j.procbio.2017.05.001
<i>Enterobacter aerogenes</i> SUMI02	Глюкоза – 100; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 3; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 6,8; KCl – 0,75; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 5,35; Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 0,28; MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O - 0,26; Лимонна кислота – 0,42; Дріжджовий екстракт – 5; ZnCl <sub>2</sub> – 0,0012; CuCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O – 0,0012; MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O – 0,0012; FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O – 0,0012; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> – 0,0031.	78	38,24	37°C, рН 7,5, перемішування 200 об/хв, рівень розчиненого кисню 500 мл/хв.	Thapa L.P., Lee S.J., Park C., Kim S.W. Metabolic engineering of <i>Enterobacter aerogenes</i> to improve the production of 2,3-butanediol. <i>Biochemical Engineering Journal</i> . 2019, 143: 169–178. doi:10.1016/j.bej.2018.12.019

<p><i>Paenibacillus polymyxa DSM 365</i></p>	<p>Дріжджовий екстракт - 60,0; Сахароза – 750; MgSO<sub>4</sub> – 0,2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2; Розчин мікроелементів: FeSO<sub>4</sub> - 0,4; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,8; ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O - 0,1; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O - 0,08; CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O - 0,04; MnCl<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O – 5,0; CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O – 1,0; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O - 0,04; Біотин - 0,01.</p>	<p>54</p>	<p>111</p>	<p>37°C, рН 6,0, контролюють 12,5% NH<sub>4</sub>OH та 6,5 н. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, перемішування 500 об/хв, рівень розчиненого кисню 0,2 об/об, використовують підживлення сахарозою, початкова концентрація сахарози 55 г/л, Tween80 додають для зменшення в'язкості.</p>	<p>Häßler T., Schieder D., Pfaller R., Faulstich M., Sieber V. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by <i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365. <i>Bioresource Technology</i>. 2012, 124: 237-244. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.047</p>
--	--	-----------	------------	--	--

При порівнянні трьох різних продуцентів 2,3-бутандіолу, встановили, що біосинтез здійснюють періодичним культивуванням, а умови культивування є достатньо простими для всіх трьох мікроорганізмів-продуцентів. Тривалість культивування типового продуцента 2,3-бутандіолу – *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 складає 24 год, що на 30 год швидше від культивування *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 та на 54 год швидше від культивування *Enterobacter aerogenes* SUMI02. Проте, *P. polymyxa* DSM 365 синтезує відповідно в 3,7 та 3 рази більше цільового продукту (111 г/л) порівняно з іншими представниками.

Дана характеристика технологічного процесу є недостатньою для вибору продуцента 2,3-бутандіолу, тому порівнюємо вартість поживних середовищ для всіх біологічних агентів (табл. 4.2):

Таблиця 4.2

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента, грн/л серед.	Джерело інформації *
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	Глюкоза – 70;	30	2,1	1
	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 2,0;	42	0,084	3
	К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> – 10,5;	106,4	1,117	2
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> – 3,3;	9,8	0,032	2
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 6,6;	1	0,0066	1
	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O – 0,25;	9,66	0,002	1
	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O – 0,05;	5,04	0,000252	1
	ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O – 0,001;	36,63	0,000037	1
	MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O – 0,001;	39,5	0,00004	1
	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O – 0,01;	6,16	0,000062	2
	ЕДТА – 0,05.	60	0,003	1
Вартість 1 л середовища – 3,345 грн				
<i>Enterobacter aerogenes</i> SUMI02	Глюкоза – 100;	30	3,0	1
	КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> – 3;	42	0,126	3
	Na <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> – 6,8;	5,6	0,038	2
	KCl – 0,75;	10,9	0,008	1

	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 5,35;	1	0,00535	1
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 0,28;	9,5	0,0027	1
	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O - 0,26;	9,66	0,0025	1
	Лимонна кислота – 0,42;	90	0,0378	1
	Дріжджовий екстракт – 5;	28	0,14	2
	ZnCl <sub>2</sub> – 0,0012;	13,5	0,000016	2
	CuCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O – 0,0012;	70	0,000084	2
	MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O – 0,0012;	4,2	0,000005	2
	FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O – 0,0012;	90	0,0001	1
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> – 0,0031.	26,5	0,000082	1
	Вартість 1 л середовища – 3,361 грн			
<i>Paenibacillus polytuxa DSM 365</i>	Дріжджовий екстракт - 60,0;	28	1,68	2
	Сахароза – 750;	2,24	1,68	1
	MgSO <sub>4</sub> – 0,2;	7,5	0,0015	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 3,0;	1	0,003	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,2;	42	0,05	3
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,2;	5,6	0,0011	2
	Розчин мікроелементів – 3 мл:	3,268	0,0098	
	FeSO <sub>4</sub> - 0,4;	7,7	0,00308	1
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> - 0,8;	26,5	0,0212	1
	ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O - 0,1;	10,92	0,00109	2
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O - 0,08;	28	0,00224	2
	CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O - 0,04;	69	0,00276	1
	MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O – 5,0;	4,2	0,021	2
	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O – 1,0;	6,16	0,00616	2
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O - 0,04;	260	0,0104	2
	Біотин - 0,01.	320000	3,2	1
	Вартість 1 л середовища – 3,4254 грн			

*Примітка.* \* Ціни наведено станом на травень 2021 р. 1-<https://kiev.prom.ua> 2-

<https://russian.alibaba.com> 3-<https://www.systopt.com.ua>

Середовища для культивування всіх трьох продуцентів мають фактично однакову ціну, що не дає змоги зробити висновки на основі отриманої інформації. Для остаточного вибору біологічного агента розраховуємо умовну вартість цільового продукту та продуктивність культивування (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Узагальнення вибору біологічного агента та поживного середовища для культивування**

<b>Біологічний агент</b>	<b>Вартість 1 л середовища, грн</b>	<b>Вихід цільового продукту, г/л</b>	<b>Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г</b>	<b>Тривалість культивування, год</b>	<b>Кількість утвореного бутандіолу за годину, г/год*л</b>
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	3,35	30,1	0,11	24	1,25
<i>Enterobacter aerogenes</i> SUMI02	3,36	38,24	0,088	78	0,5
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 365	3,43	111	0,03	54	2,06

Обґрунтувавши переваги та недоліки використання різних продуцентів, обираємо продуцент 2,3-бутандіолу – *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. Вихід цільового продукту в цього мікроорганізму складає 111 г/л, що в ~3,5 рази більше в порівнянні з іншими біологічними агентами. Також, умовна вартість цільового продукту складає 0,03 грн/г, що майже в три рази менше ніж в *Enterobacter aerogenes* SUMI02, та в 3,5 рази менше ніж в *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. З боку вартості середовища всі продуценти мають приблизно однакову ціну, середовище для культивування *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 на 10 копійок дорожче, за інші два

відповідно. Кількість утворюваного 2,3-бутандіолу при використанні *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 складає 2,06 г/год\*л, що більше в 1,65 та 4,12 разів за кількість утворюваного 2,3-бутандіолу відповідно *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 та *Enterobacter aerogenes* SUMI02. Через все це вважаємо доцільним обрати *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 як найбільш вигідного біологічного агента для виробництва 2,3-бутандіолу.

#### 4.2. Розрахунок складу поживного середовища

У промислових масштабах важливим показником є концентрація виходу цільового продукту. Тому поживне середовище необхідно підбирати таким чином, щоб компоненти разом давали змогу підвищити продуктивність. Вміст компонентів поживного середовища має бути достатнім для синтезу певної кількості біомаси та цільового продукту. Вміст джерел вуглецю та азоту зазвичай різний під час отримання посівного матеріалу та під час біосинтезу. Для перевірки відповідності середовища поставленому виходу цільового продукту, проводимо розрахунок джерел вуглецю та азоту, оскільки вони визначають рівень біомаси та концентрацію продукту біосинтезу [70].

Тривалість культивування 54 год, концентрація біомаси – 51,3 г/л, концентрація 2,3-бутандіолу в середовищі – 111 г/л [5].

##### ***Розрахунок вмісту джерела вуглецю:***

1. Потреба для синтезу 2,3-бутандіолу.

Як джерело вуглецю використовуються сахароза та дріжджовий екстракт. Дріжджовий екстракт містить незначну кількість вуглецю в порівнянні з сахарозою, тому розрахунки проводимо за джерелом вуглецю – сахарозою. У 342 г сахарози міститься 144 г вуглецю (42%).

Молекулярна маса 2,3-бутандіолу 90. Вміст вуглецю складає  $4 \times 12 = 48$  г (53,33%). В 111 г спирту буде міститись 59,2 г вуглецю. Така кількість вуглецю буде міститись в  $(59,2 \times 100)/42 = 141$  г сахарози. Враховуючи, що 40% сахарози піде для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, необхідна кількість сахарози буде  $(141 \times 0,4) + 141 = 197,4$  г/л.

2. Потреба для синтезу біомаси.

У біомасі міститься 50% вуглецю, отже, 26 г становить вуглець. Така кількість вуглецю міститься в  $(26 \times 342)/144 = 62$  г сахарози. Враховуючи 40% витрат на холосте окиснення необхідно внести в середовище  $(0,4 \times 62)+62 = 86,8 \sim 87$  г/л сахарози.

Отже, загальна кількість сахарози, яку необхідно внести в середовище, становить  $197,4+87 = 284,4$  г/л  $\sim 28,5\%$ .

Внесення такої концентрації сахарози має бути дробним, тобто підживленням. Розрахунок складу підживлюючого розчину наведено нижче.

#### ***Розрахунок вмісту джерела азоту:***

В біомасі знаходиться 10% азоту, тобто це 5,13 г з 51,3 г біомаси. Спирт не містить азоту, тоді загальна потреба складає 5,13 г.

Основним джерелом азоту є дріжджовий екстракт. Дріжджовий екстракт складається з амінокислот. Склад дріжджового екстракту та вміст нітрогену наведено в табл. 4.4:

Таблиця 4.4

#### **Вміст нітрогену в дріжджовому екстракті**

Амінокислота	Вміст амінокислот в дріжджовому екстракті		Молекулярна маса	Кількість нітрогену	Вміст азоту в амінокислоті, г
	%	г			
Аспарагінова кислота	8,0	4,8	133	1	0,5
Треонін	2,3	1,38	119	1	0,16
Серин	2,7	1,62	105	1	0,22
Глутамінова кислота	11,9	7,14	147	1	0,68
Пролін	1,8	1,08	115	1	0,13
Гліцин	3,1	1,86	75	1	0,35
Аланін	5,6	3,36	89	1	0,53
Цистеїн	0,4	0,24	121	1	0,03

Валін	3,8	2,28	117	1	0,27
Метіонін	0,7	0,42	149	1	0,04
Ізолейцин	4,7	2,82	131	1	0,3
Лейцин	3,1	1,86	131	1	0,2
Тирозин	1,4	0,84	181	1	0,06
Фенілаланін	1,8	1,08	165	1	0,09
Лізін	6,8	4,08	146	2	0,78
Гістидин	1,5	0,9	155	3	0,24
Аргінін	1,3	0,78	174	4	0,25
Діаміновалеріанова кислота	0,3	0,18	132	2	0,04
<b>Разом:</b>	61,2	36,72	2385	25	<b>4,87</b>

В 60 г дріжджового екстракту міститься 4,87 г азоту.

Крім дріжджового екстракту, нітроген міститься також в сульфаті амонію. В 132 г сульфату амонію міститься 28 г азоту, тоді в 3 г буде  $(3 \times 28)/132 = 0,64$  г азоту.

Загальна кількість азоту, що поступає з поживного середовища:  $4,87 + 0,64 = 5,51$  г, чого достатньо для синтезу зазначеної кількості біомаси.

В середовищі присутні також всі мікроелементи, які необхідні клітині в дуже малих кількостях. Джерелами елементів є як органічні, так і неорганічні сполуки.

Отже, компонентів поживного середовища у вказаній кількості достатньо для продукування зазначеної кількості 2,3-бутандіолу та біомаси для його синтезу.

### 4.3. Обґрунтування способу культивування

Вибір правильних умов культивування має велике значення для синтезу 2,3-бутандіолу бактеріями *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. Оптимізація умов біосинтезу дає змогу зменшити кількість побічних продуктів та підвищити синтез біомаси та цільового продукту [5].

Для найбільш ефективного культивування та синтезу цільового продукту є необхідними наступні умови:

- Глибинне культивування – біологічний агент є факультативним анаеробом та може засвоювати лише розчинний кисень. Тому для забезпечення необхідних умов використовують глибинне культивування [5].
- Тривалість культивування 54 год – забезпечує максимальний вихід 2,3-бутандіолу. Біомаса досягає піку раніше (48 год), продукт метаболізму накопичується ще впродовж 6 год, після чого, його кількість трохи зменшується [5].
- Аерація 0,2 об/об та перемішування 500 об/хв – необхідні для підвищення ефективності культивування *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. При таких умовах збільшується вихід 2,3-бутандіолу та не утворюється ацетоїн, який інгібує синтез цільового продукту [5].
- Температура 37°C – *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 – представник мезофілів, може рости при температурах до 45°C, але оптимальною температурою, тобто температурою, при якій буде найбільший приріст біомаси та продуктів біосинтезу, є 37°C. Також така температура попереджує інгібування синтезу 2,3-бутандіолу при додаванні піногасника [5].
- рН 6,0 – такий показник є оптимальним для ефективного росту біомаси та синтезу 2,3-бутандіолу [5].
- Періодичне культивування з підживленням – періодичне культивування дає змогу отримати цільовий продукт високого ступеня чистоти та забезпечити асептичні умови культивування. Підживлення дає змогу збільшити вихід цільового продукту та біомаси та не дати великим концентраціям компонентів поживного середовища інгібувати ріст біомаси та біосинтез 2,3-бутандіолу [5].
- Піногасник Tween80 2 мл/л – піногасник є необхідним при культивуванні *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. Важливою є кількість піногасника, яку додають в поживне середовище. Зазначена концентрація є оптимальною для

піногасіння та для відсутності інгібування нарощування біомаси та синтезу цільового продукту [5].

#### 4.4. Обґрунтування типу ферментера

Вибір біореактору ґрунтується на можливості апарату забезпечити необхідні умови культивування, а саме температуру, рН, аерацію та перемішування, можливість підживлення. Важливими також є можливість регулювання параметрів, дообладнання та зміни певних елементів конструкції.

Важливим є вибір типу мішалки, яка забезпечить гарне перемішування культуральної рідини. В даному випадку це фрезерна мішалка (рис. 4.1).

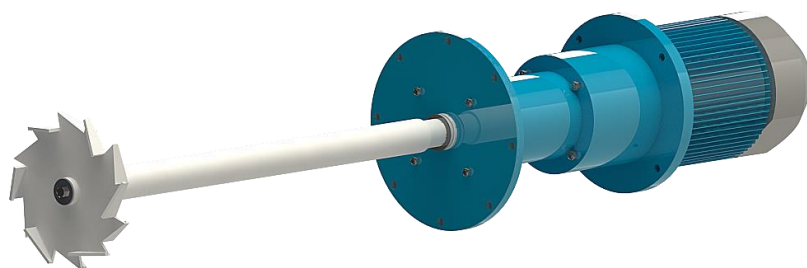


Рис. 4.1. Фрезерна мішалка

Вона працює за високих швидкостей та підходить для в'язких середовищ, що є актуальним, оскільки 2,3-бутандіол в'язкий і зі збільшенням його концентрації буде збільшуватись в'язкість середовища. Фрезерна мішалка має низьку енергоємність та забезпечує інтенсивне перемішування. Зважаючи на використання біореактору великого об'єму, можна установити кілька додаткових фрезерів, що також збільшить ефективність перемішування [71].

Для забезпечення ефективного культивування підійде промисловий біореактор Solaris Biotechnology (Італія) серії I (I-series). Біореактори зазначеної серії призначені для масштабного виробництва, пов'язаного з культивуванням мікроорганізмів. Вони виготовлені з нержавіючої сталі високої якості, обладнані всіма необхідними датчиками та додатковим обладнанням. Можлива заміна багатьох елементів,



Рис. 4.2. Industrial Scale Bioreactor I-Series компанії Solaris Biotechnology

будова клапанів забезпечує максимальну стерильність при подачі матеріалів в біореактор. Також, виробник присвятив увагу легкому доступу до різних частин апарату, що видно на *рис. 4.2* [72].

#### 4.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого культивування *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 з метою синтезу 2,3-бутандіолу використовують поживне середовище наступного складу (г/л):

- Дріжджовий екстракт - 60,0;
- Сахароза – 750;
- $MgSO_4$  – 0,2;
- $(NH_4)_2SO_4$  – 3,0;
- $KH_2PO_4$  – 1,2;
- $Na_2HPO_4$  – 0,2 та розчин мікроелементів:
- $FeSO_4$  – 0,4;
- $H_3BO_3$  – 0,8;
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,1;
- $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  – 0,08;
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,04;
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 5,0;
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 1,0;
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 0,04;
- Біотин – 0,01 [5].

Зазначимо, що на етапах підготовки посівного матеріалу не використовують  $Na_2HPO_4$  та додають менші кількості сахарози (60 г/л) та дріжджового екстракту (30 г/л) [5].

Для забезпечення ефективного процесу в посівних апаратах та ферментері всі солі стерилізують разом, а щоб не було утворення нерозчинних комплексів солей, рН розчину з солями доводять до значення 4-4,5 за допомогою 6,5 нормального розчину  $H_3PO_4$ . Потім, перед культивуванням, розчином 12,5%  $NH_4OH$  рН доводять до 6,0,

при якому й відбувається біосинтез та синтез цільового продукту. Кількість титрувальних розчинів визначають як 2 мл на 1 л середовища, але готують з запасом. Кількість титрувальних розчинів для різних етапів доферментаційних процесів та ферментації представлено в *табл. 4.5*:

*Таблиця 4.5*

**Кількість титрувальних розчинів для різних об'ємів поживного середовища**

<i>Об'єм середовища, л</i>	<i>Об'єм 6,5 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, мл</i>	<i>Об'єм 12,5% NH<sub>4</sub>OH, л</i>
25,64	52	52
254,3	510	510
2 516,5	5 050	5 050
24 913,8	50 л	50 л

Відповідно до *табл. 4.5* робимо висновок, що приготування титрувальних розчинів для підготовки посівного матеріалу здійснюють в колбах, а стерилізацію амонію гідроксиду проводять фільтруванням з використанням гладкого фільтрувального паперу [73].

Для етапу виробничого біосинтезу обидва розчини готують відповідно в двох збірниках об'ємом по 100 л, розчин амонію гідроксиду стерилізують гострою парою 40 хв при температурі 131°C.

Враховуючи, що мікроелементи містяться у дуже малих кількостях, готують їх окремо концентрованим розчином та додають після стерилізації поживного середовища на всіх етапах, крім етапу виробничого біосинтезу. Концентрація мікроелементів у концентрованому розчині: FeSO<sub>4</sub> – 0,4 г/л, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,8 г/л, ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O – 0,1 г/л, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O – 0,08 г/л, CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O – 0,04 г/л, MnCl<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O – 5,0 г/л, CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O – 1,0 г/л, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O – 0,04 г/л, біотин – 0,01 г/л.

Зважаючи на те, що кількість культуральної рідини велика на етапах підготовки посівного матеріалу та на етапі виробничого біосинтезу, вважаємо доцільним кратно збільшувати вміст розчину мікроелементів в наступних етапах після культивування в колбах на качалці.

Вміст розчину мікроелементів на різних етапах підготовки посівного матеріалу вказано в *табл. 4.6*.

*Таблиця 4.6*

**Вміст розчину мікроелементів для різних об'ємів поживного середовища**

<i>Об'єм середовища, л</i>	<i>Об'єм розчину мікроелементів, мл</i>
2,56	3
25,64	30
254,3	300
2 516,5	3 л
Разом:	3,333 л

Даний запасний розчин готують в колбі на 10 л, стерилізують холодною стерилізацією (фільтруванням) з використанням фільтру з порами діаметром 0,22 мкм [73]. Готовий стерильний розчин зберігають в лабораторії та необхідну кількість додають на відповідному етапі безпосередньо перед культивуванням.

Необхідним також є приготування та стерилізація піногаснику. В даному випадку використовують Tween80, який розводять в кількості 0,1 мл концентрату на 1 мл води. Використовують піногасник на етапі виробничого біосинтезу та додають в кількості 2 мл/л (загальна кількість 56 л), що є оптимальним для піногасіння та не інгібує синтез 2,3-бутандіолу [5]. Розведення проводять під час стерилізації, наступним чином: в фільтраційну установку почергово подають рівноважні порції піногаснику та води. Стерилізують Tween80 ультрафільтрацією з використанням фільтру з порами діаметром 0,22 мкм [74]. Оскільки об'єм великий, стерилізацію проводять системою для мікрофільтрації УФ-201, що дає змогу автоматизувати процес та збільшити ефективність ультрафільтрації [75]. При цьому також використовують два збірники об'ємом по 100 л, один для зберігання піногасника до стерилізації, другий – вже після стерилізації.

На етапі біосинтезу використовують підживлюючий розчин сахарози. Для точного підживлення розраховуємо вміст порцій підживлення.

У складі поживного середовища кількість сахарози зазначена в кількості 750 г/л. Кількість підживлюючого розчину готують з такої пропорції. Згідно розрахунку поживного середовища, потреба складає 285 г/л сахарози. Зважаючи на великий об'єм підживлюючого розчину, його готують в збірнику об'ємом 32 м<sup>3</sup> та стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112°C [5].

Розрахунок порцій підживлюючого розчину проводимо з потреби.

Початкова концентрація сахарози в середовищі складає 55 г/л. В якості підживлюючого розчину необхідно внести  $285 - 55 = 230$  г/л сахарози. Перше підживлення необхідно зробити через 8 годин, потім друге і третє через 6 годин кожне. Наступні підживлення залежать від потреби. Підживлення здійснюють 40% розчином сахарози в кількості 70 мл/л поживного середовища [5].

В 70 мл підживлюючого розчину міститься  $(70 \times 40)/100 = 28$  г сахарози. Розраховуємо необхідну кількість підживлень:  $230/28 = 8,2 = 9$  підживлень.

Розрахунок потреби в підживленні сахарозою після двадцятої години культивування здійснюємо згідно графіків приросту біомаси (рис. 4.3) та синтезу 2,3-бутандіолу (рис. 4.4):

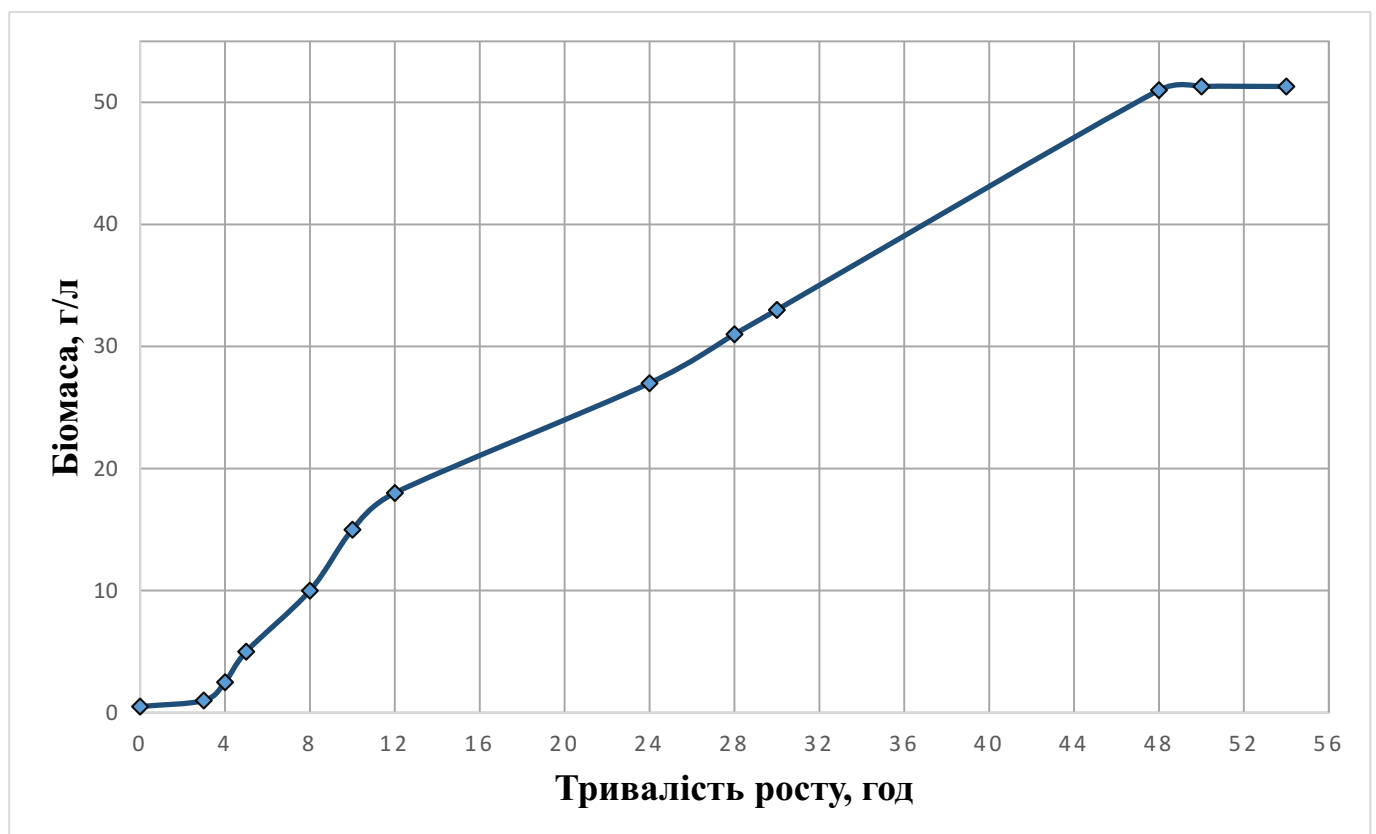
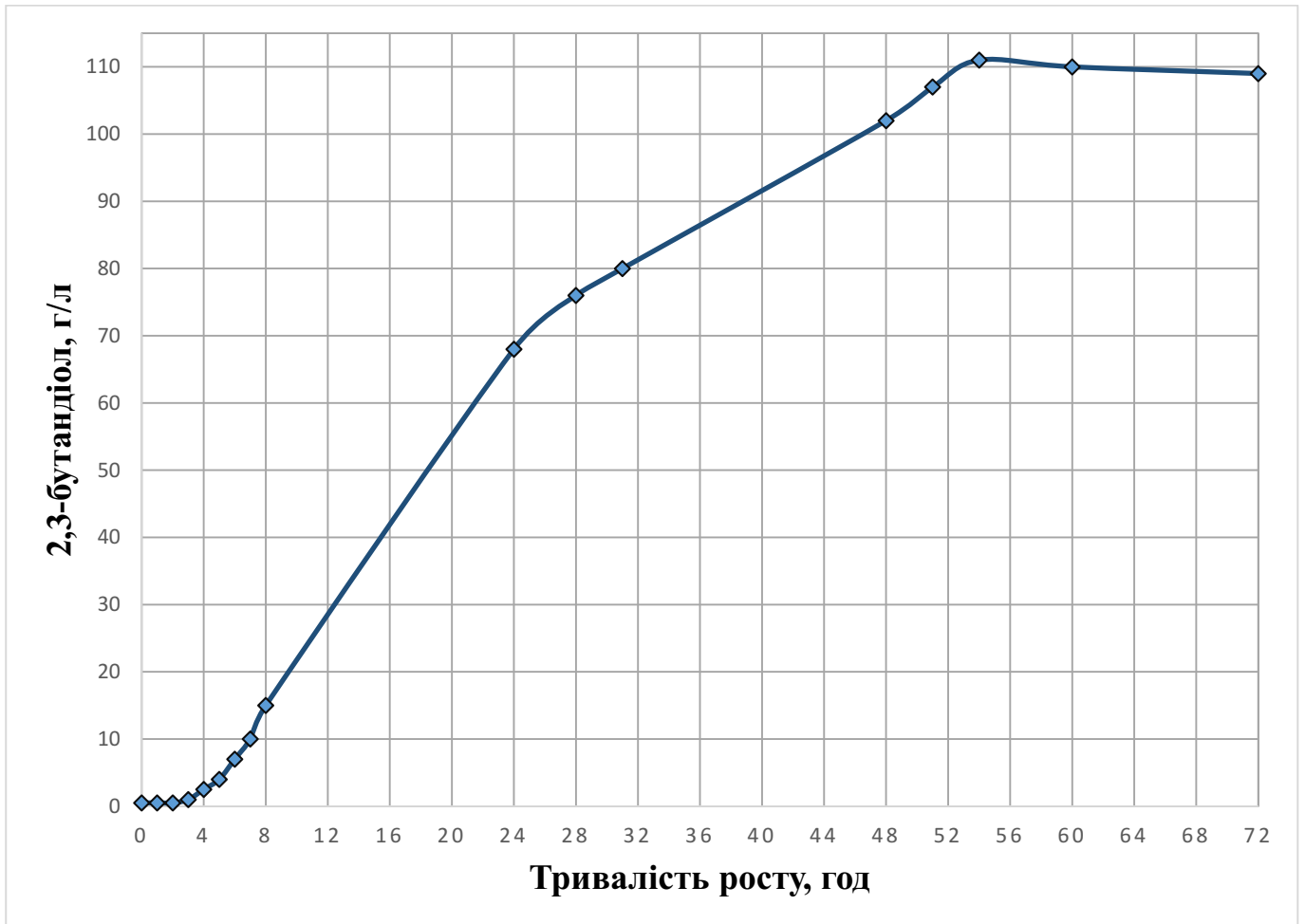


Рис. 4.3. Залежність приросту біомаси від тривалості культивування

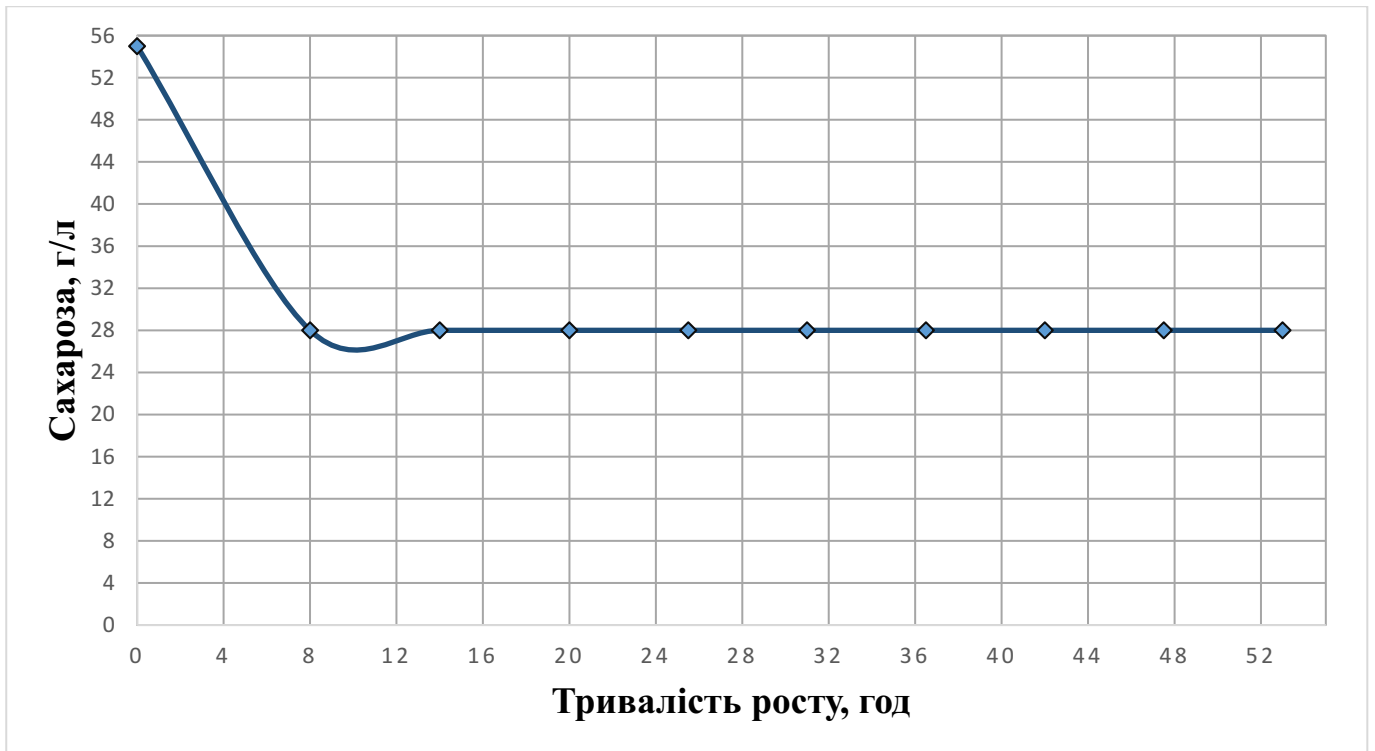


**Рис. 4.4. Залежність синтезу 2,3-бутандіолу від тривалості культивування**

Після двадцятої години культивування приріст біомаси та синтез 2,3-бутандіолу відбуваються рівномірно, тому підживлення буде відбуватись з однаковою частотою.

Третє підживлення припадає на 20-ту годину біосинтезу, тоді наступні підживлення робимо з частотою  $34/6 = 5,67 \sim 5,5$  год.

Узагальнення щодо порцій підживлення сахарозою наведено на *рис. 4.5*.



**Рис. 4.5. Порції додавання сахарози в середовище протягом виробничого біосинтезу**

На *рис. 4.5* показано як здійснюють підживлення. Перше підживлення після 8 годин культивування, друге після 14 годин, третє – після 20 годин, четверте – після 25,5 годин, п'яте – після 31 годину, шосте – після 36,5 годин, сьоме – після 42 годин, восьме – після 47,5 годин, дев'яте – після 53 годин. Порція підживлення містить 28 г/л сахарози у вигляді 40% розчину (70 мл/л).

Результати розрахунків вмісту компонентів поживного середовища наводимо в таблиці:

*Таблиця 4.7*

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	В підживлюючому розчині	В одній порції підживлення
Дріжджовий екстракт	60,0	60,0	-	-
Сахароза	285	55	230	28
MgSO <sub>4</sub>	0,2	0,2	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,0	3,0	-	-

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,2	1,2	-	-
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,2	0,2	-	-
Розчин мікроелементів:				
$\text{FeSO}_4$	0,4	0,4	-	-
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,8	0,8	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,1	-	-
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,08	0,08	-	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04	0,04	-	-
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5,0	5,0	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	1,0	-	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,04	0,04	-	-
Біотин	0,01	0,01	-	-

### Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *P. polytuxa* DSM 365, умовно ділимо його на композиції залежно від режиму стерилізації. Підготовку та стерилізацію розчину мікроелементів наведено вище в цьому розділі.

Органічні компоненти (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композицій В та С стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Стерилізацію проводять в автоклаві.

Склад композицій:

**Композиція А:** сахароза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

**Композиція С:**  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Для стерилізації компонентів використовують горизонтальний циліндричний автоклав WS-90YDA. Він підходить вимогам щодо стерилізації композицій та має певні переваги в експлуатації [76].

### **Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 50 л**

Кількість поживного середовища є досить великою, тому склад композицій для стерилізації дещо змінюємо. Підготовку та стерилізацію розчину мікроелементів наведено вище в цьому розділі.

Стерилізація композиції А відбувається в збірнику об'ємом 30 л гострою парою. Композицію В готують в колбі на 2 л і потім переносять в посівний апарат для стерилізації гострою парою. Для запобігання утворенню нерозчинних комплексів вносять 6,5 N розчин  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Склад композицій:

**Композиція А:** сахароза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Перед посівним апаратом розміщено збірник відповідного об'єму для приготування композиції А.

### **Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 500 л**

Кількість поживного середовища є великою, тому приготування композицій для стерилізації дещо змінюємо. Підготовку та стерилізацію розчину мікроелементів наведено вище в цьому розділі.

Стерилізація композиції А відбувається в збірнику об'ємом 300 л гострою парою. Композицію В готують в збірнику на 20 л і потім переносять в посівний апарат для стерилізації гострою парою. Для запобігання утворенню нерозчинних комплексів вносять 6,5 N розчин  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Склад композицій:

**Композиція А:** сахароза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

**Композиція В:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Перед посівним апаратом розміщено два збірники відповідного об'єму для приготування композицій.

### **Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 5 м<sup>3</sup>**

Кількість поживного середовища є великою, тому приготування композицій для стерилізації дещо змінюємо. Підготовку та стерилізацію розчину мікроелементів наведено вище в цьому розділі.

Стерилізація композиції А відбувається в збірнику об'ємом 3 м<sup>3</sup> гострою парою. Композицію В готують в збірнику на 200 л і потім переносять в посівний апарат для стерилізації гострою парою. Для запобігання утворенню нерозчинних комплексів вносять 6,5 N розчин Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>.

Склад композицій:

**Композиція А:** сахароза, дріжджовий екстракт (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

**Композиція В:** КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, рН 4,0 – 4,5).

Перед посівним апаратом розміщено два збірники відповідного об'єму для приготування композицій.

### **Вирощування культури в ферментері об'ємом 50 м<sup>3</sup>**

Склад композицій та компонентів поживного середовища змінюємо. Окремо наведено підготовку підживлюючого розчину (в збірнику 32 м<sup>3</sup>), що містить джерело вуглецю – сахарозу.

Об'єм поживного середовища дуже великий, тому доцільно використовувати безперервну стерилізацію та не розбивати поживне середовище на композиції. При безперервному способі стерилізації кожен елементарний процес – нагрівання, витримка, охолодження здійснюється в спеціально призначених для цього апаратах: нагрівачі, витримувачі, теплообміннику, що складають систему апаратів для безперервної стерилізації – установку безперервної стерилізації (УБС).

Така установка має багато переваг:

1. при безперервному методі стерилізації кожен елементарний обсяг середовища (нескінченно малий обсяг, що містить одну спору) знаходиться при високій температурі короткий час;
2. завдяки більш високим температурам стерилізації і короткої експозиції деструкція компонентів поживного середовища мінімальна;
3. процес стерилізації всього обсягу поживного розтяг середовища в часі, цим забезпечується більш рівномірне завантаження котельні;
4. процес легко контролювати і керувати ним; можлива часткова регенерація тепла.

Композицію А (поживне середовище) готують в збірнику об'ємом 15 м<sup>3</sup>, після чого переносять в УБС для стерилізації. Після стерилізації стерильне поживне середовище переносять в ферментер.

Склад композицій:

**Композиція А:** сахароза, дріжджовий екстракт, MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O, біотин (режим стерилізації: 131°C, 40 хв, pH 6).

Перед ферментером розміщують установку безперервної стерилізації об'ємом 15 м<sup>3</sup>.

#### **4.6. Обґрунтування способу виділення та очищення 2,3-бутандіолу з продукту *Paenibacillus polymyxa* DSM 365**

За один цикл виробничого біосинтезу отримують 24,7 м<sup>3</sup> культуральної рідини. Цільовий продукт – 2,3-бутандіол синтезується позаклітинно, концентрація його складає 111 г/л. Для отримання готового продукту необхідними стадіями є відділення біомаси, екстрагування та подальша дистиляція/первапорація [77]. Готовий продукт – зведеноаний мікробний 2,3-бутандіол, потребує фасування та маркування.

На *рис. 4.6* представлена постадійна схема післяферментаційних стадій одержання готового продукту, а нижче наведено обґрунтування кожної стадії.



Рис. 4.6. Схема отримання готового продукту рідкого 2,3-бутандіолу

#### 4.6.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси

Першим етапом для одержання 2,3-бутандіолу є відділення біомаси від культуральної рідини. Воно не потребує попередньої обробки. Порівняння найрозповсюдженіших на сьогоднішній день методів розділення біомаси та культуральної рідини наведено в таблиці [78]:

Таблиця 4.8

#### Методи розділення біомаси та культуральної рідини

Метод	Переваги	Недоліки
Сепарація	фактично немає втрат біомаси, висока продуктивність	висока енергоємність процесу, необхідність використання складного обладнання
Фільтрація	простота проведення процесу, достатньо висока продуктивність	налипання клітин на фільтри, що знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування та втрати біомаси
Відстоювання	простота проведення процесу	довга тривалість процесу, втрати по біомасі
Центрифугування	висока продуктивність, висока швидкість розділення, можливість використання для часток малих розмірів, низькі втрати біомаси	необхідність дорогавартісного обладнання
Флотація	низька енергоємність	великі втрати біомаси, необхідність обладнання

З інформації, наведеної в *табл. 4.8*, робимо висновок, що для відділення біомаси найбільше підходить центрифугування, що має суттєві переваги по відношенню до інших методів:

- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням, відстоюванням та флотацією;
- можливість автоматизувати процес;
- відносно невисока енергоємність;
- високій фактор розділення;
- швидше проведення процесу порівняно з фільтруванням та відстоюванням;
- висока продуктивність.

Біомасу *Raenibacillus polytuxa* DSM 365 відділяють центрифугуванням при 8000 об/хв [28]. Попередньо після ферментації культуральну рідину перекачують в збірник для зберігання.

Зважаючи на великий об'єм – 24,7 м<sup>3</sup>, необхідна промислова проточна центрифуга з великим потоком для прискорення процесу. Центрифуги з найбільшим потоком – моделі J1250 (2200 л/год) та СЕРА Z 101 (3000 л/год). Параметри цих моделей подібні, тому обираємо СЕРА Z 101 (рис. 4.7), що має більший потік [79, 80].

Технічні параметри центрифуги наведені в табл. 4.9 [80].

Таблиця 4.9

Характеристики СЕРА Z 101	
параметри	значення
Протока min / max	150/3000 л/год
Швидкість обертів	до 14 000 об/хв
Місткість камери для сухого осаду	10 л
Потужність	2,2 кВт
Габарити (Ш / В / Г)	95 × 160 × 50 см
Матеріал	нержавіюча сталь 1.4571



Рис. 4.7. Промислова проточна центрифуга СЕРА Z 101

Згідно з принципом роботи центрифуги, в нижню частину ротора подають культуральну рідину за допомогою насосу. Всередині ротора відбувається розділення за щільністю речовин. Супернатант піднімається через центр ротора до його вершини, після чого виходить очищеним [80].

Центрифугування триває ~8,5 годин, супернатант автоматично подають на наступну стадію. Біомасу відправляють на знешкодження відходів.

#### **4.6.2. Обґрунтування стадії очистки 2,3-бутандіолу**

Для відокремлення 2,3-бутандіолу від культуральної рідини використовують такі методи, як екстракцію, випарювання, ректифікацію, зворотній осмос, хроматографію та первапорацію [77].

Загалом ступінь чистоти кінцевого продукту – 2,3-бутандіолу, обумовлений сферою використання. В даному випадку це використання в якості розчинника при виробництві ефірних олій для парфумерії. Відповідно, 2,3-бутандіол має бути максимально очищеним.

В більшості випадків використовують одноступеневу очистку, що відокремлює бутандіол, очищає та зневоднює. Способи змінюються, проте в більшості з них є одні й ті ж складності, які стосуються фізичних властивостей 2,3-бутандіолу, а саме: змішуваність з водою та температура кипіння 182°C [1].

Одним з перших способів було випарювання, яке проводили у випарних апаратах. Оскільки концентрація 2,3-бутандіолу в культуральній рідині відносно невелика, необхідно видалити високу кількість води, що ускладнено тим, що 2,3-бутандіол змішаний з водою. При використанні випарювання, вода випарюється в той час, як 2,3-бутандіол залишається в рідкому стані. Проте, інші завислі часточки культуральної рідини можуть залишатись, а сам процес на сьогодні потребує багато енергії, що перешкоджає його використанню [81].

Первапорація та мембранна дистиляція також мають на своїй меті зневоднення. Розділення відбувається завдяки різній проникності через дуже щільну мембрану (непористу в першому випадку та дрібнопористу в другому). Вода проникає крізь мембрану, а 2,3-бутандіол утримується на мембрані. Перехід через мембрану

забезпечують температурним градієнтом, який створюють вакуумом. Такий процес також енергоємний, потребує попередньої підготовки, а компоненти культуральної рідини заважають розділенню [82].

Перегонка або ж дистиляція є ефективним методом для очистки 2,3-бутандіолу. Розділення відбувається завдяки різниці температур кипіння. Для 2,3-бутандіолу перегонку рідко використовують зважаючи на високу температуру кипіння спирту. Навіть вакуумну перегонку рідко використовують через високу енергоємність процесу. Перевагою ж процесу є можливість конденсації продукту в рідку та тверду форму [8].

Екстракція в середовищі рідина-рідина є доволі ефективним способом очистки 2,3-бутандіолу. Для цього можна використовувати велику кількість різних розчинників, наприклад, спирти та ефіри, особливо етилацетат, трибутилфосфат, діетиловий ефір, *n*-бутанол, додеканол та олеїловий спирт. Ефективним є й висолювання солями (KCl, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Але окремі екстрагенти є відносно неефективними, а методи потребують використання високої кількості розчинника [77].

Ще одним ефективним методом є евапорація, при якій очищення здійснюється за рахунок пропускання водяної пари через нагріту до ~100°C суміш. При цьому пара видаляє домішки з розчину. Таким чином видаляються фактично всі домішки, проте необхідно подальше зневоднення [9].

Узагальнення наведено в *табл. 4.10*.

*Таблиця 4.10*

#### Методи виділення та очистки 2,3-бутандіолу

Метод	Переваги	Недоліки
Випарювання	високий ступінь зневоднення, висока ціна	висока енергоємність, низький ступінь очистки, необхідність складного обладнання, неможливе повторне використання пари

Первапорація	порівняно невисока енергоємність, висока вибірковість розділення	необхідна попередня підготовка, компоненти культуральної рідини заважають розділенню
Мембранна дистиляція	висока вибірковість розділення	висока енергоємність, необхідна попередня підготовка, компоненти культуральної рідини заважають розділенню
Перегонка	високий ступінь очистки та зневоднення, можливість одержання рідкого або твердого продукту	висока енергоємність, складність процесу через високу температуру кипіння спирту, необхідність складного обладнання
Екстракція	простота проведення, низька вартість	низький ступінь очистки через гідрофільність спирту, необхідність використання великих кількостей розчинника
Евапорація	високий ступінь зневоднення, відсутність попередньої обробки, простота способу	необхідність подальшого зневоднення, необхідний поглинач домішок

Отже, кожний спосіб окремо переважно має недоліки, які заважають використанню його в промисловості для одержання 2,3-бутандіолу.

Тому для ефективного відновлення 2,3-бутандіолу використовують поєднання кількох способів, що дозволяє значно підвищити ступінь очистки та знизити енергоємність, які складають основні проблеми при виділенні 2,3-бутандіолу. Порівняємо найбільш ефективні серед них – екстракція з подальшою дистиляцією та евапорація з подальшою дистиляцією.

Переваги виділення 2,3-бутандіолу екстракцією з подальшою дистиляцією:

1. значне зниження витрат енергії;
2. збільшення ступеня очистки до 96-99%;
3. повне зневоднення 2,3-бутандіолу;
4. зниження витрат екстрагента;
5. можливість виділення та використання побічних продуктів біосинтезу;
6. зниження загальної вартості на виділення за рахунок зниження витрат та низьких цін на розчинники;
7. легке відновлення та відділення розчинника від 2,3-бутандіолу дистиляцією.

Останнім часом було запропоновано кілька різних розчинників, які дають високий результат екстракції 2,3-бутандіолу з супернатанту. Це етанол-фосфатна система [10], 2-гептанол [8], ізопропанол-фосфатна система [11], етанол, метанол, ізопропанол [12] та *n*-бутанол [83]. Після екстракції використовують дистиляцію (ректифікацію) для одержання готового продукту та регенерації розчинника.

Для вибору екстрагента порівнюємо ефективність використання наведених розчинників:

*Таблиця 4.11*

### **Характеристика використання різних розчинників для екстракції 2,3-бутандіолу**

<b>Екстрагент</b>	<b>Характеристика</b>	<b>Література</b>
Етанол-фосфат	Найкращі результати отримані при додаванні 24% мас/мас солі та 25% мас/мас етанолу. Етанол розчинний у воді, сіль нерозчинна в етанолі. При	[10]

	екстракції утворюється дві фази: нижня водна з сіллю та етанолом, верхня продукт з етанолом (30%). Регенерація солі можлива кристалізацією до 79,5%, етанолу – дистиляцією ( $t_{\text{кип}}=78^{\circ}\text{C}$ ) майже повністю. Чистота 2,3-бутандіолу після дистиляції 98%.	
Ізопропанол-фосфат	Найкращі результати отримані при додаванні 30% мас/об солі та 50% об/об ізопропанолу. Ізопропанол змішується з водою. При екстракції утворюється дві фази: нижня водна з сіллю, верхня продукт з ізопропанолом. Регенерація ізопропанолу та солі дає по 86,7% кожного екстрагенту. Чистота 2,3-бутандіолу після дистиляції 80%. Втрати продукту ~8%.	[11]
Ізопропанол	Найкращі результати отримані при додаванні 300% мас/мас ізопропанолу. Ізопропанол змішується з водою, регенерується дистиляцією ( $t_{\text{кип}}=82^{\circ}\text{C}$ ). При екстракції утворюється дві фази: нижня водна, верхня продукт з ізопропанолом. Чистота 2,3-бутандіолу після дистиляції 96,1%. Втрати продукту ~24%.	[12]
2-гептанол	Додавали 29% мас/мас 2-гептанолу. 2-гептанол нерозчинний у воді, повністю регенерується дистиляцією ( $t_{\text{кип}}=159^{\circ}\text{C}$ ). При екстракції утворюється дві фази: нижня водна, верхня продукт з 2-гептанолом. Чистота 2,3-бутандіолу після дистиляції 99%. Втрати продукту ~7%.	[8]

Як видно з *табл. 4.11*, найкращим екстрагентом є гептанол. Він не розчинний у воді і не змішується з нею, повністю залишається в органічній фазі (етанол та ізопропанол розподіляються між обома фазами) і регенерується під час дистиляції.

Також, чистота отриманого 2,3-бутандіолу складає 99%, а втрати лише 7%, що є найкращими результатами [8].

Переваги виділення 2,3-бутандіолу евапорацією з подальшою дистиляцією:

1. значне зниження витрат енергії;
2. збільшення ступеня очистки до 98-99%;
3. повне зневоднення 2,3-бутандіолу;
4. відсутність додаткових екстрагентів;
5. можливість виділення та використання побічних продуктів біосинтезу;
6. простота та висока швидкість методу.

Використовують одноступеневу та багатоступеневу евапорацію, проте результати не суттєво відрізняються. Отримують 2,3-бутандіол з чистотою 99%, при цьому втрати складають 10% [9].

Для остаточного вибору способу очистки порівнюємо найбільш ефективні способи [8, 9]:

Таблиця 4.12

#### Порівняння комбінованих способів очистки 2,3-бутандіолу

Показник	Екстракція з дистиляцією	Евапорація з дистиляцією
Чистота готового продукту, %	99	99
Втрати 2,3-бутандіолу, %	7	10
Зниження витрат, %	39	38,9

Відповідно до *табл. 4.12*, обираємо спосіб екстракції 2-гептанолом з подальшою дистиляцією (ректифікацією).

Для того, щоб підвищити ефективність процесу та виключити зайві втрати, будемо використовувати екстрактор, оснащений перемішувачем, який забезпечить необхідні умови і ефективність. Для нашої задачі підійде відцентровий екстрактор. Порівнюємо моноступінчатий екстрактор VXP210PL [84] та багатоступінчатий LX526 [85].

Зважаючи на продуктивність центрифуги 3000 л/год [80] та на додавання 2-гептанолу в кількості 29% (~870 л на 3000 л супернатанту), необхідний екстрактор з продуктивністю ~4000 л/год для подачі супернатанту після центрифуги одразу в екстрактор. Продуктивність VXR210PL складає 4,2 м<sup>3</sup>/год, а LX526 – 4,5 м<sup>3</sup>/год. За даним показником обидва апарати підходять. Згідно з особливостями екстракції 2-гептанолом, приходимо до висновку, що одноступенева екстракція забезпечує необхідну ефективність екстракції 2,3-бутандіола. В такому випадку, використання багатоступеневої екстракції зробить продукт дорожче, а обладнання буде більш складним та габаритним. Тому для екстракції 2,3-бутандіолу будемо використовувати моноступінчатий екстрактор VXR210PL (рис. 4.8) [84, 85].



Рис. 4.8. Моноступінчатий екстрактор VXR210PL

Технічні характеристики екстрактора представлені в *табл. 4.13* [84].

**Характеристики екстрактора ВХР210РL**

параметри	значення
Продуктивність	до 4200 л/год
Швидкість обертів	1450 об/хв
Корисний об'єм	7,8 л
Потужність	0,75 кВт
Габарити (В / Ш)	140 × 55 см
Матеріал	нержавіюча сталь AISI316L

Принцип роботи відцентрового екстрактора наступний:

Знизу з однієї сторони в камеру змішування подають супернатант, а з іншої розчинник, який відрізняється за густиною та не змішується з супернатантом. За допомогою мішалки речовини змішують в дисперсію, яка потім всмоктується всередину чаши барабана мішалки, в якому розділяється на дві фази за допомогою відцентрових сил. Важка фаза буде з зовнішньої сторони чаши, а легка з внутрішньої. Потім кожна фракція виходить з екстрактора в свою ємність [84].

Екстракція триває ~8,5 год, паралельно з центрифугуванням. Після екстракції органічну фазу в кількості ~1250 л/год направляють в збірник для зберігання. Водну фазу відправляють на знешкодження відходів.

Наступним необхідним апаратом є ректифікаційна колона.

Ректифікацію здійснюють в два етапи. На першому етапі відділяють легколетючі компоненти – воду та інші домішки. При цьому в колоні встановлюють температуру 110°C, яка забезпечує необхідну ефективність процесу. Після доведення концентрації 2,3-бутандіолу в розчині в кубі колони до 27,58% (в кубі залишаються тільки 2-гептанол та 2,3-бутандіол), продукт направляють на другу колону. Дистилат направляють на знешкодження відходів [8].

На другому етапі розділяють 2,3-бутандіол та 2-гептанол. Тобто, одразу відбувається і регенерація 2-гептанолу. Температуру в колоні встановлюють 170°C. Процес проводять до доведення концентрації 2,3-бутандіолу до 99%. Очищений

продукт направляють в збірник, з якого потім здійснюють фасування. Регенований 2-гептанол направляють в збірник для зберігання [8].

Для забезпечення ефективного процесу, ректифікацію проводять порціями, в першу колону подають по ~1250 л, в другу колону надходить вже по 1200 л. Тож колона має бути розрахована на таку кількість продукту та має забезпечувати необхідні умови проходження процесу, в даному випадку це температура. Згідно з цим, обираємо ректифікаційну колону РКА (рис. 4.9) з робочим об'ємом 2000 л.

Технічна характеристика колони наведена в табл. 4.14 [86].



Рис. 4.9. Ректифікаційна колона РКА

Таблиця 4.14

#### Характеристики ректифікаційної колони РКА

параметри	значення
Об'єм	2700 л
Робочий об'єм	2000 л
Мінімальний об'єм	200 л
Температура нагрівання	до 200°C
Максимальний тиск	3 атм
Кількість теоретичних тарілок	19
Тип колони	насадковий
Матеріал	нержавіюча сталь AISI 304

Принцип дії:

Суміш рідин подають в куб колони, розташований знизу. Протягом 30-60 хв нагрівають суміш до необхідної температури. Після цього частина компонентів випаровуються та йдуть вверх по колоні. Пар попадає в дефлегматор та частково конденсується. Конденсат спускається вниз по колоні, контактуючи з паром, що підіймається. В результаті пара частково конденсується, а рідина частково випаровується. Таким чином дві фази безперервно контактують між собою. Через певний час налаштовують швидкість виходу легколетючою фази з колони, після чого чиста фракція, що накопичується зверху колони, поступово виходить [87].

В нашому випадку ректифікація продукту буде здійснюватись 9-ма порціями. Зважаючи на час циклу 106 год та на тривалість інших етапів (при чому ректифікацію можна починати одразу після поступання першої порції продукту), приймаємо, що одна порція очищається в одній колоні протягом 10-ти год. В одній порції (1250 л) міститься 870 л 2-гептанолу, 330 л 2,3-бутандіолу та 50 л води. Виходячи, з цих цифр в першій колоні відток буде швидкістю 6 л/год, а в другій 90 л/год. За необхідності параметри процесу будуть корегувати.

#### **4.7. Обґрунтування товарної форми продукту мікробного біосинтезу та стадії пакування**

##### **4.7.1. Обґрунтування вибору товарної форми 2,3-бутандіолу**

Товарні форми 2,3-бутандіолу, представлені на ринку, це прозорі кристали (*рис. 4.10*) та рідина (*рис. 4.11*) 2,3-бутандіолу.



Рис. 4.10. Кристали 2,3-бутандіолу



Рис. 4.11. Рідкий 2,3-бутандіол

Після процесу ректифікації отримують 2,3-бутандіол в рідкому стані. Кристалізація вимагає додаткової стадії, додаткового устаткування та, відповідно, додаткових витрат на виробництво.

В даному проекті запропоновано використання 2,3-бутандіолу в якості розчинника при виробництві ефірних олій для парфумерії. З цією метою використовують 2,3-бутандіол в рідкій формі.

Отже, щоб запобігти надлишковим витратам та для збільшення цінності продукту для обраної сфери, обираємо рідку товарну форму продукту.

#### 4.7.2. Обґрунтування стадії фасування 2,3-бутандіолу

Цільовий продукт 2,3-бутандіол відноситься до хімічних речовин і має бути запакований належним чином для збереження його властивостей, а також для захисту навколишнього середовища.

Основні вимоги до тари й упаковки для хімічних матеріалів:

- герметичний стан;
- цілісність, відсутність пошкоджень будь-якого типу;
- високі міцнісні показники, стійкість до механічних впливів;

- запобігання випаровуванню, витіканню і висипанню вмісту;
- хімічна стійкість.

Відповідно, використовують скляні, металеві та пластикові упаковки [88].

Порівняння використання різних матеріалів наведено в *табл. 4.15* [88].

*Таблиця 4.15*

**Порівняння пакувальних матеріалів для 2,3-бутандіолу**

<b>Матеріал</b>	<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>
Скло	Прозорість, збереження характеристик речовин, хімічна стійкість, фізична стійкість, можливість багаторазового застосування	Велика вага, крихкість, можливість дефектів, висока ціна
Метал	Найвища механічна стійкість, герметичність, легке відкривання /закривання, хімічна стійкість, захист від факторів навколишнього середовища, стійкість до зношування, водонепроникність, термостійкість, гігієнічність, практичність, невелика вага, надійність перевезення і зберігання, тривалий період експлуатації	Порівняно більша ціна
Пластик	Дешевизна, доступність, невелика вага, легка експлуатація, легкість транспортування, доступність дуже різних варіантів ємностей, хімічна стійкість	Не завжди висока механічна стійкість, виготовляють ємності до 10 л

З табл. 4.15 робимо висновок, що металева тара (рис. 4.12) найкраще підходить для упакування 2,3-бутандіолу, так як він є хімічним органічним розчинником, який крім іншого, необхідно захищати від сонячного світла.

Металеві бочки одні з найбільш міцних і найбільш надійних в плані зберігання і транспортування будь-яких вантажів, зокрема вибухонебезпечних хімікатів, тощо. Вони практичні, якісні, легко переносять транспортування, щільно закриваються та зберігають речовини в належному стані і якості протягом тривалого періоду [88].

Повна безпека товару, поміщеного в банку з металу, не підлягає сумніву. Особливим попитом металева тара користується у тих, хто має справу з токсичними хімікатами, органічними розчинниками та іншими матеріалами, одним з яких і є 2,3-бутандіол [88].

Після одного циклу отримують ~2500 л 2,3-бутандіолу. Його фасування доцільне в металеві бочки по 25 літрів. Для цього використовують фасувальні машини для розливу рідин.

Для фасування обираємо напівавтоматичну машину для розливу рідин DF-03 (рис. 4.13) [89]. Вона підходить за технічними характеристиками та є простою в експлуатації. Дозування здійснюється за допомогою електронного дозуючого пристрою. Після наповнення бочку транспортують в сторону, де вручну закривають металевою кришкою.



Рис. 4.12. Металева бочка для упакування 2,3-бутандіолу



Рис. 4.13. Фасувальна машина для рідин DF-03

Технічні характеристики фасувальної машини наведено в таблиці [89]:

Таблиця 4.16

**Характеристики машини для розливу рідин DF-03**

параметри	значення
Маса дози	15-30 л
Точність дозування	0,001
Дозування	об'ємне
Продуктивність	60-120 уп/год
Габарити платформи	36 × 35 см
Вага	200 кг

Отже, для доферментаційних процесів виробництва 2,3-бутандіолу знадобиться наступне обладнання:

- збірник – 11 шт.
- посівний апарат 50 л – 1 шт.
- посівний апарат 500 л – 1 шт.
- посівний апарат 5 м<sup>3</sup> – 1 шт.
- ферментер 50 м<sup>3</sup> – 1 шт.
- ультрафільтраційна система – 1 шт.
- установка безперервної стерилізації – 1 шт.

Для післяферментаційних стадій одержання 2,3-бутандіолу знадобиться наступне обладнання:

- збірник – 4 шт.
- центрифуга – 1 шт.
- екстрактор – 1 шт.
- ректифікаційна колона – 2 шт.
- фасувальна машина – 1 шт.
- насоси – 5 шт.

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в *табл. 5.1*:

*Таблиця 5.1*

Позиція	Найменування	Кі-сть	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФПО FA «Уралкомпресормаш» (Росія), 138x385x424 мм, площа фільтрації 3 м <sup>2</sup> , корпус нержавіюча сталь, матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, E = 80 % [90]
К-3	Компресор	1	Компресор KB 7 «АСО» (Росія), пропускна здатність 275 л/хв, робочий тиск 10 бар, 600x600x1400 мм, високоякісна нержавіюча сталь [91]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач OB 42 «АСО» (Росія), пропускна здатність 700 л/хв, робочий тиск 16 бар, 600x450x420 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 0,2 кВт [92]
Р-5	Ресивер	1	Ресивер вертикальний РВ 110/10 «АСО» (Росія), об'єм 110 л, робочий тиск 10 бар, 540x560x1010 мм, високоякісна нержавіюча сталь [93]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник HF75 «Pahlen» (Швеція), пропускна здатність 600 л/хв, робочий тиск 10 бар, 702x139 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 75 кВт [94]
Ф-7	Головний фільтр тонкої очистки	1	Фільтри ФТОП Н12 СКБ «Технофільтр» (Україна), 305x305x78 мм, площа фільтрації 1,9 м <sup>2</sup> , пропускна здатність 200 м <sup>3</sup> , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокно, E = 95% [95]
Д-8 Д-13 Д-17 Д-21 Д-25 Д-30 Д-33 Д-38 Д-42 Д-46 Д-51	Об'ємно-ваговий дозатор	11	Диференційний об'ємно-ваговий дозатор MSDF/MZMO «Bühler Group» (Швейцарія), нержавіюча сталь AISI 304, пропускна здатність 0,75 л/год – 2000 л/год [96]

Ф-9 Ф-11 Ф-14 Ф-19 Ф-22 Ф-28 Ф-39 Ф-43 Ф-54	Фільтри індивідуальної очистки	16	Фільтри НЕРА Н14 СКБ «Технофільтр» (Україна), 305x305x78 мм, площа фільтрації 1.9 м <sup>2</sup> , пропускна здатність 200 м <sup>3</sup> , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокно, E = 99,999 % [97]
З-10	Збірник для приготування та стерилізації композиції А для підготовки посівного матеріалу в посівному апараті на 50 л	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 30 л, робочий об'єм 20 л, габарити 0,27x0,4 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [98]
ПА-12	Посівний апарат	1	LP351 – лабораторно-пилотний ферментер «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 50 л, робочий об'єм 33 л, габарити 0,32x0,64 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 316 L зернистість 240, потужність 2,2 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та гвинтовою мішалкою, швидкість обертання до 1000 об/хв [99]
З-15	Збірник для приготування та стерилізації композиції А для підготовки посівного матеріалу в посівному апараті на 500 л	1	Р - пилотний біореактор «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 300 л, робочий об'єм 200 л, габарити 0,57x1,14 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 316 L, потужність мотора 7,5 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [100]

Н-16 Н-24 Н-27 Н-32 Н-35 Н-37 Н-41 Н-45 Н-48 Н-50 Н-53 Н-56	Відцентровий насос з магнітною муфтою	12	Відцентровий насос з магнітною муфтою МРС042 «La Fonte» (Італія), потужність мотора 0,12 кВт, пропускна здатність 1,8 м <sup>3</sup> /год, матеріал поліпропілен [101]
З-18	Збірник для приготування композиції В для підготовки посівного матеріалу в посівному апараті на 500 л	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 20 л, робочий об'єм 15 л, габарити 0,2х0,4 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [98]
ПА-20	Посівний апарат	1	Р-пілотний ферментер «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 500 л, робочий об'єм 350 л, габарити 0,68х1,36 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 316 L зернистість 240, потужність мотора 10 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та гвинтовою мішалкою, швидкість обертання до 750 об/хв [102]
З-23	Збірник для приготування та стерилізації композиції А для підготовки посівного матеріалу в посівному апараті на 5 м <sup>3</sup>	1	Р - пілотний біореактор «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 3 м <sup>3</sup> , робочий об'єм 2 м <sup>3</sup> , габарити 1,24х2,48 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 316 L, потужність мотора 17,5 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [100]
З-26	Збірник для приготування композиції В для підготовки посівного матеріалу в посівному апараті на 5 м <sup>3</sup>	1	Р - пілотний біореактор «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 200 л, робочий об'єм 150 л, габарити 0,5х1 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 316 L, потужність мотора 7,5 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [100]

ПА-29	Посівний апарат	1	Р-пілотний ферментер «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 5 м <sup>3</sup> , робочий об'єм 3,5 м <sup>3</sup> , габарити 1,47x2,94 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 316 L зернистість 240, потужність мотора 20 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та гвинтовою мішалкою, швидкість обертання до 750 об/хв [102]
З-31	Збірник для приготування поживного середовища для виробничого біосинтезу	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 15 м <sup>3</sup> , габарити 2,12x4,24 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C, оснащений всіма необхідними датчиками та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування до 750 об/хв [98]
З-34	Збірник для приготування розчину ортофосфатної кислоти для виробничого біосинтезу	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 100 л, габарити 0,4x0,8 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 3 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [103]
УБС-36	Установка безперервної стерилізації	1	Система безперервної стерилізації «Bioengineering AG» (Швейцарія) на 15 м <sup>3</sup> , матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C, оснащена всіма необхідними датчиками [на замовлення]
З-40	Збірник для приготування та стерилізації розчину амонію гідроксиду для виробничого біосинтезу	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 100 л, габарити 0,4x0,8 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 3 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [103]
З-44	Збірник для приготування підживлюючого розчину	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 32 м <sup>3</sup> , габарити 2,73x5,56 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування до 750 об/хв [104]

З-47	Збірник для піногасника	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 100 л, габарити 0,4х0,8 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 3 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [103]
ФС-49	Ультрафільтраційна установка	1	Пілотна система для мікрофільтрації УФ-201 «Біотехно» (Україна), місткість 120 л, швидкість подачі до 37,85 л/хв, габарити 749,3×548,6×1300 мм, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура корпусу до +60°C, вага 200 кг [75]
З-52	Збірник для зберігання простерилізованого піногасника	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 100 л, габарити 0,4х0,8 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 3 кВт, температура роботи до 150°C, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [103]
ФР-55	Ферментер	1	Industrial Scale Bioreactor I-Series «Solaris Biotechnology» (Італія) об'ємом 50 м <sup>3</sup> , робочий об'єм 35 м <sup>3</sup> , габарити 3,17х6,34 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C, максимальний тиск 2 бар, оснащений сорочкою, всіма необхідними датчиками та фрезерною мішалкою, швидкість обертання до 750 об/хв [72]
З-57	Збірник для зберігання культуральної рідини	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 32 м <sup>3</sup> , габарити 2,73×5,56 м, матеріал – нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв [104]
Н-58	Відцентровий насос з магнітною муфтою	1	Відцентровий насос з магнітною муфтою CS65-160С «Speroni» (Італія), пропускна здатність 144 м <sup>3</sup> /год, габарити 425×340×750 мм, матеріал – чавун, температура роботи до 90°C, потужність мотора 9,2 кВт, вага 125,2 кг [105]

Ц-59	Проточна центрифуга	1	Промислова проточна центрифуга СЕРА Z 101 «Біотехно» (Україна), протока мін/макс 150/3000 л/год, габарити 95×160×50 см, матеріал – нержавіюча кислотостійка сталь 1.4571, швидкість обертання до 14 000 об/хв, потужність 2,2 кВт, вага 350 кг [80]
З-60	Збірник для зберігання 2-гептанолу	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 10 м <sup>3</sup> , габарити 1,85×3,71 м, матеріал – нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C [98]
Н-61	Шестерний насос	1	Шестерний насос PLP20 «Casappa» (Україна) об'ємом 6,3 см <sup>3</sup> , продуктивність до 20,3 л/хв, матеріал – алюмінієвий сплав, тиск до 250 бар, швидкість обертання до 3500 об/хв [106]
Е-62	Відцентровий екстрактор	1	Моноступінчатий відцентровий екстрактор ВХР210PL «Rousselet Robatel» (Франція), протока до 4200 л/год, габарити 140×55 см, матеріал – нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, швидкість обертання 1450 об/хв, потужність 0,75 кВт [84]
З-63	Збірник для зберігання екстракту	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 15 м <sup>3</sup> , габарити 2,12×4,24 м, матеріал – нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C [98]
Н-64 Н-66	Шестерний насос	2	Шестерний насос PLP30 «Casappa» (Україна) об'ємом 60 см <sup>3</sup> , продуктивність до 99,8 л/хв, матеріал – алюмінієвий сплав, тиск до 180 бар, швидкість обертання до 1750 об/хв [107]
РК-65 РК-67	Ректифікаційна колона	2	Ректифікаційна колона РКА «Укроргсинтез» (Україна) об'ємом 2700 л, робочий об'єм 200-2000 л, матеріал – нержавіюча кислотостійка сталь AISI 304, робоча температура до 200°C, макс. тиск 3 атм, 19 теор. тарілок, насадковий тип [86]
Н-68	Шестерний насос	1	Шестерний насос PLP30 «Casappa» (Україна) об'ємом 20 см <sup>3</sup> , продуктивність до 56,4 л/хв, матеріал – алюмінієвий сплав, тиск до 250 бар, швидкість обертання до 3000 об/хв [107]
З-69	Збірник для зберігання готового 2,3-бутандіолу	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 3,5 м <sup>3</sup> , габарити 1,3×2,6 м, матеріал – нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура роботи до 150°C [98]

ФМ-70	Фасувальна машина для рідин	1	Фасувальна машина для рідин DF-03 «Мініпрес» (Росія), дозування 15-30 л, об'ємне дозування, габарити платформи 36×35 см, матеріал – нержавіюча сталь, дискретність 0,001, продуктивність 60-120 уп./год, вага 200 кг [89]
-------	-----------------------------	---	---

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ 2,3-БУТАНДІОЛУ

Технологічна схема отримання готового продукту рідкого 2,3-бутандіолу за допомогою *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 включає допоміжні роботи – санітарну підготовку виробництва, підготовку аераційного повітря, підготовку і стерилізацію розчинів титрувальних агентів, підживлюючого розчину для процесу біосинтезу, розчину мікроелементів, піногаснику, поживного середовища для культивування в колбах на качалці, поживних середовищ для культивування в посівних апаратах, поживного середовища для культивування в ферментері, та саме технологічний процес – підготовку посівного матеріалу і біосинтез 2,3-бутандіолу, відділення біомаси, екстракцію та ректифікацію. Технологічна схема включає також стадії пакування – фасування та маркування, та стадії знешкодження відходів – знешкодження газоподібних, рідких та твердих відходів.

### **ДР 1. Санітарна підготовка виробництва**

#### ***ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів***

##### *ДР 1.1.1. Приготування 0,2% розчину хлорантоїну для дезінфекції*

Робочий розчин хлорантоїну концентрацією 0,2% готують з порошку. У відро на 10 л вносять 20 г хлорантоїну та додають 9,98 л води питної. Перемішують до повного розчинення порошку. Розчин використовують для підготовки виробничих приміщень (ДР 1.2.1 та ДР 1.2.2).

##### *ДР 1.1.2. Приготування розчину миючого засобу для миття обладнання*

Робочий розчин готують з концентрованого розчину відповідного миючого засобу. Для ручної мийки у відро на 10 л вносять необхідну кількість засобу та додають води питної, перемішують. Розчин направляють на миття обладнання (ДР 1.3.1).

## ***ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень***

### ***ДР 1.2.1. Щоденне прибирання***

Використовуючи 0,2% розчин хлорантоїну (від ДР 1.1.1) прибирають підлогу, зовнішні поверхні обладнання, трубопроводів і комунікацій, змочують килимки при вході в усі приміщення. Якість прибирання контролюють роблячи змиви, КУО < 800/см<sup>2</sup>.

### ***ДР 1.2.2. Генеральне прибирання***

Використовуючи 0,2% розчин хлорантоїну (від ДР 1.1.1) прибирають підлогу, двері, стіни, вікна, зовнішні поверхні обладнання, трубопроводів і комунікацій, змочують килимки при вході в усі приміщення. Після прибирання звільняють приміщення та вмикають ультрафіолетову лампу. Якість прибирання контролюють роблячи змиви, КУО < 300/см<sup>2</sup>.

## ***ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій***

### ***ДР 1.3.1. Миття***

Миття здійснюють за допомогою розчину мийного засобу (від ДР 1.1.2). Все обладнання миють з використанням СІР-мийки. Через всю апаратуру прокачують миючий засіб, потім ополіскують водою. Після промивки прокачують дезінфекційний розчин. Відпрацьовану воду зливають в каналізацію.

### ***ДР 1.3.2. Технічний огляд***

Технічний огляд здійснюють візуально. У разі знаходження видимих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі проводять підтягування різьбових з'єднань.

### ***ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність***

На апараті закривають усю запірну арматуру, подають аераційне повітря до надлишкового тиску  $P = 0,1-0,2$  МПа. Перекривають вентиль подачі повітря та фіксують покази манометра та час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважають, що апарат герметичний. У випадку перевищення цього значення здійснюють пошук неущільнень в апараті та місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями галогеновими течішукачами. Перед набором тиску вносять чотирихлорний карбон, закривають всю запірну

арматуру, апарат нагрівають (до 80°C) та збільшують тиск в апараті (до 0,2 МПа). При цьому пари чотирихлорного карбону проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієшукача до них. Тривалість перевірки одного апарату становить 60 хв.

#### *ДР 1.3.4. Стерилізація*

В сорочку апарата подають насичену пару та прогрівають апарат до температури 80–90°C. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації ( $t = 130\text{--}135^\circ\text{C}$ ) закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації (60 хв). При стерилізації апарата паралельно стерилізують індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря. Закривають усю запірну арматуру та арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подають холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40°C і надлишкового тиску  $P = 0,003\text{--}0,005$  МПа.

### **ДР 2. Підготовка аераційного повітря**

#### *ДР 2.1. Забір атмосферного повітря*

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби повітрязабірником [ПЗ-1], який знаходиться на 3 м вище від рівня даху будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

#### *ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток*

Першочергово повітря очищають від пилу ( $\delta > 50$  мкм) на тканинних фільтрах грубого очищення [Ф-2]. Ступінь очищення становить 80%.

#### *ДР 2.3. Стиснення повітря*

Проводять стиснення повітря в компресорі [К-3] до тиску  $P=0,35$  МПа, під час чого повітря нагрівається до температури 120-250°C.

#### ***ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи***

Охолодження стисненого повітря до температури "точки роси" (25-30°C), за якої волога повітря конденсується, здійснюють у водяному теплообміннику [Т-4]. Зайву вологу видаляють у краплевловлювачі ресивера [Р-5], де зменшують пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу наступних фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

#### ***ДР 2.5. Нагрівання повітря***

Повітря нагрівають до температури 45-50°C паром теплообмінника [Т-6] для стабілізації показників тиску та температури. Вологість повітря має становити 50%.

#### ***ДР 2.6. Очищення повітря на головному фільтрі***

Очищають повітря у головних ємнісних набивних фільтрах [Ф-7], які встановлюють поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення  $E = 95\%$ .

#### ***ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі***

Повітря від головних фільтрів подають через трубопроводи до індивідуальних фільтрів [Ф-9, Ф-11, Ф-14, Ф-19, Ф-22, Ф-28, Ф-39, Ф-43, Ф-54], встановлених безпосередньо перед кожним апаратом, в якому необхідне повітря. При цьому повітря очищають до ступеня очищення  $E = 99,99\%$ .

### **ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів**

#### ***ДР 3.1. Приготування розчинів ортофосфатної кислоти***

*ДР 3.1.1. Приготування розчину 6,5 N ортофосфатної кислоти для посівного апарату об'ємом 50 л*

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 100 мл вносять 41,75 мл води дистильованої, тільки після чого піпеткою при постійному перемішуванні додають 10,25 мл 85% розчину ортофосфатної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою. Розчин використовують для підкислення солей в посівному апараті на 50 л (ДР 7.2.2).

*ДР 3.1.2. Приготування розчину 6,5 N ортофосфатної кислоти для посівного апарату об'ємом 500 л*

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 1 л вносять 408,67 мл води дистильованої, після чого за допомогою циліндра при постійному перемішуванні додають 100,33 мл 85% розчину ортофосфатної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою. Розчин використовують для підкислення солей в посівному апараті на 500 л (ДР 7.3.2).

*ДР 3.1.3. Приготування розчину 6,5 N ортофосфатної кислоти для посівного апарату об'ємом 5 м<sup>3</sup>*

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 10 л вносять 4 041 мл води дистильованої, після чого за допомогою циліндра при постійному перемішуванні додають 992 мл 85% розчину ортофосфатної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою. Розчин використовують для підкислення солей в посівному апараті на 5 м<sup>3</sup> (ДР 7.4.2).

*ДР 3.1.4. Приготування розчину 6,5 N ортофосфатної кислоти для ферментера об'ємом 50 м<sup>3</sup>*

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-33] в збірник [З-34] об'ємом 100 л вносять 9 821,3 мл 85% розчину ортофосфатної кислоти. Додають 40 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Розчин використовують для корегування рН при виробничому біосинтезі (ТП 9).

### ***ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчинів амонію гідроксиду***

*ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація 12,5% розчину амонію гідроксиду для посівного апарату об'ємом 50 л*

На технічних вагах зважують 7,13 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 100 мл. Доливають 49,87 мл води дистильованої, перемішують. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу

закривають скляною пробкою. Розчин використовують для корегування рН при культивуванні в посівному апараті на 50 л (ТП 8.5).

*ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація 12,5% розчину амонію гідроксиду для посівного апарату об'ємом 500 л*

На технічних вагах зважують 70 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 1 л. Доливають 490 мл води дистильованої, перемішують. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою. Розчин використовують для корегування рН при культивуванні в посівному апараті на 500 л (ТП 8.6).

*ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація 12,5% розчину амонію гідроксиду для посівного апарату об'ємом 5 м<sup>3</sup>*

На технічних вагах зважують 692 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 10 л. Доливають 4,845 л води дистильованої, перемішують. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою. Розчин використовують для корегування рН при культивуванні в посівному апараті на 5 м<sup>3</sup> (ТП 8.7).

*ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація 12,5% розчину амонію гідроксиду для ферментера об'ємом 50 м<sup>3</sup>*

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-38] в збірник [З-40] об'ємом 100 л вносять 6 851,38 г амонію гідроксиду. Додають 47,96 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Стерилізують гострою парою 40 хв при температурі 131°C. Розчин використовують для корегування рН при виробничому біосинтезі (ТП 9).

**ДР 4. Приготування та стерилізація 40% розчину сахарози для підживлення при виробничому біосинтезі в ферментері об'ємом 50 м<sup>3</sup>**

Відповідно до розрахунку вмісту компонентів поживного середовища, вміст компонентів наведено в *табл. 6.1*.

Таблиця 6.1

Компонент підживлюючого розчину	Концентрація	Загальний вміст компонента на 27,405 м <sup>3</sup> середовища, кг
Глюкоза	230 г/л (40%)	5 730,2
Вода	60%	8 595,3

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-42] в збірник [З-44] об'ємом 32 м<sup>3</sup> вносять 5 730,2 кг сахарози. Додають 8 595,3 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112°C. Розчин використовують для підживлення при виробничому біосинтезі (ТП 9).

#### **ДР 5. Приготування та стерилізація концентрованого розчину мікроелементів для стадій підготовки посівного матеріалу**

На технічних вагах зважують 1,6 г FeSO<sub>4</sub>; 3,2 г H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,4 г ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O; 0,32 г Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O; 0,16 г CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O; 20,0 г MnCl<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O; 4,0 г CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O; 0,16 г Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O; 0,04 г біотину, вносять у колбу об'ємом 10 л. Доливають 3,970 л води дистильованої, перемішують. Вміст колби стерилізують фільтрацією з використанням фільтру з порами 0,22 мкм, після чого закривають ватно-марлевою пробкою. Розчин мікроелементів додають на стадіях підготовки посівного матеріалу в зазначених кількостях (ТП 8.4, ТП 8.5, ТП 8.6, ТП 8.7).

#### **ДР 6. Приготування та стерилізація піногаснику**

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-46] в збірник [З-47] об'ємом 100 л вносять 50 л піногасника Tween 80. При постійному перемішуванні (50-100 об/хв) нагрівають до 40°C, після чого за допомогою насоса [Н-48] подають 500 мл на ультрафільтраційну установку [УФ-49], що має фільтр з порами 0,22 мкм. Піногасник, що пройшов фільтрацію, через об'ємно-ваговий дозатор [Д-51] подають в збірник [З-52] для зберігання об'ємом 100 л за допомогою насоса [Н-50]. Далі на ультрафільтраційну установку подають 5 л води. Після фільтрації через об'ємно-ваговий дозатор [Д-51] воду подають в збірник [З-52] для зберігання об'ємом 100 л за допомогою насоса [Н-

50]. Почергову фільтрацію піногаснику та води повторюють 12 разів. Розчин піногаснику подають у відповідні апарати за допомогою насосу [Н-53] (ТП 8.5, ТП 8.6, ТП 8.7, ТП 9).

### **ДР 7. Приготування і стерилізація поживних середовищ**

#### **ДР 7.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці**

На першій стадії необхідно приготувати 2 560 мл поживного середовища. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в *табл. 6.2*. Приготування розчину мікроелементів наведено вище (ДР 5).

*Таблиця 6.2*

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2 560 мл середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 2 560 мл середовища, г (мл)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, V, мл</b>
Дріжджовий екстракт	30	69,81	<b>A</b>	2 442,99
Вода		744,52		
Сахароза	60	139,62		
Вода		1489,04		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	2,33	<b>B</b>	27,15
Вода		24,82		
MgSO <sub>4</sub>	0,2	0,47	<b>C</b>	86,86
Вода		4,96		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	6,98		
Вода		74,45		
P-н мікроелементів		3	<b>D</b>	3
Разом:		2 560		2 560

*ДР 7.1.1. Приготування і стерилізація композиції А*

На технічних вагах зважують 69,81 г дріжджового екстракту та 139,62 г сахарози. Наважки вносять в колбу на 5 л, додають 2 233,56 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 112°C.

*ДР 7.1.2. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 2,33 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Наважку переносять в колбу на 100 мл, додають 24,82 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

*ДР 7.1.3. Приготування і стерилізація композиції С*

На технічних вагах зважують 0,47 г  $\text{MgSO}_4$ , 6,98 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Наважки переносять в колбу на 250 мл, додають 79,41 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

***ДР 7.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 50 л***

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 50 л потребує 28,2 л поживного середовища. 10% (2,56 л) припадає на посівний матеріал, 10% (2,56 л) – на конденсат, який утворюється під час стерилізації середовища, що також враховують при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в *табл. 6.3*. Приготування розчину мікроелементів наведено вище (*ДР 5*).

*Таблиця 6.3*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 28,2 л середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 25,64 л середовища, г (л)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Дріжджовий екстракт	30	769,2	<b>А</b>	22,018

Вода		6,57		
Сахароза	60	1 538,4		
Вода		13,141		
$\text{KН}_2\text{PО}_4$	1	25,64	<b>В</b>	1,028
Вода		0,22		
$\text{MgSO}_4$	0,2	5,13		
Вода		0,044		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	76,92		
Вода		0,657		
Р-н мікроелементів		0,03	<b>С</b>	0,03
Конденсат		2,564		2,564
Разом:		25,64		25,64

*ДР 7.2.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-8] в збірник [З-10] об'ємом 30 л вносять 769,2 г дріжджового екстракту та 1 538,4 г сахарози. Додають 13,148 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112°C.

*ДР 7.2.2. Приготування і стерилізація композиції В*

На технічних вагах зважують 5,13 г  $\text{MgSO}_4$ , 76,94 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та 25,64 г  $\text{KН}_2\text{PО}_4$ . Наважки вносять в колбу об'ємом 2 л. При постійному перемішуванні додають 0,92 л води питної. Після розчинення композицію подають в посівний апарат [ПА-12] об'ємом 50 л, де підкислюють 6,5 N кислоти ортофосфатної (від ДР 3.1.1) до рН 4,0 – 4,5 з метою запобігання утворенню нерозчинних комплексів. Стерилізують композицію подачею гострої пари 40 хв при температурі 131°C.

***ДР 7.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 500 л***

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 500 л потребує 279,7 л поживного середовища. 10% (25,4 л) припадає на посівний матеріал, 10% (25,43 л) –

на конденсат, який утворюється під час стерилізації середовища, що також враховують при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в табл. 6.4. Приготування розчину мікроелементів наведено вище (ДР 5).

Таблиця 6.4

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 279,7 л середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 254,3 л середовища, г (л)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Дріжджовий екстракт	30	7 629	<b>A</b>	218,379
Вода		65,164		
Сахароза	60	15 258		
Вода		130,328		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	254,3	<b>B</b>	10,191
Вода		2,172		
MgSO <sub>4</sub>	0,2	50,86		
Вода		0,434		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	762,9		
Вода		6,517		
P-н мікроелементів		0,3	<b>C</b>	0,3
Конденсат		25,43		25,43
Разом:		254,3		254,3

*ДР 7.3.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-13] в збірник [З-15] об'ємом 300 л вносять 7,629 кг дріжджового екстракту та 15,258 кг сахарози. Додають 195,5 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112°C.

### *ДР 7.3.2. Приготування і стерилізація композиції В*

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-17] в збірник [З-18] об'ємом 20 л вносять 50,86 г MgSO<sub>4</sub>, 762,9 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> та 254,3 г KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 9,12 л води питної. Паралельно в збірник подають глуху пару для підвищення температури в збірнику до рівня 40°C, оскільки при такій температурі розчинність солей буде краща. Після розчинення композицію подають в посівний апарат [ПА-20] об'ємом 500 л самопливом, де підкислюють 6,5 N кислоти ортофосфатної (від ДР 3.1.2) до рН 4,0 – 4,5 з метою запобігання утворенню нерозчинних комплексів. Стерилізують композицію подачею гострої пари 40 хв при температурі 131°C.

### *ДР 7.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 5 м<sup>3</sup>*

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 5 м<sup>3</sup> потребує 2 768,2 л поживного середовища. 10% (251,7 л) припадає на посівний матеріал, 10% (251,65 л) - на конденсат, який утворюється під час стерилізації середовища, що також враховують при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в табл. 6.5. Приготування розчину мікроелементів наведено вище (ДР 5).

Таблиця 6.5

#### **Розрахунок вмісту компонентів для приготування 2 768,2 л середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 2 516,5 л середовища, г (л)</b>	<b>Композиція</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Дріжджовий екстракт	30	75,5	<b>А</b>	2 161
Вода		644,83		
Сахароза	60	151		
Вода		1 289,67		
KН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	2,52	<b>В</b>	100,85

Вода		21,5		
MgSO <sub>4</sub>	0,2	0,504		
Вода		4,3		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	7,55		
Вода		64,48		
Р-н мікроелементів		3	<b>С</b>	3
Конденсат		251,65		251,65
Разом:		2 516,5		2 516,5

*ДР 7.4.1. Приготування і стерилізація композиції А*

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-21] в збірник [З-23] об'ємом 3 м<sup>3</sup> вносять 75,5 кг дріжджового екстракту та 151 кг сахарози. Додають 1 934,5 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112°C.

*ДР 7.4.2. Приготування і стерилізація композиції В*

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-25] в збірник [З-26] об'ємом 200 л вносять 503,3 г MgSO<sub>4</sub>, 7 550 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> та 2 516 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 90,3 л води питної. Паралельно в збірник подають глуху пару для підвищення температури в збірнику до рівня 40°C, оскільки при такій температурі розчинність солей буде краща. Після розчинення композицію подають в посівний апарат [ПА-29] об'ємом 5 м<sup>3</sup> за допомогою насоса [Н-27], де підкислюють 6,5 N кислоти ортофосфатної (від ДР 3.1.3) до рН 4,0 – 4,5 з метою запобігання утворенню нерозчинних комплексів. Стерилізують композицію подачею гострої пари 40 хв при температурі 131°C.

***ДР 7.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу***

Для процесу біосинтезу необхідно 27,4 м<sup>3</sup> поживного середовища,  $K_3 = 0,55$ . Вміст поживного середовища при процесі біосинтезу дещо змінюється. 10% (2,49 м<sup>3</sup>) припадає на посівний матеріал та 10% (2,49 м<sup>3</sup>) - на конденсат, який утворюється під

час стерилізації поживного середовища (з урахуванням підживлюючого розчину) гострою парою, що також враховують. При розрахунку об'єму об'єму початкового середовища необхідно також враховувати об'єм підживлюючого розчину, що використовують при біосинтезі. Вміст компонентів наведено в *табл. 6.6*.

*Таблиця 6.6*

**Розрахунок вмісту компонентів для приготування 27,4 м<sup>3</sup> середовища**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 24,9 м<sup>3</sup> середовища, кг (л)</b>
Дріжджовий екстракт	60	1 494,83
Сахароза	55	1 370,26
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	24,91
MgSO <sub>4</sub>	0,2	4,98
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	74,74
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2	4,98
FeSO <sub>4</sub>	0,4	0,012
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,8	0,024
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,1	0,003
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0,08	0,0024
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0,04	0,0012
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	5,0	0,15
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	1,0	0,03
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,04	0,0012
біотин	0,01	0,0003
Вода		5 122
Конденсат		2 491,38
Разом:		10 588,3

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-30] в збірник [З-31] об'ємом 15 м<sup>3</sup> вносять 1 494,83 кг дріжджового екстракту, 1 370,26 кг сахарози, 4,98 кг MgSO<sub>4</sub>, 74,74 кг

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 24,91 кг KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,98 кг Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 г FeSO<sub>4</sub>; 24 г H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 3 г ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O; 2,4 г Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O; 1,2 г CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O; 150 г MnCl<sub>2</sub> • 4H<sub>2</sub>O; 30 г CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O; 1,2 г Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O; 0,3 г біотину. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 5 122 л води питної. Після розчинення поживне середовище подають на установку безперервної стерилізації [УБС-36] об'ємом 15 м<sup>3</sup> за допомогою насосу [Н-32]. Стерилізують композицію подачею гострої пари 40 хв при температурі 131°C.

## **ТП 8. Підготовка посівного матеріалу**

### **ТП 8.1. Підтримання колекційної культури**

Колекційну культуру *Raenibacillus polytuxa* DSM 365 зберігають в ампулах зі 50% стерильним гліцерином при температурі -80°C. У роботі з колекційною культурою дотримуються асептичних умов.

### **ТП 8.2. Одержання культури в рідкому середовищі**

Для активації колекційної культури, що зберігають в ампулах з гліцерином, в ампулу додають стерильне рідке середовище LB в кількості 1 мл. Суспензію з середовищем перемішують в ампулі, переносять в пробірку з 5 мл рідкого стерильного LB. Вміст пробірки ретельно перемішують. Відбирають пробу 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти.

### **ТП 8.3. Одержання робочої культури**

Вміст пробірки (від ТП 8.2) кількістю 0,2 мл піпеткою переносять в пробірки з рідким середовищем наступного складу: 20 г/л глюкози, 10 г/л дріжджового екстракту, 0,2 г/л MgSO<sub>4</sub>, 3 г/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 мМ калій/натрій фосфатний буфер (рН 6) та 3 мл розчину мікроелементів. Вирощують 24 год при 37°C при струшуванні 150 об/хв. Після цього відбирають проби по 0,1 мл з пробірки на встановлення мікробіологічної чистоти.

### **ТП 8.4. Вирощування культури в колбах на качалці**

В колбу з композицією С (від ДР 7.1.3) в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 7.1.1), композицію В (від ДР 7.1.2) та 3 мл концентрованого розчину мікроелементів (від ДР 5). Середовище розливають по 150 мл в 18 колб ємністю 750 мл для вирощування на качалці.

З пробірок із робочою культурою *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 відбирають піпетками бактеріальну суспензію та вносять в колби з поживним середовищем, причому одна пробірка використовується для засіву однієї колби. Культивування проводять 24 год [5] за температури 37°C при перемішуванні 150 об/хв. Після цього відбирають проби по 0,1 мл з колби на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (має бути 0,5-1,0 г/л).

Після проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 5 л.

#### ***ТП 8.5. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 50 л***

В стерильну засівну колбу на 5 л в асептичних умовах вносять 30 мл концентрованого розчину мікроелементів (від ДР 5).

В посівний апарат [ПА-12] зі стерильною композицією В (від ДР 7.2.2) в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 7.2.1) самопливом та вміст засівної колби. Додають 12,5% розчин гідроксиду амонію (від ДР 3.2.1) для доведення рН до 6,0, після чого з засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 8.4). При необхідності вносять 6,5 N кислоти ортофосфатної (від ДР 3.1.4).

Культивування проводять 24 год [5] за температури 37°C при перемішуванні 150 об/хв. Кожні 8 год відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (на кінець культивування має бути 0,5-1,0 г/л).

#### ***ТП 8.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 500 л***

В посівний апарат [ПА-20] зі стерильною композицією В (від ДР 7.3.2) в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 7.3.1) за допомогою насоса [Н-16] та 300 мл концентрованого розчину мікроелементів (від ДР 5). Додають 12,5% розчин гідроксиду амонію (від ДР 3.2.2) для доведення рН до 6,0, після чого вносять посівний матеріал (від ТП 8.5) через трубу перетискування. При необхідності вносять 6,5 N кислоти ортофосфатної (від ДР 3.1.4).

Культивування проводять 24 год [5] за температури 37°C при перемішуванні 150 об/хв. Кожні 8 год відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної

чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (на кінець культивування має бути 0,5-1,0 г/л).

### **ТП 8.7. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 5 м<sup>3</sup>**

В посівний апарат [ПА-29] зі стерильною композицією В (від ДР 7.4.2) в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 7.5.1) за допомогою насосу [Н-24] та 3 л концентрованого розчину мікроелементів (від ДР 5). Додають 12,5% розчин гідроксиду амонію (від ДР 3.2.3) для доведення рН до 6,0, після чого вносять посівний матеріал (від ТП 8.6) через трубу перетискування. При необхідності вносять 6,5 N кислоти ортофосфатної (від ДР 3.1.4).

Культивування проводять 24 год [5] за температури 37°C при перемішуванні 150 об/хв. Кожні 8 год відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (на кінець культивування має бути 0,5-1,0 г/л).

### **ТП 9. Біосинтез**

Виробниче культивування здійснюють в ферментері [ФР-55] з робочим об'ємом 50 м<sup>3</sup>. В ферментер за допомогою насосу [Н-37] подають поживне середовище (від ДР 7.5). Через трубу перетискування з посівного апарату [ПА-29] в ферментер подають посівний матеріал (від ТП 8.7). При необхідності для корегування рН вносять 6,5 N кислоти ортофосфатної (від ДР 3.1.4) за допомогою насосу [Н-35] або подають 12,5% розчин гідроксиду амонію (від ДР 3.2.4) за допомогою насосу [Н-41].

Культивування триває 54 год [5] при температурі 37°C з постійною аерацією, перемішуванням 500 об/хв. Автоматично подають піногасник (від ДР 5) за допомогою насосу [Н-53]. Через 8 годин культивування зі збірника [З-44] за допомогою насоса [Н-45] вносять підживлюючий розчин сахарози (від ДР 4) в кількості 70 мл/л кожні. Наступні підживлення роблять в такій самій кількості після 14 год культивування та після 20 год. Далі роблять підживлення в кількості 70 мл/л кожні 5,5 годин до кінця біосинтезу.

Кожні 6 годин з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Показники умов

культивування регулюються за допомогою автоматичних датчиків температури, тиску, рН протягом всього процесу виробничого культивування. Виробничий біосинтез завершують при досягненні концентрації 2,3-бутандіолу – 111 г/л.

### **ТП 10. Відділення біомаси центрифугуванням культуральної рідини**

Після виробничого біосинтезу з ферментера [ФР-55] насосом [Н-56] подають культуральну рідину у кількості 24,66 м<sup>3</sup> у збірник [З-57] до повного спустошення ферментера [ФР-55]. Зі збірника культуральну рідину насосом [Н-58] подають на проточну центрифугу [Ц-59] зі швидкістю 3000 л/год до повного спустошення збірника [З-57]. Центрифугування проходить при 8000 об/хв. Супернатант направляють на екстракцію (*ТП 11*). Біомасу направляють на знешкодження відходів.

### **ТП 11. Екстракція**

Після відділення біомаси супернатант зі швидкістю 3000 л/год із центрифуги [Ц-59] подають в екстрактор [ЕК-62]. Через інший патрубок зі збірника [З-60] насосом [Н-61] подають 2-гептанол зі швидкістю 870 л/год. Подачу здійснюють до повного спустошення збірника [З-57]. Після екстракції органічну фракцію направляють в збірник [З-63]. Водну фракцію направляють на знешкодження відходів.

### **ТП 12. Ректифікація**

#### ***ТП 12.1. Зневоднення***

Зі збірника [З-63] суміш в кількості 1250 л подають насосом [Н-64] на ректифікаційну колону [РК-65]. Встановлюють температуру 110°C та проводять нагрівання. Встановлюють відток легколетючої фракції 6 л/год. Легколетючі компоненти після дистиляції направляють на знешкодження відходів. Через 4 години, а потім кожні 2 год відбирають пробу з куба та перевіряють концентрацію 2,3-бутандіолу. Процес зупиняють при досягненні концентрації 2,3-бутандіолу 27,58%. Рідку фракцію направляють на наступну ректифікаційну колону [РК-67]. Повторюють процес до повного спустошення збірника [З-63].

#### ***ТП 12.2. Очистка 2,3-бутандіолу та регенерація 2-гептанолу***

Від ректифікаційної колони [РК-65] суміш в кількості 1200 л подають насосом [Н-66] на ректифікаційну колону [РК-67]. Встановлюють температуру 170°C та проводять нагрівання. Встановлюють відток легколетючої фракції (2-гептанол) 90

л/год. Після дистиляції 2-гептанол направляють в збірник [З-60]. Через 6 годин, а потім кожні 2 год відбирають пробу з куба та перевіряють концентрацію 2,3-бутандіолу. Процес зупиняють при досягненні концентрації 2,3-бутандіолу 99%. Рідкий 2,3-бутандіол направляють в збірник [З-69] насосом [Н-68]. Повторюють процес до повного спустошення збірника [З-63].

### **ПМВ 13. Пакування, маркування, відвантаження**

#### ***ПМВ 13.1. Фасування 2,3-бутандіолу***

Ставлять дозування 25 л. На доріжку апарата ставлять металеву бочку. Рідкий 2,3-бутандіол зі збірника [З-69] подають в дозатор фасувальної машини [ФМ-70]. Після наповнення бочку щільно закривають кришкою і направляють в сторону для наступних робіт. Повторюють фасування до повної розфасовки продукту.

#### ***ПМВ 13.2. Маркування***

Металеві бочки з 2,3-бутандіолом маркують. В маркуванні вказують назву товару, фірмове найменування виробника та місце його знаходження, склад та основні властивості товару, спосіб застосування та умови зберігання, вага, дата та місце виробництва, пакування, правила та умови безпечного використання, термін придатності, наносять ідентифікаційний штрих-код.

### **ЗВ 14. Знешкодження відходів**

#### ***ЗВ 14.1. Знешкодження газоподібних відходів***

Відпрацьоване повітря направляють на фільтруючі системи, де воно очищується. Перевіряють чистоту повітря та потім використовують повторно.

#### ***ЗВ 14.2. Знешкодження рідких відходів***

Рідкі відходи, в тому числі залишки біомаси, направляють на біофільтр. Після очищення вони перевіряються на чистоту, після чого можуть бути використані повторно для технічних цілей або спущені у водойми.

#### ***ЗВ 14.3. Знешкодження твердих відходів***

Відпрацьований фільтрувальний матеріал та біомасу направляють в контейнер для горючих відходів. Контейнер направляється на установку термічного знешкодження відходів.

Бракований пакувальний матеріал збирають окремо та без попередньої обробки направляють до пунктів прийому вторинної сировини.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 7.1. Карта контрольних точок виробництва 2,3-бутандіолу

Карта постадійного контролю доферментаційних процесів, виробничого біосинтезу та післяферментаційних процесів наведена в *табл. 7.1*.

*Таблиця 7.1*

#### Контрольні точки виробництва 2,3-бутандіолу

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Км ДР 1.2.1 <i>Щоденне прибирання</i>	<b>Підлога, стіни</b> Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Після прибирання	КУО < 800/см <sup>2</sup>
Км ДР 1.2.2 <i>Генеральне прибирання</i>	<b>Підлога, стіни, вікна, двері, поверхні</b> Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Після прибирання	КУО < 300/см <sup>2</sup>
Кт ДР 1.3.1 <i>Миття</i>	<b>Обладнання та комунікації</b> Температура мийного розчину, час миття	Термометр технічний, годинник	Під час миття	t = 60°C, 20 хв
Кт ДР 1.3.2 <i>Технічний огляд</i>	<b>Обладнання та комунікації</b> Неущільнення	Візуальний огляд	-	Відсутність неущільнень

Кт ДР 1.3.3 <i>Перевірка на герметичність</i>	<b>Обладнання та комунікації</b> Тиск, час перевірки, герметичність обладнання	Годинник, манометр технічний	Тиск визначається безперервно під час перевірки	$P = 0,2$ МПа, 60 хв
Кт, Км ДР 1.3.4 <i>Стерилізація</i>	<b>Обладнання та комунікації</b> Температура, час стерилізації, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації	$t = 130-135^{\circ}\text{C}$ , 60 хв, відсутність мікробіоти
Кт ДР 2.2 <i>Забір атмосферного повітря</i>	<b>Атмосферне повітря</b> Висота забору	-	При установці труби	$H = \text{дах} + 3$ м
Кт ДР 2.2 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часток</i>	<b>Повітря на виході з фільтру грубого очищення</b> Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	$E = 80\%$
Кт ДР 2.3 <i>Стиснення повітря</i>	<b>Стиснене повітря</b> Температура, тиск	Термометр технічний, манометр технічний	Вимірюється після стиснення	$t = 120-250^{\circ}\text{C}$ , $P = 0,35$ МПа
Кт ДР 2.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	<b>Охолоджене повітря</b> Температура повітря, частка вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження та видалення зайвої вологи	$t = 25-30^{\circ}\text{C}$ , $w = 60-70\%$

Кт ДР 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	<b>Нагріте повітря</b> Температура повітря, частка вологи	Термометр технічний, психрометричний метод	Після нагрівання	t = 50°C, w = 50%
Кт ДР 2.6 <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 95%
Кт ДР 2.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 99,99%
Кт, Км ДР 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 <i>Приготування та стерилізація розчинів амонію гідроксиду</i>	<b>Розчин амоній гідроксиду</b> Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Мікробіологічний контроль після приготування	відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 4 <i>Приготування та стерилізація 40% розчину сахарози</i>	<b>Розчин сахарози</b> Температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 5 <i>Приготування та стерилізація концентровано-го розчину мікроелементів</i>	<b>Концентрований розчин мікроелементів</b> Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Мікробіологічний контроль після стерилізації	відсутність мікробіоти

Кт, Км ДР 6 <i>Приготування та стерилізація піногаснику</i>	<b>Розчин піногаснику</b> Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Мікробіологічний контроль після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 7.1.1, 7.2.1, 7.3.1, 7.4.1 <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	<b>Композиція А</b> Температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 7.1.2 <i>Приготування та стерилізація композиції В</i>	<b>Композиція В</b> Температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км ДР 7.2.2, 7.3.2, 7.4.2 <i>Приготування та стерилізація композиції В</i>	<b>Композиція В</b> Температура, час, рН, стерильність	Термометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Температура та рН визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, рН = 4,0-4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 7.1.3 <i>Приготування та стерилізація композиції С</i>	<b>Композиція С</b> Температура, час, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти

<p>Кт, Кх, Км ДР 7.5 Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу</p>	<p><b>Поживне середовище</b> Температура, час, рН, стерильність</p>	<p>Термометр технічний, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу</p>	<p>Температура та рН визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 131^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 40</math> хв, рН = 4,0-4,5, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт ТП 8.1 Підтримання колекційної культури</p>	<p><b>Колекційна культура <i>Raenibacillus polytuxa</i> DSM 365</b> Температура</p>	<p>Термометр технічний</p>	<p>Температура визначається безперервно</p>	<p><math>t = -80^{\circ}\text{C}</math></p>
<p>Кт, Км ТП 8.2 Одержання культури в рідкому середовищі</p>	<p><b>Колекційна культура <i>Raenibacillus polytuxa</i> DSM 365</b> Температура, морфологічна однорідність, мікробіологічна чистота культури, відсутність неконтрольованих мутацій</p>	<p>Термометр технічний, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу</p>	<p>Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль після активації</p>	<p><math>t = 15-20^{\circ}\text{C}</math>, відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота</p>

<p>Кт, Км ТП 8.3 <i>Одержання робочої культури</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> Тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Годинник, Термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу</p>	<p>Температура контролюється і підтримується автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 годин</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 150</math> об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіоло- гічна чистота</p>
<p>Кт, Км ТП 8.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалці</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу, спектрофотометр</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 годин, концентрація біомаси визначається спектрофотомет- ричним методом</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 150</math> об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, OD=0,5-1,0</p>

<p>Кт, Кх, Км ТП 8.5 <i>Вирощування культури в посівному апараті 50 л</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН середовища, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, датчик рН, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу, спектрофотометр</p>	<p>Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 години, концентрація біомаси визначається спектрофотометричним методом</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 150</math> об/хв, рН = 6,0, відсутність сторонньої мікробіоти, OD=5-10</p>
<p>Кт, Кх, Км ТП 8.6 <i>Вирощування культури в посівному апараті 500 л</i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН середовища, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, датчик рН, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу, спектрофотометр</p>	<p>Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 години, концентрація біомаси визначається спектрофотометричним методом</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 150</math> об/хв, рН = 6,0, відсутність сторонньої мікробіоти, OD=5-10</p>

<p>Кт, Кх, Км ТП 8.7 <i>Вирощування культури в посівному апараті 5 м<sup>3</sup></i></p>	<p><b>Посівний матеріал</b> тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН середовища, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси</p>	<p>Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, датчик рН, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу, спектрофотометр</p>	<p>Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 години, концентрація біомаси визначається спектрофотометричним методом</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 24</math> год, <math>\omega = 150</math> об/хв, рН = 6,0, відсутність сторонньої мікробіоти, OD=5-10</p>
<p>Кт, Кх, Км ТП 9 <i>Виробничий біосинтез</i></p>	<p><b>Культуральна рідина</b> тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація сахарози, концентрація клітин <i>Raenibacillus polyuxa</i> DSM 365, концентрація продукту</p>	<p>Датчик рН, годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу, спектрофотометр, рідинний хроматограф</p>	<p>Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікробіологічний контроль кожні 4 години, концентрація біомаси визначається спектрофотометричним методом, концентрація сахарози та 2,3-бутандіолу визначається методом ВЕРХ</p>	<p><math>t = 37^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 54</math> год, <math>\omega = 500</math> об/хв, рН = 6,0, <math>S_{сах} = 28</math> г/л, відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота, кінцева концентрація біомаси = 51,3 г/л, кінцева концентрація 2,3-бутандіолу = 111 г/л</p>

Кт ТП 10 <i>Відділення біомаси центрифугуванням культуральної рідини</i>	<b>Культуральна рідина</b> Частота обертів центрифуги, швидкість подачі культуральної рідини	Тахометр технічний, анемометр технічний	Всі показники визначаються безперервно	$w = 3\ 000$ л/год, $\omega = 8\ 000$ об/хв
Кт ТП 11 <i>Екстракція</i>	<b>Супернатант</b> Швидкість подачі супернатанту і розчинника	анемометр технічний	Всі показники визначаються безперервно	$w_1 = 3\ 000$ л/год, $w_2 = 870$ л/год
Кт, Кх ТП 12.1 <i>Зневоднення</i>	<b>Розчин 2,3-бутандіолу</b> Температура, швидкість відтоку легколетючої фази, концентрація 2,3-бутандіолу	Термометр технічний, анемометр технічний, методика згідно пункту 7.3.2 цього розділу	Температура і швидкість визначаються безперервно, концентрація через 4 год і потім кожні дві	$w = 6$ л/год, $t = 110^\circ\text{C}$ , $c = 27,58\%$
Кт, Кх ТП 12.2 <i>Очистка 2,3-бутандіолу та регенерація 2-гептанолу</i>	<b>Розчин 2,3-бутандіолу</b> Температура, швидкість відтоку легколетючої фази, концентрація 2,3-бутандіолу	Термометр технічний, анемометр технічний, методика згідно пункту 7.3.2 цього розділу	Температура і швидкість визначаються безперервно, концентрація через 6 год і потім кожні дві	$w = 90$ л/год, $t = 170^\circ\text{C}$ , $c = 99\%$
Кт ПМВ 13.1 <i>Фасування 2,3-бутандіолу</i>	<b>2,3-бутандіол</b> Об'єм продукту в одній бочці	Дозатор фасувального апарату	Під час прокачування через дозатор	$V = 25$ л
Кт ПМВ 13.2 <i>Маркування</i>	<b>Бочки з 2,3-бутандіолом</b> Правильність маркування	Правильність маркування згідно вимог до маркування	Після нанесення маркування	Правильність маркування

Кт, Км ЗВ 14.1 <i>Знешкодження газоподібних відходів</i>	<b>Знешкоджені газоподібні відходи</b> Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Мікробіологічний контроль після знешкодження газоподібних відходів	Відсутність мікробіоти
Кт, Км ЗВ 14.2 <i>Знешкодження рідких відходів</i>	<b>Знешкоджені рідкі відходи</b> Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Мікробіологічний контроль після знешкодження рідких відходів	Відсутність мікробіоти
Кт, Км ЗВ 14.3 <i>Знешкодження твердих відходів</i>	<b>Знешкоджені тверді відходи</b> Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 7.2.2 цього розділу	Мікробіологічний контроль після знешкодження твердих відходів	Відсутність мікробіоти

## 7.2. Контроль виробничого процесу одержання 2,3-бутандіолу

### 7.2.1. Технологічний контроль

Технологічний контроль має на увазі спостереження за правильним ходом процесу виробництва, чітке дотримання технологічного процесу, а також контроль різних показників, що здійснюють автоматично за допомогою датчиків і вимірювальних приладів.

Сучасне обладнання для біотехнологічного виробництва може бути обладнане всіма необхідними датчиками, які автоматично зчитують показання і при необхідності корегують роботу частин приладів. Крім того, процес контролюють також працівники. Все це дозволяє проводити процеси точно, ефективно й без браку.

### 7.2.2. Мікробіологічний контроль

#### 7.2.2.1. Мікроскопіювання нативних препаратів

Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю культуральної рідини, стерильного поживного середовища чи іншого об'єкту дослідження, накривають накривним скельцем і розглядають зі збільшенням x400 та x900 (з імерсійною олією).

В препаратах з культуральної рідини мають бути наявні палички  $2-5 \times 0,6-0,8$  мкм, поодинокі або в парах, рухливі, що рухаються парами за допомогою перитрихіальних джгутиків, або нерухомі. Можуть мати спори, що перевищують розмір клітини і тоді форма клітини лимоноподібна [108].

Вигляд бактерій *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 під мікроскопом зображено на рис. 7.1.

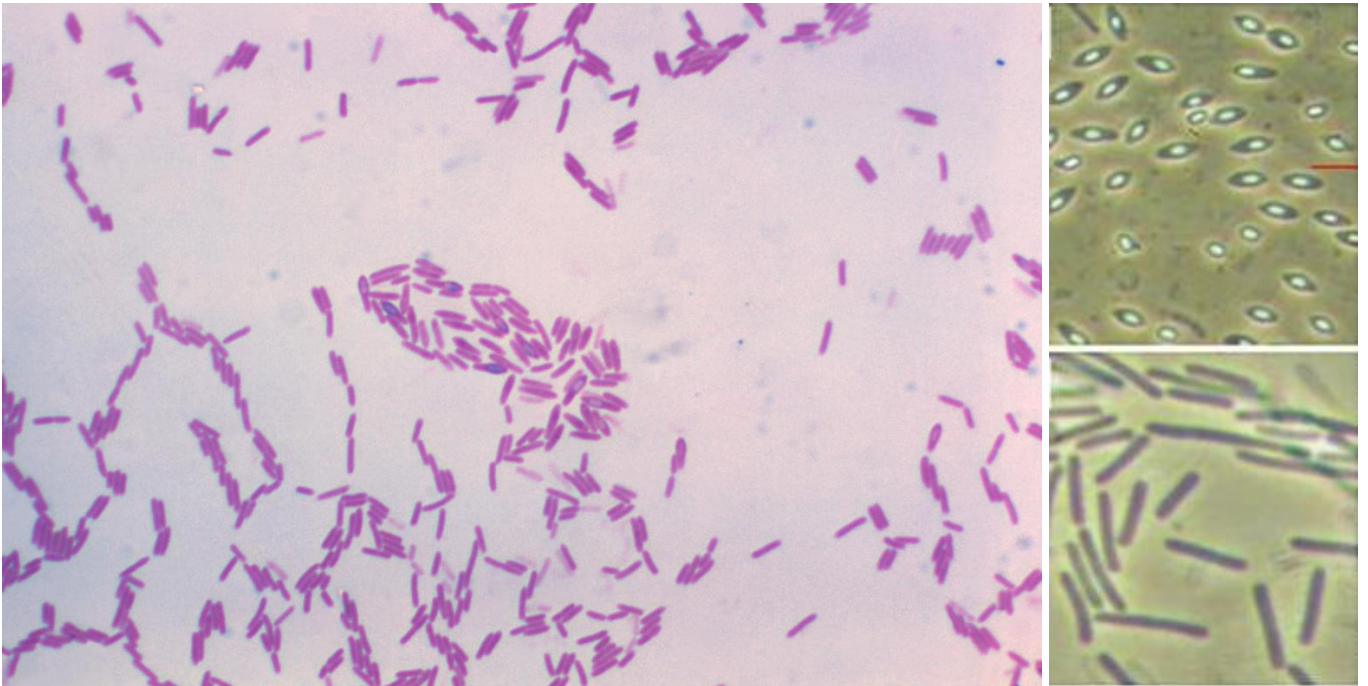


Рис. 7.1. Морфологічний вигляд *Paenibacillus polymyxa* DSM 365

В препаратах зі стерильного поживного середовища, конденсату та знешкоджених відходів не має бути мікроорганізмів.

#### 7.2.2.2. Висів на поживні середовища

З метою перевірки або підтвердження наявності сторонньої мікробіоти, пробу культуральної рідини, стерильного поживного середовища чи іншого об'єкта дослідження мікробіологічною петлею висівають методом виснажуючого штриха для отримання ізольованих колоній на МПА для виявлення бактерій та на середовище Сабуро для виявлення грибів. Інкубацію проводять 24 год при температурах  $30-35^{\circ}\text{C}$  та  $20-25^{\circ}\text{C}$  відповідно.

При висівах культуральної рідини мають бути наявні невеликі безбарвні, плоскі або опуклі, гладкі і слизисті колонії з пильчастим краєм на МПА, на середовищі Сабуро росту не повинно бути [109].

Вигляд окремих колоній бактерій *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 на поживному середовищі зображено на *рис. 7.2.*



**Рис. 7.2. Зовнішній вигляд колоній *Paenibacillus polymyxa* DSM 365**

При висівах зі стерильного поживного середовища, конденсату та знешкоджених відходів не має бути колоній на жодному з середовищ. При висівах проб після прибирання загальна кількість КУО має бути не більше 800/см<sup>2</sup> після щоденного прибирання та не більше 300/см<sup>2</sup> після генерального прибирання.

### **7.2.3. Показники росту і синтезу цільового продукту**

#### **7.2.3.1. Концентрація біомаси**

Контроль концентрації біомаси *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 здійснюють вимірюванням оптичної густини на спектрофотометрі при довжині хвилі 660 нм в кюветі на 1 см. Показники оптичної густини за отримання посівного матеріалу в колбах на качалці мають становити OD=0,5-1,0, а при виробничому культивуванні – OD=50,0-55,0. Концентрацію біомаси визначають за допомогою калібрувального графіка, який готують на основі стандартних розчинів [5].

### 7.2.3.2. Концентрація цільового продукту

Концентрацію 2,3-бутандіолу визначають з використанням високоефективної рідинної хроматографії [5].

Підготовка проби: пробу культуральної рідини у кількості 100 мл центрифугують на центрифугі з охолодженням за наступних параметрів: 6 000 об/хв, тривалість 20 хв, температура 4°C. Супернатант відливають в колбу на 250 мл та використовують для визначення вмісту 2,3-бутандіолу [28].

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) являє собою один з видів колонкової хроматографії, при якій пробна суміш (аналіт) в розчиннику (рухома фаза) закачується в колону з хроматографічним матеріалом (стаціонарна фаза) під високим тиском. Зразок при цьому переноситься рухомих потоком. Розділення компонентів відбувається внаслідок відмінності коефіцієнтів розподілення між двома рідкими фазами – рухомою і нерухомою. ВЕРХ дуже широко застосовують для розділення і визначення самих різноманітних речовин: оптично-активних сполук, білків, нуклеїнових і амінокислот, полісахаридів, барвників, вибухових речовин, біологічних об'єктів, лікарських препаратів і т.д. Метод використовують для проведення профільного хроматографічного аналізу медично-біологічних об'єктів у випадку їх патологічних відхилень від норми [110].

Метод ВЕРХ має ряд переваг над іншими метод хроматографії:

- швидкість проведення аналізу перевищує більшість інших існуючих методів;
- колонки з сорбентом для ВЕРХ багаторазового використання і не потребують відновлення чи регенерації;
- відтворюваність результатів різних проб дуже висока;
- управління дослідом, аналізом, обробкою інформації, та оформлення кінцевих результатів повністю автоматизовані;
- робоча температура термостатування лежить між температурою замерзання і кипіння рухомої фази (частіше в межах 20 – 50 °C) [110].

Умови проведення: система ВЕРХ Shimadzu (Кіото, Японія), хроматографічна кислотна колонка 7,8×300 мм Phenomenex, сорбент Rezex ROA-H<sup>+</sup>, температура в

колонці 70°C, елюент 2,5 мМ сірчаної кислоти, швидкість подачі 0,5 мл/хв, рефрактометричний детектор (RID) та мас-детектор (SQ) [5].

Методика: Пробу супернатанту в кількості 50 мкл вводять в клапан вприскування. Після адсорбції з сорбентом подають елюент із зазначеною швидкістю. При цьому 2,3-бутандіол проходить через рефрактометричний детектор, піки реєструються в системі та відображаються на комп'ютері. Для точності вимірювання використовують також мас-детектор, який налаштовують на молекулярну масу 91 (маса бутандіолу+гідроген) [5].

### 7.2.3.3. Концентрація джерел вуглецю та азоту

Для визначення споживання джерел вуглецю та азоту проводять центрифугування культуральної рідини з метою відділення біомаси від поживного середовища. Пробу культуральної рідини у кількості 50 мл центрифугують на центрифугі з охолодженням за наступних параметрів: 6 000 об/хв, тривалість 20 хв, температура 4°C. Супернатант відливають в колбу на 100 мл та використовують для проведення досліджень [28].

**Джерелом вуглецю** при культивуванні *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 з метою отримання 2,3-бутандіолу є сахароза. Кількісне визначення сахарози в поживному середовищі та культуральній рідині проводять методом високоефективної рідинної хроматографії [5].

Умови проведення: хроматографічна кислотна колонка 7,8×300 мм, сорбент Rezex ROA-H<sup>+</sup>, температура в колонці 70°C, елюент 2,5 мМ сірчаної кислоти, швидкість подачі 0,5 мл/хв, рефрактометричний детектор (RID) [5].

Методика: Пробу супернатанту в кількості 50 мкл вводять в клапан вприскування. Після адсорбції з сорбентом подають елюент із зазначеною швидкістю. При цьому сахароза проходить через рефрактометричний детектор, піки реєструються в системі та відображаються на комп'ютері [5].

**Джерелом азоту** в середовищі є сульфат амонію. Визначення аміачного азоту проводять фотометрично з використанням тестового набору Merck. Метод заснований на здатності іонів амонію взаємодіяти з реактивом Несслера з утворенням

сполуки жовто-коричневого кольору з подальшим фотометричним визначенням і розрахунком масової концентрації [5].

Умови проведення: кювета 24 мм, довжина хвилі 425 нм, розчин порівняння: безаміачна вода з 1 мл сегнетової солі та 1 мл реактиву Несслера [111].

Методика: в колбу на 100 мл наливають 50 мл супернатанту, додають 1 мл сегнетової солі та 1 мл реактиву Несслера, перемішують. Через 10 хв вимірюють оптичну густину. Вміст амонію знаходять за калібрувальним графіком [111].

Зазначимо, що дріжджовий екстракт в середовищі є вторинним джерелом вуглецю та азоту, проте його визначення не проводимо. Це пов'язано з тим, що основна функція додавання дріжджового екстракту – зниження синтезу домішкових речовин *Paenibacillus polytuxa* DSM 365 під час виробничого біосинтезу. Експериментально доведено, що при додаванні 60 г/л дріжджового екстракту бактерія синтезує лише 2,3-бутандіол, тобто не синтезує ніяких нецільових сполук. Крім того, дріжджовий екстракт не має чітко визначеного складу, та під час експериментів визначали вміст джерел вуглецю та азоту (сахароза і сульфат амонію), серед яких дріжджового екстракту не було [5].

### **7.3. Контроль готового продукту**

#### **7.3.1. Органолептичні показники**

Зовнішні показники – колір, консистенцію, запах контролюють органолептично. Має бути прозора в'язка рідина без запаху, без осаду і завислих часточок [1].

#### **7.3.2. Кількісне визначення 2,3-бутандіолу**

Кількісне визначення готового продукту проводять за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії. Такий метод дає змогу розділити речовини при забезпеченні структурної ідентичності кожного з них. Для аналізу 2,3-бутандіолу, його попередньо розводили в рівній кількості метанолу [1].

Умови проведення: система LC-MS Thermo Q Exactive HF (Thermo Scientific, USA), хроматографічна колонка Waters Acquity UPLC BEH Amide column (2.1 x 150mm, 1.7µm), температура в колонці 65°C, елюент А – 0,1% FA, В – ACN/0,1% FA,

швидкість подачі 0,5 мл/хв, рефрактометричний детектор (RID) та мас-детектор (SQ) [1].

Виявлення проводили за допомогою джерела ESI, параметри оптимізували в режимі позитивної іонізації. Налаштування були встановлені наступним чином: капілярна напруга 3,1 кВ, напруга екстрактора 3 В, радіочастотна лінза 0,1 В, температура джерела 150°C, температура десольватації 450°C, потік газу конуса та десольватації 50 і 800 л/год відповідно [1].

Методика: Пробу продукту в кількості 100 мкл розводять в 100 мкл метанолу. В клапан вприскування вводять пробу в кількості 2 мкл. Після адсорбції з сорбентом подають елюент із зазначеною швидкістю. При цьому 2,3-бутандіол проходить через рефрактометричний детектор, піки реєструються в системі та відображаються на комп'ютері. Для точності вимірювання використовують також мас-детектор, який налаштовують на молекулярну масу 91 (маса бутандіолу+гідроген) [1].

### ***7.3.3. Контроль пакування, маркування, транспортування***

Контроль пакування проводять візуально. Кришки бочок мають бути щільно закриті. Бочки мають бути цілі, без зламів, тріщин, вигинів, іржі.

Контроль маркування проводять згідно загально прийнятих вимог. Має бути вказано назву товару, фірмове найменування виробника, місце його знаходження, склад та основні властивості товару, спосіб застосування та умови зберігання продукту, вага, дата та місце виробництва, пакування, правила та умови безпечного використання, термін придатності, наносять ідентифікаційний штрих-код, перевіряють позначення поводження з даною хімічною речовиною.

Перед транспортуванням оглядають стан бочок, перевіряють надійність закріплення бочок, щоб вони не впали, перевіряють наявність наклейки із зазначенням категорій NFPA 704, піктограм небезпеки УГС та інших позначок, які необхідно вказувати на пакуванні хімічних речовин.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Compound summary. 2,3-Butanediol. *National Center for Biotechnology Information*. 2021. [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_3-Butanediol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Butanediol)
2. Бутиленглицоль. // Saraya. – 2021. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://saraya-shop.ru/poleznaya-informatsia/butilenglikol>
3. Используем силу природы: подготовлен бизнес-план производства эфирных масел. // Pro-Consulting. – 2018. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://pro-consulting.ua/pressroom/ispolzuem-silu-prirody-podgotovlen-biznes-plan-proizvodstva-efirnyh-masel>
4. Никитина М.А. Конверсия 2,3-бутандиола на фосфатных катализаторах: Автореф. дис. канд. хим. наук. Москва, 2016. 141 с.
5. Häßler T., Schieder D., Pfaller R., Faulstich M., Sieber V. Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Bioresource Technology*. 2012, 124: 237-244. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.047.
6. Guragain Y.N., Vadlani P.V. 2,3-Butanediol production using *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724: Evaluation of biomass derived sugars and fed-batch fermentation process. *Process Biochemistry*. 2017, 58: 25–34. doi:10.1016/j.procbio.2017.05.001.
7. Thapa L.P., Lee S.J., Park C., Kim S.W. Metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* to improve the production of 2,3-butanediol. *Biochemical Engineering Journal*. 2019, 143: 169–178. doi:10.1016/j.bej.2018.12.019.
8. Lee S.C., Woo H.C., Kim Y.H. Energy-efficient recovery process of 2,3-butanediol using 2-heptanol extraction. *Chemical Engineering and Processing – Process Intensification*. 2020, 160. doi: 10.1016/j.cep.2020.108286.
9. Hong J., Van Duc Long N., Harvianto G.R., Haider J., Lee M. Design and Optimization of Multi-Effect-Evaporation-assisted Distillation Configuration for Recovery of 2,3-butanediol from Fermentation Broth. *Chemical Engineering and Processing – Process Intensification*. 2019, 136: 107-115. doi: 10.1016/j.cep.2019.01.002.

10. Jiang B., Li Z.-G., Dai J.-Y., Zhang D.-J., Xiu Z.-L. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system. *Process Biochemistry*. 2009, 44(1): 112–117. doi: 10.1016/j.procbio.2008.09.019.
11. Narisetty V., Amraoui Y., Abdullah A., Ahmad E., Agrawal D., Parameswaran B., Kumar V. High yield recovery of 2,3-butanediol from fermented broth accumulated on xylose rich sugarcane bagasse hydrolysate using aqueous two-phase extraction system. *Bioresource Technology*. 2021, 337. doi: 10.1016/j.biortech.2021.12546.
12. Jeon S., Kim D.-K., Song H., Lee H.J., Park S., Seung D., Chang Y. K. 2,3-Butanediol recovery from fermentation broth by alcohol precipitation and vacuum distillation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, 117(4): 464–470. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.007.
13. Zeigler D.R. The family *Paenibacillaceae*. In: Strain catalog and reference. Columbus: Bacillus Genetic Stock Center; 2013. p. 1–32.
14. Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z.-C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact*. 2016, 15: 203. doi: 10.1186/s12934-016-0603-7.
15. Liang T.-W., Tseng S.-C., Wang S.-L. Production and Characterization of Antioxidant Properties of Exopolysaccharide(s) from *Paenibacillus mucilaginosus* TKU032. *Mar Drugs*. 2016, 14(2): 40. doi: 10.3390/md14020040.
16. Rütering M., Schmid J., Rühmann B., Schilling M., Sieber V. Controlled production of polysaccharides—exploiting nutrient supply for levan and heteropolysaccharide formation in *Paenibacillus sp.* *Carbohydrate Polymers*. 2016, 148: 326–334. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.074.
17. Fella-Temzi S., Yalaoui-Guellal D., Rodriguez-Carvajal M.A., Belhadi D., Madani K., Kaci Y. Removal of lead by exopolysaccharides from *Paenibacillus peoriae* strain TS7 isolated from rhizosphere of durum wheat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018. doi: 10.1016/j.bcab.2018.09.016.
18. Wang C.-L., Huang T.-H., Liang T.-W., Fang C.-Y., Wang S.-L. Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus sp.* TKU023. *New Biotechnology*. 2011, 28(6): 559–565. doi: 10.1016/j.nbt.2011.03.003.

19. Liang T.-W., Wu C.-C., Cheng W.-T., Chen Y.-C., Wang C.-L., Wang I.-L., Wang S.-L. Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants Produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014, 172(2): 933–950. doi: 10.1007/s12010-013-0568-5.
20. Taser B., Ozkan H., Adiguzel A., Orak T., Baltaci M.O., Taskin M. Preparation of chitosan from waste shrimp shells fermented with *Paenibacillus jamilae* BAT1. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2021, 183: 1191–1199. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.06.
21. Федорова П.Ю., Гільванова Е.А., Актуганов Г.Е., Усанов Н.Г. Очищення і властивості циклодекстринглюканотрансферази з бактеріального штаму *Paenibacillus ehimensis* ВКМ В-2680D (ІВ-739). *Біотехнологія.* 2012, 4: 31-38.
22. Jinghe Du, Shan Duan, Jianyin Miao, Miaomiao Zhai, Yong Cao Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus sp.* *Union of Biochemistry and Molecular Biology.* 2020, 0: 1-11. doi: 10.1002/bab.1889.
23. Yahiaoui M., Laribi-Habchi H., Bouacem K., Asmani K.-L., Mechri S., Harir M., Jaouadi B. Purification and biochemical characterization of a new organic solvent-tolerant chitinase from *Paenibacillus timonensis* strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. *Carbohydrate Research.* 2019. doi: 10.1016/j.carres.2019.107747.
24. Kumar A., Kumar D., George N., Sharma P., Gupta N. A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus sp.* AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018, 109: 263–272. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.02.
25. Dias B.C., Lima M.E., Vollú R.E., da Mota F.F., da Silva A.J.R., de Castro A.M., Seldin L. 2,3-Butanediol production by the non-pathogenic bacterium *Paenibacillus brasilensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2018, 102(20): 8773-8782. doi: 10.1007/s00253-018-9312-y.

26. Song C.W., Rathnasingh C., Park J.M., Lee J., Hyohak S.H. Isolation and evaluation of *Bacillus* strains for industrial production of 2,3-butanediol. *J Microbiol Biotechnol.* 2018, 28: 409–417.
27. Padhan B., Poddar K., Sarkar D., Sarkar A. Production, purification, and process optimization of intracellular pigment from novel psychrotolerant *Paenibacillus sp.* BPW19. *Biotechnology Reports.* 2021, 29. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00592.
28. Okonkwo C.C., Ujor V., Ezeji T.C. Investigation of relationship between 2,3-butanediol toxicity and production during growth of *Paenibacillus polymyxa*. *New Biotechnology.* 2017, 34: 23–31. doi: 10.1016/j.nbt.2016.10.006.
29. Lei Liu, Qiu-Man Xu, Tao Chen, Jing-Sheng Cheng, Ying-Jin Yuan Artificial consortium that produces riboflavin regulates distribution of acetoin and 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* CJX518. *Eng Life Sci.* 2017, 17(9): 1039–1049. doi: 10.1002/elsc.201600239.
30. Okonkwo C.C., Ujor V., Ezeji T.C. Molecular inactivation of exopolysaccharide biosynthesis in *Paenibacillus polymyxa* DSM 365 for enhanced 2,3-butanediol production. 2018, May 27. doi: 10.1101/331843.
31. Schillinga C., Ciccone R., Sieberabcd V., Schmid J. Engineering of the 2,3-butanediol pathway of *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Metabolic Engineering.* 2020, 61: 381-388. doi: 10.1016/j.ymben.2020.07.009.
32. Okonkwo C., Ujor V., Mishra P., Ezeji T. Process Development for Enhanced 2,3-Butanediol Production by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Fermentation.* 2017, 3(2): 18. doi: 10.3390/fermentation3020018.
33. Gao J., Zhao Y., Zhang G. Production, optimization, purification, expression and characterization of a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus polymyxa*. *Electron J Biotechnol.* 2018, 36. doi: 10.1016/j.ejbt.2018.09.002.
34. En Huang, Ahmed E. Yousef Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiological Research.* 2015, 181: 15-21. doi: 10.1016/j.micres.2015.08.001.
35. Park J.-E., Kim H.-R., Park S.-Y., Choi S.-K., Park S.-H. Identification of the biosynthesis gene cluster for the novel lantibiotic paenilan from *Paenibacillus*

- polymyxa* E681 and characterization of its product. *J Appl Microbiol.* 2017, 123(5): 1133-1147. doi: 10.1111/jam.13580.
36. Vater J., Herfort S., Doellinger J., Weydmann M., Borriss R., Lasch P. Genome Mining of the Lipopeptide Biosynthesis of *Paenibacillus polymyxa* E681 in Combination with Mass Spectrometry: Discovery of the Lipoheptapeptide Paenilipoheptin. *ChemBioChem.* 2018, 19(7): 744-753. doi: 10.1002/cbic.201700615.
37. Zhiliang Yu, Zhongqi Sun, Jianhua Yin, Juanping Qiu Enhanced Production of Polymyxin E in *Paenibacillus polymyxa* by Replacement of Glucose by Starch. *Biomed Res Int.* 2018. doi: 10.1155/2018/1934309.
38. Jung H.-K., Hong J.-H., Park S.-C., Park B.-K., Nam D.-H., Kim S.-D. Production and physicochemical characterization of  $\beta$ -glucan produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2010, 12(6); 713–719. doi: 10.1007/bf02931090.
39. Rafigh S.M., Yazdi A.V., Vossoughi M., Safekordi A.A., Ardjmamand M. Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2014, 70: 463–473. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.034.
40. Mokaddem H., Azouaou N., Kaci Y., Sadaoui Z. Study of Lead Adsorption from Aqueous Solutions on Agar Beads with EPS Produced from *Paenibacillus Polymyxa*. *Chemical Engineering Transactions.* 2014, 38: 31-36. doi: 10.3303/CET1438006.
41. Zhou W.-W., Huang J.-X., Niu T.-G. Isolation of an antifungal *Paenibacillus strain* HT16 from locusts and purification of its medium-dependent antagonistic component. *Journal of Applied Microbiology.* 2010, 105(3): 912–919. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03822.x.
42. Olmedo R.S., Bustamante L.C., Curio C.H., Nara A.C. *Paenibacillus polymyxa* schc 33 bacterial strain, and use thereof to combat phytopathogenic fungi in fruits, vegetables or plants. 11.02.2016. WO2016019480A1.
43. Naing K.W., Anees M., Kim S.J., Nam Y., Kim Y.C., Kim K.Y. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne

- phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Ann Microbiol.* 2014, 64: 55–63. doi: 10.1007/s13213-013-0632-y.
44. Aktuganov G., Jokela J., Kivelä H., Khalikova E., Melentjev A., Galimzianova N., Korpela T. Isolation and identification of cyclic lipopeptides from *Paenibacillus ehimensis*, strain IB-X-b. *Journal of Chromatography B.* 2014, 973: 9–16. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.09.042.
45. Aktuganov G., Melentjev A., Galimzianova N., Khalikova E., Korpela T., Susi P. Wide-range antifungal antagonism of *Paenibacillus ehimensis* IB-X-b and its dependence on chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase production. *Canadian Journal of Microbiology.* 2008, 54(7): 577–587. doi: 10.1139/w08-043.
46. Dixit R., Agrawal L., Gupta S., Kumar M., Yadav S., Chauhan P.S., Nautiyal C.S. Southern blight disease of tomato control by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing *Paenibacillus lentimorbus* B-30488. *Plant Signal Behav.* 2016, 11(2). doi: 10.1080/15592324.2015.1113363.
47. Diana Marcela V.-V., Leonardo C., Moreno-Sarmiento Nubia C., Zulma Rocío S.-M., Ramos Freddy A. Antifungal activity of marine-derived *Paenibacillus sp.* PNM200 against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, the causal agent of tomato vascular wilt. *Biological Control.* 2020. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104.
48. Hayatun S.N., Hidayat M.Y., Murni H., Nor'Aini A.R. Optimization of Protective Agents for The Freeze-Drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a Potential Biofungicide. *Molecules.* 2020, 25(11). doi: 10.3390/molecules25112618.
49. Sato I., Yoshida S., Iwamoto Y., Aino M., Hyakumachi M., Shimizu M., Takahashi H., Ando S., Tsushima S. Suppressive Potential of *Paenibacillus* Strains Isolated from the Tomato Phyllosphere against Fusarium Crown and Root Rot of Tomato. *Microbes Environ.* 2014, 29(2): 168–177. doi: 10.1264/jsme2.ME13172.
50. Клименко Н.М. Приживаність біоагенту мікробіологічного препарату Біополіцид (*Paenibacillus polymyxa* п) у ризосфері винограду. *Землеробство, рослинництво, овочівництво та багтанництво.* 2015, 94: 29-33.
51. Weselowski B., Nathoo N., Eastman A.W., MacDonald J., Yuan Z.C. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for

- biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC Microbiol.* 2016, 16: 244.
52. Guo Y., Huang E., Yuan C., Zhang L., Yousef A.E. Isolation of a *Paenibacillus sp.* strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78: 3156–3165. doi: 10.1128/AEM.07782-11.
53. Wang Y., Shi Y., Li B., Shan C., Ibrahim M., Jabeen A. Phosphate solubilization of *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus macerans* from mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber plants. *Afr J Micro Res.* 2012, 6: 4567–4573. doi: 10.5897/AJMR12.261.
54. Токмакова Л.М., Трепач А.О., Шевченко Л.А., Ларченко І.В., Лепеха О.П., Хаїтова Н.О. Засвоєння фосфору рослинами кукурудзи за впливу фосфатмобілізувальних бактерій. *Агровісник.* 2019, 07: 14-19. doi: 10.31073/agrovisnyk201907-02.
55. Шевченко Л.А. Особливості застосування мікробного препарату Поліміксобактерину в технології вирощування кукурудзи для оптимізації продукційного процесу культури. Автореф. дис. к.с-г.н. 2019. 204 с.
56. Базаєва А.В. Біологічні основи використання фосформобілізуючого бактеріального препарату поліміксобактерину в риборицтві. Автореф. дис. канд. с.-г. наук. 2011; 19.
57. Haggblom M.M., Daane L. *Paenibacillus naphthalenovorans* that degrades naphthalene. 06.14.2015. United States Patent 6905864.
58. Yadav S., Dubey S.K. Cellulose degradation potential of *Paenibacillus lautus* strain BHU3 and its whole genome sequence. *Bioresource Technology.* 2018, 262: 124–131. doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.067.
59. Kim E.S., Kim B.-S., Kim K.-Y., Woo H.-M., Lee S.-M., Um Y. Aerobic and anaerobic cellulose utilization by *Paenibacillus sp.* CAA11 and enhancement of its cellulolytic ability by expressing a heterologous endoglucanase. *Journal of Biotechnology.* 2018, 268: 21–27. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.01.007.
60. Yanqin H.L., Zhao D.J., Benhua R.G., Yang Q.X., Yao L., Chengqiang K.L., Du W.B. Identification of a native promoter PLH-77 for gene expression in *Paenibacillus*

- polymyxa*. *Journal of Biotechnology*. 2019, 295: 19-27. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.02.002.
61. Brown D.M., Grunden A.M., Pawlak J.J. Statistical optimization of black liquor-containing media for growth and lactic acid production by *Paenibacillus glucanolyticus* SLM1. *Bioresource Technology Reports*. 2021, 13. doi: 10.1016/j.biteb.2021.100629.
62. Li O., Lu C., Liu A., Zhu L., Wang P.-M., Qian C.-D., Wu X.-C. Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*. 2013, 134: 87–93. doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.013.
63. Latham E.A., Pinchak W.E., Trachsel J., Allen H.K., Callaway T.R., Nisbet D.J., Anderson R.C. Isolation, characterization and strain selection of a *Paenibacillus* species for use as a probiotic to aid in ruminal methane mitigation, nitrate/nitrite detoxification and food safety. *Bioresource Technology*. 2018, 263: 358–364. doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.116.
64. Індекси промислової продукції в Україні у 2015-2021 роках. // Державна служба статистики України. – 2021. [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2014/pr/ipp/ipp\\_u/arch\\_ipp\\_u.htm](http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2014/pr/ipp/ipp_u/arch_ipp_u.htm)
65. Індекс промислової продукції за видами діяльності та основними промисловими групами (ОПГ) за січень-березень 2021 року. // Державна служба статистики України. – 2021. [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2018/pr/ipp\\_vd\\_m/ipp\\_vd\\_m\\_u/arh\\_ipp\\_vdm\\_u.html](http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2018/pr/ipp_vd_m/ipp_vd_m_u/arh_ipp_vdm_u.html)
66. Мировое производство эфирных масел, самые востребованные эфирные масла. // Аромат Науки. – 2018. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://aromatnauki.ru/articles/393475>
67. Практикум по фармакогнозии: Учеб. пособие для студ. вузов / В. Н. Ковалев, Н. В. Попова, В. С. Кисличенко и др.; Под общ. ред. В. Н. Ковалева. – Х.: Изд-во НФаУ; Золотые страницы, 2003.— 512 с.

68. Schilling, C., Ciccone, R., Sieber, V., & Schmid, J. Engineering of the 2,3-butanediol pathway of *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. *Metabolic Engineering*. 2020. doi:10.1016/j.ymben.2020.07.009.
69. Ji X.-J., Huang H., Ouyang P.-K. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol. Adv.* 2011, 29: 351–364.
70. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ., 2010. – 632 с.
71. Мешалка фрезерная. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://tulmesh.ru/meshalka-frezernaya/>
72. I-Series. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://solarisbiotechusa.com/fermentors-bioreactors/i-series>
73. Фильтрующая насадка, d пор 0,22 мкм, d мембраны 33 мм, целлюлоза, стерильная, Millex-GS 50 шт., Merck. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.dia-m.ru/catalog/plastic/filtruyushchie-nasadki/millipore-slgs033ss-yysyusyshybya-yybybylyuyb-millex-gs/>
74. TWEEN® 80 solution. // Sigma. [Електронний ресурс] Режим доступу: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/p6224pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p6224pis.pdf)
75. Плотна система для мікро- і ультрафільтрації УФ-201 // Біотехно. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/pilotnaya/pilotnaya-sistema-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-201/>
76. Горизонтальный простой медицинский автоклав WS-YDA. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://m.ua.sumerscience.com/medical-equipment/autoclave-steam-sterilizer/horizontal-sample-medical-autoclave-ws-yda.html>
77. Nakizimana O., Matabaro E., Lee B.H. The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnology Reports*. 2020, 25. doi: 10.1016/j.btre.2019.e00397.
78. Калунянц К.А., Голгер Л.И., Балашов В.Е. Оборудование микробиологических производств. Агропромиздат. 1987. 398 с.

79. *Проточна* центрифуга J1250. // Hanil Scientific. [Електронний ресурс] Режим доступу:  
[https://www.skygen.com/katalog/obshchelaboratornoe\\_oborudovanie/hanil\\_scientific/tsentrifugi/promyshlennye\\_tsentrifugi/protochnaya\\_trubchataya\\_tsentrifuga\\_j1250/](https://www.skygen.com/katalog/obshchelaboratornoe_oborudovanie/hanil_scientific/tsentrifugi/promyshlennye_tsentrifugi/protochnaya_trubchataya_tsentrifuga_j1250/)
80. *Промислова* проточна центрифуга СЕРА Z 101. // БіоТехно. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/protochnye-tsentrifugi/promyshlennaya-protchnaya-tsentrifuga-сера-z-101/>
81. Wheat J.A., Leslie J.D., Tomkins R.V., Mitton H.E., Scott D.S., Ledingham G.A. Production and properties of 2,3-butanediol: XXVIII. Pilot plant recovery of levo-2,3- butanediol from whole wheat mashes fermented by *Aerobacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Research*. 1948, 26F(11): 469–96. doi: 10.1139/cjr48f-047.
82. Qureshi N., Meagher M.M., Hutkins R.W. Recovery of 2,3-Butanediol by Vacuum Membrane Distillation. *Separation Science and Technology*. 1994, 29(13): 1733–1748. doi: 10.1080/01496399408002168.
83. Shao P., Kumar A. Recovery of 2,3-butanediol from water by a solvent extraction and pervaporation separation scheme. *Journal of Membrane Science*. 2009, 329(1-2): 160–168. doi: 10.1016/j.memsci.2008.12.033.
84. *Моноступінчатий* відцентровий екстрактор тип ВХР. // Rousselet Robatel. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.rousselet-robotel.ru/produkty/chemicky-farmaceuticky/bxp.html>
85. *Багатоступеневий* відцентровий екстрактор тип LХ. // Rousselet Robatel. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.rousselet-robotel.ru/produkty/chemicky-farmaceuticky/lx.html>
86. *Установки* для перегонки з ректифікаційними колонками. // Укроргсинтез. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://uoslab.com/laboratorne-obladnannia/tekhnolohichne-obladnannia/ustanovky-dlia-perehonky-z-rektyfikatsiinymy-kolonkamy>

87. *Теория* ректификации спирта и принцип работы ректификационной колонны. – 2016. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://alcofan.com/sxema-raboty-rektifikacionnoj-kolonny.html>
88. *Як* вибрати тару і упаковку для хімічних реактивів і хімічних речовин. // Система Оптимум. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.systopt.com.ua/article-yak-vybraty-taru-i-upakovku-dlya-himichnyh-reaktyviv-i-himichnyh-rechovyn>
89. *Напівавтоматична* машина для розливу рідин DF-03. // Мініпрес. [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/packing\\_equipment/liquid-filling-machine-in-barrels-and-canisters/liquid-filling-machine-in-barrels-df-03/](https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/packing_equipment/liquid-filling-machine-in-barrels-and-canisters/liquid-filling-machine-in-barrels-df-03/)
90. *Фильтры* предварительной очистки FA. // Уралкомпрессормаш. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ukm.ru/production/filtry/filtry-predvaritelnoy-ochistki-fa/>
91. *Компрессор* KB 7. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://b-compressor.ru/product/kompressor-kv-7>
92. *Рефрижераторный* осушитель сжатого воздуха ОВ-42. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://abccorp.ru/aso-dryers-refriger-ov42.html>
93. *Ресивер* РВ 110/10. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://b-compressor.ru/product/resiver-vertikalnyy-rv-11010>
94. *Теплообменник* Pahlen Hi-Flow – 75,0 кВт. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://watermart.ua/teploobmennik-pahlen-hi-flow-75-0-kvt.html>
95. *Фільтр* тонкого очищення повітря (ФТОВ, НЕРА, ХЕПА). // Технофільтр. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://tehnofilter.ub.ua/goods/view/6364274/all/filtr-tonkogo-ochishchennya-povitrya-ftov-nera-hepa/>
96. *Differential* dosing scale MSDF/MZМО. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.directindustry.com/prod/buehler-group/product-68538-1978063.html>

97. *Фильтр* тонкой очистки воздуха (ФТОВ, НЕРА, ХЕПА). // Технофільтр. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://tehnofilter.com.ua/filtry-vozdushnyye/filtr-tonkoy-ochistki-vozdukha-ftov-hepa>
98. *Емкости* из нержавеющей стали от 30 до 20000 литров. // Стройторгсервис. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://stprom.com.ua/p15745045-emkosti-nerzhaveyuschej-stali.html>
99. *LP351* – лабораторно-пилотный ферментер. // Bioengineering. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.bioengineering.su/oborudovanie/fermenteryi-promyishlennyye/lp351-%E2%80%93-laboratorno-pilotnyij-fermenter.html>
100. *P* - пилотный биореактор. // Bioengineering. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://bioengineering.su/oborudovanie/bioreaktoryi-promyishlennyye/r-pilotnyij-bioreaktor.html>
101. *Насосы* химические МРС042 (Италия) с магнитным приводом 1,8-3,6 м<sup>3</sup>/ч. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://technotep.com.ua/gorizontalnye-khimicheskie-nasosy/157-nasosy-serii-mrs-mrr-proizvoditelnostyu-18-36m3-ch.html>
102. *P* – пилотный ферментер. // Bioengineering. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.bioengineering.su/oborudovanie/fermenteryi-promyishlennyye/p-%E2%80%93-pilotnyij-fermenter.html>
103. *Емкость* из нержавеющей стали 100 литров. // Стройторгсервис. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://stprom.com.ua/p1014874151-emkost-nerzhaveyuschej-stali.html>
104. *Реактор* 20000 литров. // Стройторгсервис. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://stprom.com.ua/p1016501611-reaktor-20000-litrov.html>
105. *Моноблочный* центробежный насос Speroni CS65-160С. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://nasos-online.com/poverhnostnie-nasosi/monoblochnyj-tsentrobegnyj-nasos-speroni-cs65-160c/>
106. *Шестеренные* гидронасосы 20А(С)/XV-2P/X2P/SNP2NN/SKP2NN/ALP2/PLP20/AZPF. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://hydro->

- [gid.com.ua/shesterennye-gidronasosy-20a-c-xv-2p-x2p-snp2nn-skp2nn-ulp2-plp20-azpf](https://hydro-gid.com.ua/shesterennye-gidronasosy-20a-c-xv-2p-x2p-snp2nn-skp2nn-ulp2-plp20-azpf)
107. Шестеренные гидронасосы 30А(С)/ХV-3Р/ХЗР/SNP3NN/SKP3NN/ALP3/PLP30. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://hydro-gid.com.ua/shesterennye-gidronasosy-30a-c-xv-3p-x3p-snp3nn-skp3nn-ulp3-plp30>
108. Holt J.G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. – Ninth Edition. – B.: Williams & Wilkins.
109. Jeong H., Choi S.-K., Ryu C.-M., Park S.-H. Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. *Front Microbiol.* 2019, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00467
110. Gerber F., Krummen M., Potgeter H., Roth A., Siffrin C., & Spoendlin C. Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *Journal of Chromatography A.* 2004, 1036(2): 127–133. doi:10.1016/j.chroma.2004.02.056
111. Аммонійна проба. // Мерск. [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ammonium-Test,MDA\\_CHEM-114752#overview](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ammonium-Test,MDA_CHEM-114752#overview)