

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

«__» _____ 20__ р.

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

«__» _____ 20__ р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

освітньо-професійної програми біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна

на тему: Біосинтез бутанолу *Clostridium acetobutylicum*

Виконала: здобувачка 5 курсу, групи 1

МИТНИЦЬКА Марія Костянтинівна
(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 _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 06 ” листопада 20 23 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

МИТНИЦЬКОЇ Марії Костянтинівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез бутанолу *Clostridium acetobutylicum*
керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, доц., к. б. н.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 6 листопада 2023 року № 915-к

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Clostridium acetobutylicum*, цільовий продукт: бутанол, об'єм ферментера 10 м³, коефіцієнт заповнення 0,8

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика бутанолу. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика продуцента бутанолу. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування бутанолу. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва бутанолу. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання виробництва бутанолу. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми виробництва бутанолу. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва бутанолу. РОЗДІЛ 8. Охорона довкілля у виробництві бутилового спирту

5. Перелік графічного матеріалу

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

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 06 листопада 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика бутанолу	01.11.2023 – 9.11.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика продуцента бутанолу	10.11.2023 – 16.11.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування виробництва бутанолу	17.11.2023 – 26.11.2023	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва бутанолу	28.12.2023 – 03.01.2024	
5	Специфікація обладнання виробництва бутанолу	03.01.2024 – 10.01.2024	
6	Опис технологічної схеми виробництва бутанолу	11.01.2024 – 15.01.2024	
7	Контроль виробництва бутанолу	17.01.2024 – 21.01.2024	
8	Охорона довкілля у виробництві бутилового спирту	22.01.2024 – 23.01.2024	
9	Оформлення пояснювальної записки	23.01.2024 – 25.01.2024	
10	Виконання графічної частини кваліфікаційної роботи	25.01.2024 – 31.01.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Марія МИТНИЦЬКА _____
(ім'я та прізвище)

Оксана СКРОЦЬКА _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці ділянці виробничого біосинтезу, що стосується одержання органічного розчинника бутанолу при використанні бактеріального штаму *Clostridium acetobutylicum* MTCC 11274. Загальний обсяг пояснювальної записки складає 102 сторінки, що включає 9 рисунків, 13 таблиць, 87 найменувань літературних джерел, 4 додатки, 1 креслення формату A1 (2 аркуші – технологічна схема) та 1 креслення формату A1 (2 аркуші – апаратурна схема).

Технологічна схема біотехнологічного виробництва бутанолу включає в себе етапи допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка титрувальних агентів, підготовка запасного розчину вітамінів, приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози, приготування і стерилізація поживних середовищ), а також самого технологічного процесу, а саме: підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,8.

На етапі написання вступу було зібрано та проаналізовано широкодоступну інформацію про органічні розчинники, їх призначення та суттєві переваги застосування бутанолу у різних галузях. Після аналізу літератури щодо відомих продуцентів такого розчиннику, було обґрунтовано застосування саме *C. acetobutylicum* MTCC 11274, продуктивність якого складає 54,3 г/л. Також у ході написання проекту було розроблено та систематизовано карту контролю на кожен з етапів виробництва, продумано використання оптимальних методів щодо проведення мікробіологічного контролю та визначення показників синтезу і росту культури.

Технологічну схему біосинтезу бутанолу представлено у вигляді графічної частини проекту в 2 аркуші формату A1. Апаратурна схема також представлена у вигляді 2 аркуші формату A1.

Ключові слова: органічні розчинники, бутанол, ацетон-бутанол-етанолове бродіння, *Clostridium acetobutylicum*, біосинтез

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БУТАНОЛУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТА БУТАНОЛУ	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента.....	15
2.2. Морфолого-культуральні ознаки <i>Clostridium acetobutylicum</i> MTCC 11274.....	19
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Clostridium acetobutylicum</i> MTCC 11274.....	21
2.4. Таксономічний статус <i>Clostridium acetobutylicum</i> MTCC 11274.....	21
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ БУТАНОЛУ	23
3.1. Потреба у виробництві бутанолу.....	23
3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва бутилового спирту	25
3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектного виробництва бутанолу та об'єму виробничого ферментера.....	25
3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу	26
3.4. Схема біотрансформації глюкози у бутанол	30
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ	34
4.1. Обґрунтування вибору умов культивування <i>Clostridium acetobutylicum</i> MTCC 11274 та типу ферментера.....	34
4.2. Вибір миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва бутанолу ..	36
4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування <i>C. acetobutylicum</i> MTCC 11274.....	43
4.3.1. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	44

4.3.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 і 100 л та посівному апараті на 1,25 м ³	45
4.3.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу бутанолу у ферментері об'ємом 10 м ³	46
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ	47
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ	50
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ	68
7.1. Мікробіологічний контроль	68
7.2. Визначення концентрації біомаси	70
7.3. Визначення концентрації бутанолу	70
7.4. Визначення концентрації карбону (глюкози) і амінного (пептону) та амонійного (ацетат амонію) азоту	70
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ У ВИРОБНИЦТВІ БУТИЛОВОГО СПИРТУ	81
8.1. Можливі місця утворення різних груп відходів під час виробництва бутилового спирту.....	81
8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	82
8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	82
8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	85
8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	87
Список використаної літератури	89
ДОДАТКИ.....	99

ВСТУП

Бутанол — це органічний розчинник, який використовується в широкому діапазоні галузей промисловості. Його можна виробляти біологічним або нафтохімічним шляхом. Після нафтової кризи в 1973 році і подальшого різкого зростання цін на нафту почалися пошуки альтернативних шляхів для нафтохімічних похідних, що викликало відновлення інтересу до ацетон-бутаноло-етилової (АБЕ) ферментації [1]. Очевидно швидке виснаження запасів викопного палива у поєднанні із великими коливаннями цін на сиру нафту є хорошими аргументами для пошуку альтернатив відновлюваної енергії. Останнім часом бутанол впроваджується як альтернативне паливо, яке є водночас стійким і відновлюваним [2].

Порівняно з іншими органічними розчинниками (метанолом і етанолом), н-бутанол є більш комплексним спиртом, який має ряд істотних переваг: вищу теплотворну здатність, меншу летючість, менше проблем із самозайманням, більш високу в'язкість і безпечніше для розповсюдження. Крім того, н-бутанол можна змішувати з бензином у будь-якому співвідношенні. Зокрема, використання бутанолу як палива дозволяє зменшити викиди NO_x із подальшим утворенням сажі у вихлопних газах [3, 4].

Бутанол виробляється біологічним шляхом шляхом ферментації ацетон-бутанол-етанол (АБЕ) з використанням бактерій виду *Clostridium*. Вартість субстрату, продуктивність мікробного штаму, режим процесу бродіння та процес відновлення значно впливають на економіку виробництва бутанолу. Використання недорогої та стійкої сировини для виробництва бутанолу може мінімізувати вартість цього процесу [5].

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ		
Зм	Анк	Но	Підпис	Ла			
Розробник	Митницька				ВСТУП		
Керівник	Скороцька О.						
Н. контр.							
Консульт.							
Зав. каф.	Стабніков						
					Ліценз.	Анквіт.	Анквітів
						7	106
					Кафедра БТМ		

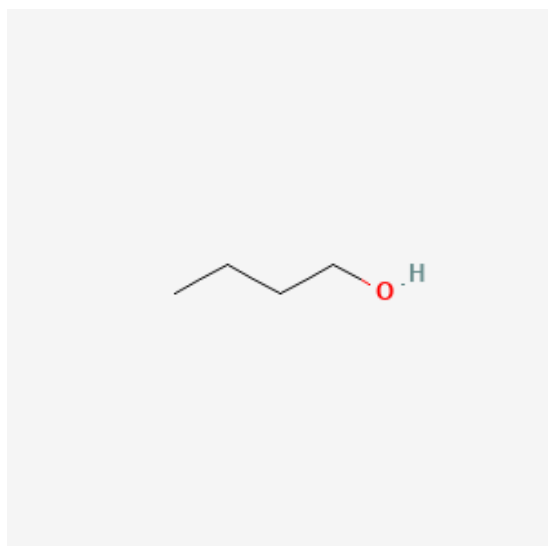
Отже, новизною даної роботи є використання бактеріального штаму *Clostridium acetobutylicum* MTCC 11274, для якого характерним є висока продуктивність бутанолу (54,3 г/л) під час росту на такому субстраті як глюкоза у ході АБЕ-бродіння.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БУТАНОЛУ

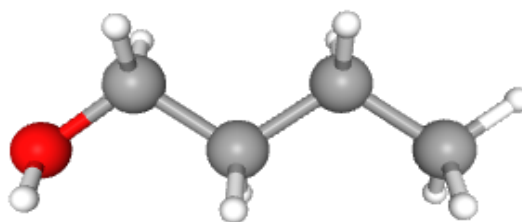
Бутанол – безбарвна легкозаймиста рідина із різким характерним слабоалкогольним запахом та сухим пекучим смаком. Синонімами також до бутанолу є 1-бутанол, бутиловий спирт, 1-гідроксибутан, н-пропілкарбінол [6, 7]. Даний спирт зазвичай використовують в органічному хімічному синтезі, виробництві пластифікаторів, миючих засобів, біопалива тощо [6, 8].

Бутиловий спирт міститься в деяких харчових продуктах і використовується як проміжний продукт у виробництві інших хімічних речовин. Дослідження на добровольцях і тваринах показали, що бутанол легко всмоктується через легені (40% у людей). Він в основному метаболізується через алкоголь- і альдегід-дегідрогеназу в печінці до масляної кислоти, а потім розкладається до коротших кислот і кетонів і, нарешті, до вуглекислого газу [9].

Фізико-хімічні властивості. Брутто-формула спирту – $C_4H_{10}O$ ($CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-OH$), молекулярна маса становить 74,12 г/моль. Густина бутанолу складає 0,8098 г/см³ при 20 °С, що є на небагато нижчою, ніж у води. Однак пари бутанолу за густиною важчі за воду (2,6 г/см³) [6].



а)



б)

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ		
Зм	Арк	№	Підпис	Ла	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА		
Розробник	Митницька						
Керівник	Скрипська О.						
Н. контр.							
Консульт.							
Зав. каф.	Стабнікова				Кафедра БТМ		
						Лімен	Анkvиш
							а
							102

Рис. 1.1. Структурна формула бутанолу: а) 2-D зображення; б) 3-D зображення [6]

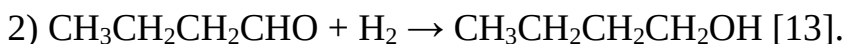
Бутанол в основному існує у чотирьох ізомерних структурах, а саме *н*-бутанолу (*н*-C₄H₉OH), *втор*-бутанолу (*втор*-C₄H₉OH), *ізо*-бутанол (*ізо*-C₄H₉OH) і *трет*-бутанол (*трет*-C₄H₉OH) [6].

Температура кипіння бутанолу при 760 мм рт. ст. становить 243 °F (117,7 °C), температура плавлення сягає -129 °F (89,8 °C), а займання – 84 °F (37 °C) [7]. Такі показники як теплота згоряння, теплота пароутворення і поверхневий натяг складають 36,111 кДж/г, 52,35 кДж/моль (при 25 °C) і 24,93 дин/см (при 25 °C) відповідно [10].

Щодо розчинності бутанолу, то такий спирт добре розчинний у воді при 20 °C, Дуже добре розчиняється в ацетоні; змішується з етанолом, етиловим ефіром та багатьма іншими органічними розчинниками (> 10% в бензолі) [6, 10]. За дії високої температури (нагрівання) бутанол розкладається із виділенням їдкого диму і пари [6].

Шляхи синтезу бутанолу. Виробництво *н*-бутанолу може бути здійснено двома методами: нафтохімічним або біологічним. Порівняно із мікробним синтезом нафтохімічний метод має велику перевагу, оскільки проводиться лише за одну стадію. За такого методу бутанол може бути отриманий з етанолу, в присутності каталізаторів, шляхом трьох послідовних реакцій, а саме: дегідрування, альдольна конденсація та гідрування [11, 12].

Поширеним хімічним шляхом є оксо-процес, який включає реакцію пропілену з чадним газом і воднем за наявності відповідного каталізатора. Отриману суміш *н*- та ізобутиральдегіду гідрують до відповідних *н*- і ізобутилових спиртів і далі переганяють для відновлення бутанолу необхідної якості:



Також в якості сировини, одержаної з викопної нафти, яка використовується у виробництві бутанол може використовуватися етилен, пропілен і триетил-алюміній або монооксид вуглецю і водень [14].

За допомогою біологічного методу бутанол (або біобутанол) синтезується переважно бактеріями родини *Clostridiaceae* шляхом процесу ацетон-бутанол-етанолового бродіння (АБЕ), у результаті якого утворюються такі сполуки у пропорції 3:6:1 відповідно [15]. Економічність виробництва біобутанолу значною мірою залежить від вартості субстрату для АБЕ-бродіння. Аби біобутанол знаходив своє активне використання як альтернативне паливо, сировина для біосинтезу має бути широкодоступною та за низькою ціною [13].

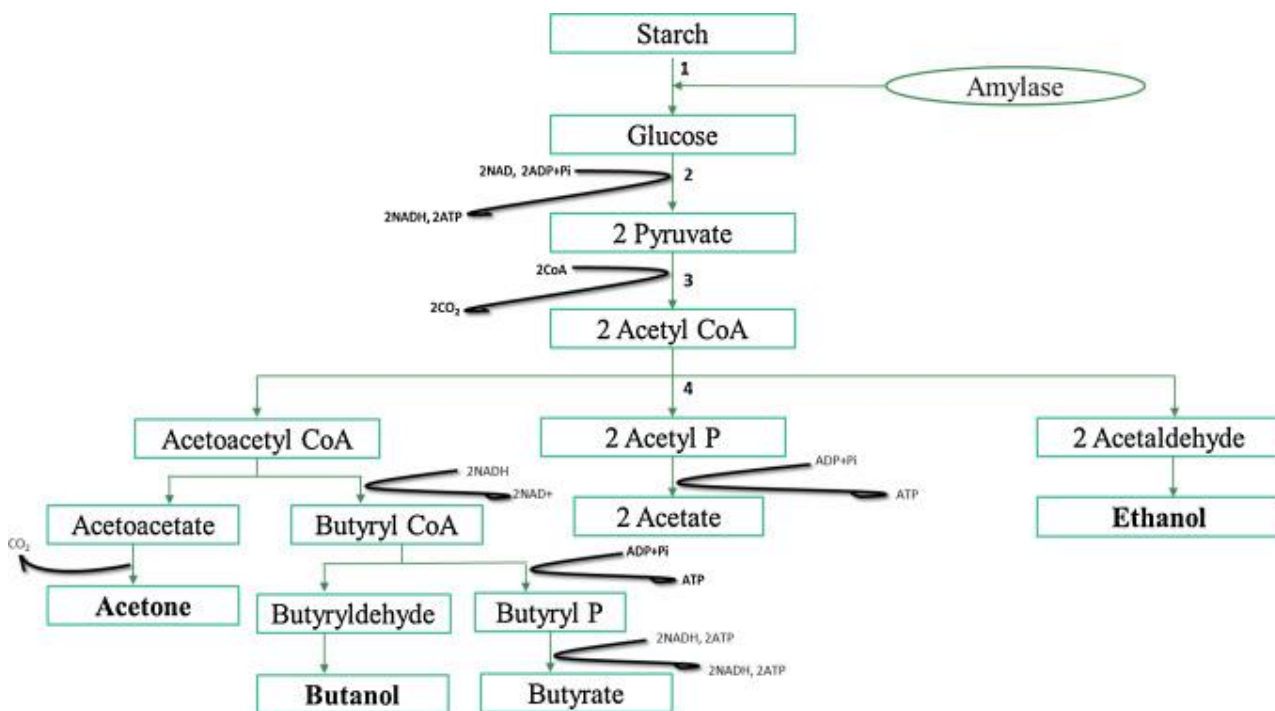


Рис. 1.2. Схема біологічного синтезу бутанолу [11]

Дія на організм людини. Працівники на виробництві бутанолу скаржилися на подразнення очей, неприємний запах, легкий головний біль і запаморочення, легке подразнення носа і горла, а також дерматит пальців і рук, за концентрації н-бутилового спирту в повітрі 50 частин на мільйон. Короткочасне вдихання н-бутанолу також викликає різноманітні ефекти з

боку центральної нервової системи (ЦНС), включаючи запаморочення, атаксію, сплутаність свідомості, марення та можливу кому [16].

За дії високої концентрації в повітрі бутиловий спирт може спричинити транзиторний легкий набряк кон'юнктиви ока та зменшення кількості еритроцитів. Дослідження інгалаційної токсичності у людей демонструють сенсорне подразнення верхніх дихальних шляхів, але лише при вмісту бутанолу вище 3000 мг/куб. Проковтування такого спирту може призвести до блювоти, болю в животі, головного болю, сонливості та втрати свідомості [17, 18].

Декілька організацій розробили стандартні або безпечні значення щодо впливу н-бутанолу та н-бутилацетату. У 1991 році ЕРА опублікувала протокол для п-бутанолу, в якому встановлено референсну дозу (максимально прийнятну добову дозу для перорального прийому, якщо вона піддається впливу протягом життя), а саме 1×10^{-1} мг/кг/день [12].

Токсичність. Відповідно до рейтингу про здоров'я NFPA бутанол відносять до класу 2, тобто матеріалів, що в надзвичайних ситуаціях можуть призвести до тимчасової втрати працездатності або залишкових ушкоджень; за рейтингом вогнестійкості – до класу 3 – рідин та твердих речовин, які можуть спалахнути майже за будь-якого температурного режиму навколишнього середовища; а за рівнем нестабільності – група 0, а саме матеріалів, які зазвичай стабільні навіть за пожежних умов [8, 16].

Бутанол є легкозаймистою рідиною, легко загоряється від тепла, іскор або полум'я. Пари можуть утворювати вибухонебезпечні суміші з повітрям. Пари бутилового спирту можуть потрапити до джерела займання та спалахнути, оскільки поширюються по землі та збираються в низинних або обмежених місцях (каналізація, підвали, резервуари тощо). Стікання в каналізацію може створити небезпеку пожежі або вибуху. Контейнери, що містять бутанол можуть вибухнути при нагріванні [8].

Сфери застосування. Бутанол використовується в основному як промисловий проміжний продукт у виробництві ефірів і бутилового ефіру

ацетатів, фармацевтичних препаратів, полімерів і пластмас [19]. Спирт відомий своїм застосуванням як екстрагент у фармацевтиці для виготовлення лікарських препаратів, а також як натуральний субстрат у виробництві антибіотиків, гормонів та вітамінів тощо. Зокрема, 1-бутанол використовують як елюент у тонкошаровій та паперовій хроматографії [20].

Бутиловий спирт застосовують меншою мірою як розчинник, реагент/розріджувач і компонент у споживчих (рецептури лаку для нігтів, гумовий цемент і безпечне скло) і промислових продуктах [19]. Бутанол також знаходить своє використання в низьких концентраціях у косметичних засобах для макіяжу очей, засобів особистої гігієни та гоління [6].

Завдяки своїм істотним перевагам бутиловий спирт використовують також на ринку автомобільного палива. Бутанол сумісний із бензиновими двигунами машин та паливними трубопроводами. Бутиловий спирт як оксигенат можна додавати до бензину в концентраціях до 11,5% по загальному обсягу [4].

Бутанол безпечніший у використанні, ніж бензин, оскільки він його горючість є меншою (нижчий тиск пари та вища температура спалаху) і змішується з бензином у будь-якому співвідношенні. Також, даний спирт негігроскопічний, не викликає корозії та демонструє загальний низький рівень токсичності [4, 21]. Однак, якщо розглядати бутанол в якості палива, також важливо оцінити його небезпечні характеристики, оскільки даний спирт сприяє утворенню фотохімічного смогу, коли він реагує з іншими летючими органічними сполуками в атмосфері [13].

Бутанол використовується у виробництві дибутилфталату і бутилбензилфталату, які є двома з ряду пластифікаторів на основі ефіру фталату, що, в свою чергу, використовуються в основному в композиціях полівінілхлориду та полівінілацетату. Трибутилцитрат і дибутилсебацінат мають ринкові ніші як нетоксичні пластифікатори для використання в харчовій упаковці та в медичній, фармацевтичній і косметичній промисловостях [21].

Окрім комерційного виробництва, н-бутанол зустрічається в природі та є летким компонентом яблучної, грушевої та виноградної есенції, деяких сирів, смаженого фундуку, смаженого бекону, олії м'яти перцевої, чаю та жіночого грудного молока [12].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТА БУТАНОЛУ

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

Бутанол є одним із важливих розчинників, які використовуються для виробництва клеїв, косметики, лаків, фарб, пластмас, фармацевтичних препаратів і полімерів на комбінованих хімічних ринках вартістю понад 6 мільярдів доларів США [22]. Близько століття тому такий розчинник вперше був комерційно синтезований бактерією *Clostridium acetobutylicum* за використання в якості субстрату крохмалю. Однак після 1950-х років біологічне виробництво бутанолу було витіснене хімічним синтезом на основі нафти [23].

У наш час біовиробництво бутанолу відновлює інтерес через необхідність одержання палива та хімікатів із відновлюваних ресурсів. Таким чином, були докладені інтенсивні зусилля для покращення бродіння у різних аспектах, зокрема у використанні дешевшої сировини [23, 24]. Мікробний синтез бутанолу – екологічно чистого біопалива, можна втілити у виробництві шляхом традиційного ацетон-бутанол-етанолового (АБЕ) процесу бродіння бактеріями роду *Clostridium*, а саме *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* і *C. saccharoperbutylacetonicum* тощо [25].

Провівши аналіз доступної наукової літератури, для порівняння обрали бактеріальні штами із найвищою синтезувальною здатністю бутанолу (див. табл. 2.1), а саме *Clostridium acetobutylicum* МТСС 11274 (54,3 г/л), *C. beijerinckii* IB4 (15,7 г/л), *C. acetobutylicum* GS4-3 (20,1 г/л) та *C. acetobutylicum* УМ1 (17,0 г/л) [26, 27, 28, 29]. Зазначимо, що склад поживних середовищ для культивування попередньо зазначених мікроорганізмів суттєво відрізняється. Тому на наступному етапі відбору біологічного агенту слід правильно розрахувати вартість поживних середовищ для їх активного росту.

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ			
Зм	Анк	Но	Підпис	Ла				
Розробни	Митницька				РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТА БУТАНОЛУ	Лімен	Анквил	Анквилів
Керівник	Скорошківа О						15	107
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.	Стабніков							

Таблиця 2.1

Особливості біосинтезу бутанолу різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація бутанолу, г/л	Особливості біосинтезу	Література
	Компонент	вміст, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Clostridium acetobutylicum</i> MTCC 11274	Глюкоза пептон CaCO ₃ K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O MnSO ₄ · H ₂ O FeSO ₄ · 7H ₂ O NaCl ПАБК біотин ацетат амонію	82,04 49,66 5,0 0,5 0,5 0,46 0,023 0,023 0,023 0,01 0,01 2,2	120	54,3	Культивування у ферментері об'ємом 3 л (t° = 37°C; n = 300 об/хв, рН = 6,1, із подачею азоту)	[26]
<i>Clostridium beijerinckii</i> IB4	Глюкоза кукурудзяний екстракт K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ CH ₃ COONH ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O MnSO ₄ · H ₂ O FeSO ₄ · 7H ₂ O NaCl	60 1 0,5 0,5 2,2 0,2 0,01 0,01 0,01	36	15,7	Культивування у ферментері об'ємом 5 л (t° = 35°C; n = 120 об/хв, рН = 5,5, із продуванням азоту)	[27]

Продовження табл. 2.1

<i>Clostridium acetobutylicum</i> GS4-3 генно-інженерний	Крохмальна маніока ацетат амонію MgSO ₄ K ₂ HPO ₄ FeSO ₄	110 3 0,2 0,5 0,01	68	20,1	Культивування у ферментері об'ємом 10 л (t° = 39°C; pH = 7,0; безперервне продування азотом)	[28]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> YM1	Глюкоза триптон дріжджовий екстракт ацетат амонію масляна кислота FeSO ₄ · 7H ₂ O MgSO ₄	50 1,2 0,45 0,55 8,7 0,001 0,3	120	12,16	Культивування у ферментері об'ємом 5 л (t° = 30°C; pH = 6,5; із подачею азоту)	[29]

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів бутанолу

Продуцент	Складова поживного середовища	Вміст у складі ПС, г/л	Ціна складової, грн/кг	Вартість складової (грн) на 1 л ПС	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
Clostridium acetobutylicum MTCC 11274	Глюкоза	82,04	51	4,18	1
	пептон	49,66	1060	52,64	2
	CaCO ₃	5,0	164	0,82	3
	K ₂ HPO ₄	0,5	47,33	0,024	
	KH ₂ PO ₄	0,5	97	0,0485	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,46	19	0,0087	
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,023	57,6	0,0013	4
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,023	107	0,0025	5
	NaCl	0,023	20	0,00046	3
	ПАБК	0,01	6620	0,066	4
	біотин	0,01	49000	0,49	
	ацетат амонію	2,2	150	0,33	
	Вартість 1 л середовища – 58,611 грн				
	Clostridium acetobutylicum GS4-3	Крохмальна маніока	110	574	63,14
ацетат амонію		3	150	0,45	
MgSO ₄		0,2	23	0,0046	
K ₂ HPO ₄		0,5	47,33	0,024	3
FeSO ₄		0,01	39	0,00039	1
Вартість 1 л середовища – 64,068 грн					
Clostridium acetobutylicum YM1	Глюкоза	50	51	2,55	1
	триптон	1,2	17095	20,5	
	дріжджовий екстракт	0,45	1100	0,495	4
	ацетат амонію	0,55	150	0,0825	
	масляна кислота	8,7	700	6,09	3
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001	107	0,0001	5
	MgSO ₄	0,3	23	0,0069	4
	Вартість 1 л середовища – 29,724 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2023 р. 1 – <https://www.chemsale.com.ua/>, 2 – <https://ukrbce.ua/uk/>, 3 – <https://flagma.ua/>, 4 – <https://prom.ua/ua/>, 5 – <http://www.arowana-im.com.ua/>

Зважаючи на дані, зазначені у табл. 2.2, поживне середовище для вирощування *C. acetobutylicum* YM1 є дешевшим, ніж для *C. acetobutylicum* MTCC 11274 і *C. acetobutylicum* GS4-3, майже у 2 і 3 рази відповідно. Однак потрібно звернути увагу на тривалість культивування обраних продуцентів,

оскільки для вирощування *C. acetobutylicum* GS4-3 необхідно найменше часу – 68 год [27].

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г бутанолу, синтезованого при рості на середовищах різного складу

Продуцент	Концентрація бутанолу, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість одержаного бутанолу за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г бутанолу, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Clostridium acetobutylicum</i> MTCC 11274	54,3	120	0,453	58,611	1,079
<i>Clostridium acetobutylicum</i> GS4-3	20,1	68	0,295	64,068	3,187
<i>Clostridium acetobutylicum</i> YM1	12,16	120	0,101	29,724	2,44

На останньому етапі вибору найефективнішого бактеріального штаму-продуценту бутанолу розраховуємо умовну вартість 1 г одержуваного розчинника (див. табл. 2.3). За отриманими даними можна зробити висновок, що найвища кількість одержаного бутанолу за годину характерна для штаму MTCC 11274 (0,453 г/год). Також умовна вартість 1 г бутанолу, синтезованого даним штамом є найнижчою (1,079 грн/г). Тому, підсумовуючи усе вище написане, для біосинтезу бутанолу як біологічний агент обираємо *Clostridium acetobutylicum* MTCC 11274.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки *Clostridium acetobutylicum* MTCC 11274

C. acetobutylicum – рухливі прямі палички розміром $0,5 - 0,9 \times 1,5 - 6$ мкм із перитрихіальним розташуванням джгутиків. Під час активного росту клітини є грампозитивними, а у період старіння – грамнегативні [30]. Загальновідомим є те, що *C. acetobutylicum* ініціює експресію генів, що утворюють спори, під час переходу культури у стаціонарну фазу росту [31]. Ендоспори *Clostridium* овальні, субтермінальні і злегка здувають клітину.

Для оптимального росту бактерії в якості факторів росту використовують біотин та 4-амінобензоат [30].

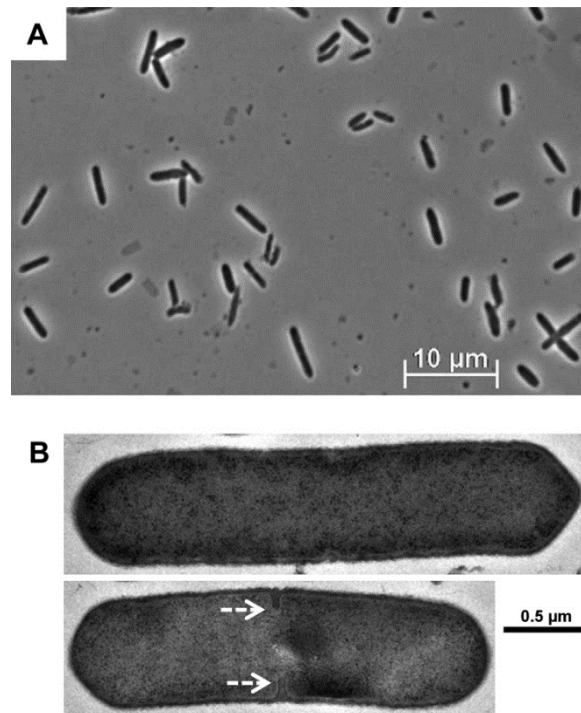


Рис. 2.1. Зображення фазово-контрастної мікроскопії після 72 год росту *C. acetobutylicum* [32]

Clostridium при рості на агарі Т6 утворює колонії діаметром 1–10 мм круглої форми із шорсткими гранульованими краями, злегка підняті, сірувато-білі, від напівпрозорих до непрозорих і гладких. Як і для всіх бактерій роду *Clostridium* характерним є утворення зони гемолізу на чашках із кров'яним агаром [33].

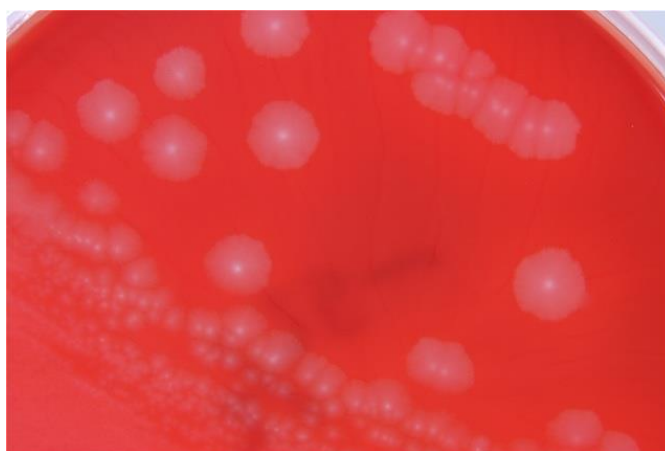


Рис. 2.2. Колонії *C. acetobutylicum* на чашці з EG-агаром після 48-годинної інкубації при 37°C в анаеробних умовах [34]

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки *Clostridium acetobutylicum* MTCC 11274

Бактеріальний штам є мезофілом, оскільки культура *C. acetobutylicum* росте за оптимальної температури, що сягає 37 °С. Вільний кисень для такої бактерії є токсичним, а отже, ріст спостерігається лише в анаеробних умовах [35]. По відношенню до рН, бактерія росте у межах 5,8 – 6,1 [36]. Крім того, *C. acetobutylicum* характеризується двофазним ферментативним метаболізмом.

Під час експоненційної фази росту, вегетативні клітини *C. acetobutylicum*, являють собою прямі палички і перетворюють вуглеводний субстрат в оцтову і масляну кислоти (ацидогенез). Наприкінці такої фази клітини диференціюються, набухають помітно, і утворюють сигароподібні клітини (кlostридіальна стадія). У цей час клітини накопичують полісахаридну гранулозу, глікогеноподібний полімер, що складається з α -D-глюкози, який, як очікується, функціонуватиме як запас енергії для наступних циклів формування спор. При цьому метаболізм клітин перемикається на виробництво розчинника (сольвентогенез). Сольвентогенні кlostридії перетворюють вироблені кислоти (ацетат і бутират) в нейтральні розчинники (ацетон і бутанол відповідно). Виробництво розчинників супроводжується ініціацією спороношення [30].

У процесі бродіння бактерія, окрім глюкози, здатна до утилізації D-маніту, але не гідролізує сечовину та аргінін. Не характерним для *C. acetobutylicum* є використання триптофану в якості джерела енергії, а також деградації селітри, рафінози та L-глутамату [35]. Як і інші бактерії роду *Clostridium*, штам не здатен до дисиміляційного відновлення сульфату [30].

2.4. Таксономічний статус *Clostridium acetobutylicum* MTCC 11274

Рід *Clostridium* є надзвичайно різноманітним, що складається з анаеробних ендоспороутворюючих грампозитивних бактерій, який включає кілька сумнозвісних патогенів людини, а також непатогенні види, корисні для промислової біотехнології [37]. *C. acetobutylicum*, який вперше був виділений із кукурудзи в 1912 році Хаїмом Вейцманом, є нешкідливим для людей, тварин і

рослин і виробляє широкий спектр практично цінних метаболітів [38]. Сучасна класифікація для *C. acetobutylicum* MTCC 11274 наведена нижче згідно з [39]:

Царство: *Bacteria*

Тип: *Firmicutes*

Клас: *Clostridia*

Ряд: *Eubacteriales*

Родина: *Clostridiaceae*

Рід: *Clostridium*

Вид: *acetobutylicum*

Штам: MTCC 11274

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ БУТАНОЛУ

3.1. Потреба у виробництві бутанолу

Бутанол (бутиловий спирт) — це чотириуглецевий спирт, який знаходить своє широке використання у достатньо великій кількості галузей завдяки ряду своїх істотних переваг. Не зважаючи на те, що н-бутанол протягом тривалого часу вироблявся з цукрів і крохмалю у ході промислової ферментації ацетоно-бутило-етанольного (АБЕ) бродіння, в даний час бутанол майже виключно виробляється за допомогою нафтохімічних шляхів і використовується в основному у промислових розчинниках і у виробництві акрилатних ефірів, аміосмол і бутиламінів, з світовим ринком ~ 1,5 мільярда галонів (4,5 мільйона метричних тонн) [40, 41].

За рахунок своєї здатності до розчинення в усіх органічних розчинниках, н-бутанол використовують в косметичній та лабораторній промисловостях, зокрема як:

- зволожувач для нітрату целюлози;
- використовується в косметичній промисловості, а також у таких продуктах, як шампунь, засоби для гоління та мило;
- як хімічний проміжний продукт для створення інших життєво важливих сполук, таких як гліколевий ефір, акрилатні ефіри, амінокислоти та ацетати [42].

Бутанол є перспективною альтернативою біопаливу, що базується на кількох перевагах порівняно з більш відомими біопаливними етанолом і метанолом: більша довжина вуглецевого ланцюга і, отже, вища теплотворна здатність, а також нижча летючість, полярність, корозійна активність і теплота випаровування, що призводить до менших проблем із займанням. Крім того, дизельні двигуни можуть працювати на чистому бутанолі або дизельних сумішах без будь-яких модифікацій і видимих пошкоджень [43].

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ			
Зм	Анк	Но	Підпис	Ла				
Розробник		Митницька			РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ БУТАНОЛУ	Лімен	Анквн	Анквнв
Керівник		Скорошья О.					25	102
Н. контп						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф.		Стабніков						

Біобутанол є життєздатною заміною викопного палива, технологія виробництва, накопичення та транспортування якого з часом розвивається. Дослідження показують, що бутанол сам по собі або його суміш зі звичайним паливом має потенціал для істотного зменшення викидів двигуна та споживання палива [44].

Н-бутанол також використовується як розчинник фарб, покриттів, лаків, жирів, масел, воску, гуми, пластифікаторів. Бутиловий спирт знаходить використання як розчинник при створенні споживчих продуктів, їх чищенні, а також поліруванні [42, 45]. Одним з таких застосувань є його використання у виробництві пластифікаторів на основі ефіру фталату та інших схожих сполук. Вироблені з використанням бутанолу пластифікатори знаходять застосування в різних виробничих секторах.

Наприклад, дибутилфталат (ДБФ) і бутилбензилфталат (ББФ) є популярними пластифікаторами на основі фталату, і вони використовуються у виробництві пластмас, зокрема полівінілхлориду (ПВХ) і полівінілацетату (ПВА). Пластифікатори додаються до полімерів для поліпшення їхньої гнучкості, еластичності і інших властивостей. Бутанол може бути використаний у виробництві цих пластифікаторів як початкова сировина. Вони знаходять застосування в галузях, де необхідно забезпечити безпечність контакту зі споживачем або де потрібні нетоксичні властивості, такі як упаковка харчових продуктів, медичні вироби, фармацевтика та косметика [21].

Така хімічна речовина присутня в кількох продуктах харчування та напоях як штучний ароматизатор. Його також використовують у приготуванні їжі, наприклад, під час виробництва екстракту хмелю для пива [45].

Бутанол знаходить своє застосування і як компонент різних лікарських засобів, зокрема Амоксициліну тригідрат, Декстроамфетаміну сульфат пролонгованого вивільнення, Дівалпроекс натрію з уповільненим вивільненням, Доксидикліну Гіклат, Дулоксетину гідрохлорид із затримкою

вивільнення, Габапентин, Індометацин, Кеторолак Трометамін, Нітрофурантоїн (моногідрат/макроткристали), Омепразол з уповільненим вивільненням, Пантопразол натрію з уповільненим вивільненням, Тамсулозину гідрохлорид, Темазепам [46].

Отже, враховуючи достатньо велику кількість сфер застосування бутанолу та величезну потребу у даному цільовому продукті, розрахунки потужності виробництва будуть здійснюватися відповідно до загальної потреби у бутиловому спирті, який вже в подальшому буде використовуватись в окремих галузях промисловості.

3.2. Обрахунок загальної потужності виробництва бутилового спирту

Відповідно до даних, зазначених Держстатом України (<https://www.ukrstat.gov.ua/>), у 2021 р. у нашій країні було вироблено 8615,5 т спирту бутилового, що і є загальною потребою у даному цільовому продукті. Для забезпечення бутанолом доцільно буде обрати 0,1 % від загальної потреби, оскільки на ринку України існує досить висока конкуренція:

$$8\,615\,500 \text{ кг} \times 0,1 \% = 8615,5 \text{ кг (бутилового спирту в рік)}$$

Після проведеного розрахунку щодо потреби бутилового спирту, слід розглянути, яку кількість культуральної рідини можна одержати у результаті культивування *Clostridium acetobutylicum* МТСС 11274, який здатен синтезувати 54,3 г/л спирту протягом 120 год [26]. Отже, об'єм культуральної рідини становитиме:

$$\frac{8615,5 \times 1000}{54,3} = 158\,660 \text{ л}$$

Також на наступному етапі розраховуємо загальні втрати під час етапів виділення бутанолу із культуральної рідини які складають 10 %:

$$158\,660 \text{ л} / (1 - 0,1) = 176\,290 \text{ л}$$

3.3. Розрахунок загальної кількості циклів проектного виробництва бутанолу та об'єму виробничого ферментера

Надалі необхідно прорахувати, який об'єм культуральної рідини можна отримати за цикл біосинтезу. Відповідно до цих даних зможемо далі

розрахувати кількість необхідних етапів підготовки посівного матеріалу. Тому приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 130, тоді кількість культуральної рідини на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = C / T_{рд} = 176\,290 / 130 = 1356 \text{ л}$$

Об'єм культуральної рідини за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 1356 * 128}{24} = 7955,2 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – загальний цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (128 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,1 - 1,5$.

Розрахований об'єм культуральної рідини (7955,2 л) можна одержати у ферментері, геометричний об'єм якого складатиме:

$$V_r = \frac{V_{пц}}{K_{зап}} = \frac{7955,2}{0,8} = 9944 \text{ л}$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер на 10 м³ ($V_{ф}$).

Уточнюємо коефіцієнт заповнення для обраного ферментера:

$K_{зап} = V_r / V_{ф} = 7955,2 / 10\,000 = 0,8$. Розраховане число не перевищує заданого значення, а отже, об'єм ферментера підібраний правильно.

3.4. Розрахунок кількості необхідних етапів для підготовки посівного матеріалу

Отже, за виробничий цикл можна одержати $V_{пц} = 7955,2$ л культуральної рідини. Також слід врахувати, що при одержанні культуральної рідини, можливими є її втрати у результаті краплєвиносу через колектор відпрацьованого повітря ($E_{ф}$), які складають 10%.

Отже, розрахуємо кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед процесом ферментації:

$$V_{роб1} = V_{пц} / (1 - E_{ф}) = 7955,2 / (1 - 0,1) = 8840 \text{ л}$$

Встановлена доза для посівного матеріалу складає від 5 до 10 % від об'єму поживного середовища. Приймаємо такий показник $X_{пм1} = 10\%$. Тому,

із врахуванням дози посівного матеріалу $X_{\text{пм1}}$ робочий об'єм ферментера $V_{\text{роб1}}$ складе:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{пс1}} + V_{\text{пс1}} \cdot X_{\text{пм1}}$$

Звідси, об'єм поживного середовища $V_{\text{пс1}}$ буде:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{пм1}}) = 8\,840 / (1 + 0,1) = 8\,036 \text{ л},$$

тоді об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм1}}$ складе

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{пс1}} = 8\,840 - 8\,036 = 804 \text{ л}$$

Враховуючи втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря в розмірі 10 – 15%, об'єм посівного матеріалу та поживного середовища у посівному апараті буде таким:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{па}}) = 804 / (1 - 0,1) = 893,3 \text{ л}.$$

Оскільки попередньо було обрано дозу посівного матеріалу у розмірі 10%, то у посівному апараті об'єм поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{па}}) = 893,3 / (1 + 0,1) = 812,1 \text{ л},$$

де $X_{\text{па}} = 0,1$ – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Далі слід розрахувати об'єм посівного матеріалу для посівного апарату, який становить $V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 893,3 - 812,1 = 81,2 \text{ л}$.

Інокулят об'ємом $V_{\text{роб.2}} = 893,3 \text{ л}$ можна отримати протягом вирощування клостридіального штаму МТСС 11274 у посівному апараті з геометричним об'ємом $V_{\text{ін2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 893,3 / 0,8 = 1116,7 \text{ л}$. Для цього обираємо найближчий за розміром стандартний посівний апарат $V_{\text{спа}} = 1,25 \text{ м}^3$. Перерахований коефіцієнт заповнення складатиме:

$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сін}} = 893,3 / 1250 = 0,71$. Отриманий результат входить у діапазон 0,7-0,8 для ферментерів без аерації.

Посівний матеріал об'ємом 58,6 л можна отримати шляхом вирощування бактерій в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

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

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 81,2 / (1 - 0,1) = 90,2 \text{ л}.$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування бактерій в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 90,2 / (1 + 0,1) = 82 \text{ л},$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора становить $V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 90,2 - 82 = 8,2 \text{ л}$.

Відповідну кількість посівного матеріалу $V_{\text{роб.3}} = 90,21 \text{ л}$ можна отримати під час культивування бактеріального штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін3}} = V_{\text{роб.3}} / K_{\text{зап}} = 90,2 / 0,8 = 112,75 \text{ л}$. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 100 \text{ л}$ та уточнюємо попередньо встановлений коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 90,2 / 100 = 0,9$. Одержане значення перебуває у межах, прийнятих для ферментерів без аерації.

Розрахований об'єм інокуляту (8,2 л) можна отримати шляхом вирощування бактерій в інокуляторі із врахуванням подальших втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10 – 15%).

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

$$V_{\text{роб.4}} = V_{\text{пм3}} / (1 - E_{\text{ін}}) = 8,2 / (1 - 0,1) = 9,1 \text{ л}.$$

Додавання посівного матеріалу у кількості 10% від об'єму поживного середовища є стандартною практикою для забезпечення належного засіву. Тоді об'єм поживного середовища, для вирощування бактерій в інокуляторі буде складати:

$$V_{\text{пс4}} = V_{\text{роб.4}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 9,1 / (1 + 0,1) = 8,3 \text{ л},$$

де $X_{\text{ін}} = 0,1$ – встановлена доза інокуляту для посівного апарату.

Об'єм посівного матеріалу для інокулятора тоді складає $V_{\text{пм4}} = V_{\text{роб.4}} - V_{\text{пс4}} = 9,1 - 8,3 = 0,8 \text{ л}$.

Такий об'єм посівного матеріалу $V_{\text{роб.4}} = 8,3$ л можна отримати під час культивування бактеріального штаму в інокуляторі з геометричним об'ємом $V_{\text{ін4}} = V_{\text{роб.4}} / K_{\text{зап}} = 8,3 / 0,8 = 10,4$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор $V_{\text{сін}} = 10$ л та уточнюємо попередньо обраний коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{зап4}} = V_{\text{роб.4}} / V_{\text{сін}} = 8,3 / 10 = 0,83$. Отримане число перебуває у межах, прийнятих для ферментерів без аерації.

Посівний матеріал об'ємом $V_{\text{пм4}} = 0,8$ л можна одержати культивуванням бактерій МТСС 11274 у колбах на качалці. Для цього застосовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зк}}) = 800 / (750 \cdot 0,2) = 5,3, \text{ отже, } 6 \text{ колб.}$$

Отже, для одержання посівного матеріалу необхідно 6 качалочних колб.

Можна зробити висновок, що процес одержання посівного матеріалу для проведення виробничого біосинтезу бутилового спирту у ферментері об'ємом 10 м^3 за коефіцієнту заповнення 0,8 буде проходити у 4 етапи. Узагальнена інформація щодо кількості стадій виробництва бутанолу наведена у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Кількість стадій та апаратів, необхідна підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу бутанолу

№ стадії	Геометричний об'єм обраного апарату, $V_{\text{г}}$, л	Коефіцієнт заповнення, $K_{\text{зап}}$, частка	Робочий об'єм апарата, $V_{\text{роб}}$, л	Об'єм поживного середовища, $V_{\text{пс}}$, л	Об'єм посівного матеріалу, $V_{\text{пм}}$, л
1	2	3	4	5	6
1	10000	0,8	8840	8036	804
2	1250	0,71	893,3	812,1	81,2
3	100	0,9	90,2	82	8,2
4	10	0,83	9,1	8,3	0,8
5	0,75×4 колби	0,2	—	0,8	0,09

Отже, за результатами наведених розрахунків, можна зробити висновок, що для біосинтезу бутанолу *C. acetobutylicum* MTCC 11274 потрібно встановити один ферментер об'ємом 10 м³, один посівний апарат об'ємом 1,25 м³ та два інокулятори об'ємом 100 і 10 л відповідно.

3.4. Схема біотрансформації глюкози у бутанол

В якості ростового субстрату для біосинтезу бутанолу за використання *C. acetobutylicum* MTCC 11274 виступає глюкоза [26]. Глюкоза на перших етапах розкладається за шляхом гліколізу.

Відповідно до Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) катаболізм глюкози у *C. acetobutylicum* [47] відбувається шляхом її перетворення за допомогою глюкокінази (КФ 2.7.1.2) у α -D-глюкозо-6-фосфат, яка далі перетворюється із залученням глюкозо-6-фосфат-ізомераз (КФ 5.3.1.9) на β -D-фруктозо-6-фосфат. Така сполука далі піддається дії 6-фосфоглюкокінази (КФ 2.7.1.11) з утворенням β -D-фруктозо-1,6-дифосфату. З одержаної таким чином сполуки утворюються діоксиацетонфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат (фермент – фруктозо-дифосфат альдолаза (КФ 4.1.2.13)). На наступному етапі гліцеральдегід-3-фосфат під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (КФ 1.2.1.12) перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, з якого згодом утворюється 3-фосфогліцерат за допомогою ферменту фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3).

Далі отриманий 3-фосфогліцерат катаболізується за допомогою фосфогліцеромутази (КФ 5.4.2.11) у 2-фосфогліцерат, з якого потім одержуємо фосфоенолпіруват (ФЕП) за дії енолази (КФ 4.2.1.11). Отриманий ФЕП перетворюється за дії піруваткінази (КФ 2.7.1.40) на піруват, який згодом із залученням фередоксиноксидоредуктази (КФ 1.2.7.11) перетворюється на ацетил-КоА, що потім залучається до циклу трикарбонових кислот (ЦТК) [48].

Цикл трикарбонових кислот проходить таким чином. Ацетил-КоА під дією ферменту цитратсинтази (КФ 2.3.3.1) перетворюється на цитрат, з якого далі за допомогою аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3) утворюється цис-Аконітат.

Отримана сполука потім під дією того ж ферменту перетворюється на ізоцитрат, з якого за допомогою ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42) синтезується 2-Оксоглутарат, який перетворюється на сукциніл-КоА за дії 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 2.3.1.61). З утвореної сполуки синтезується сукцинат за допомогою сукциніл-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.5). Далі сукцинат під дією сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.5.1) перетворюється на фумарат, з якого одержуємо за допомогою фумаратгідратази (КФ 4.2.1.2) малат, який потім перетворюється на оксалоацетат за дії малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37).

Анаплеротичними реакціями, які забезпечують поповнення інтермедіату ЦТК – оксалоацетату при рості на вуглеводному субстраті – глюкозі є такі реакції:

- карбоксилювання фосфоенолпірувату (фермент – фосфоенолпіруваткарбоксилаза КФ 4.1.1.31);
- карбоксилювання пірувату (фермент – піруваткарбоксилаза КФ 6.4.1.1).

Утворений на попередніх стадіях ацетил-КоА перетворюється на ацетоацетил-КоА [49] за дії ацетил-КоА-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.9). З одержаної сполуки під дією 3-гідроксибутирил-КоА дегідрогенази (КФ 1.1.1.157) утворюється 3-гідроксибутаноїл-КоА, з якого далі синтезується кротоноїл-КоА за допомогою 3-гідроксибутирил-КоА-дегідратази (КФ 4.2.1.17). Утворена таким чином сполука перетворюється за дії транс-2-еноїл-КоА-редуктази (КФ 1.3.1.44) на бутаноїл-КоА, з якого далі одержуємо за допомогою біфункціональної ацетальдегід-КоА/алкогольдегідрогенази (КФ 1.2.1.10) бутаналь, що далі перетворюється за дії NADH-залежної бутанолдегідрогенази (КФ 1.1.1.-) на цільовий продукт – бутанол.

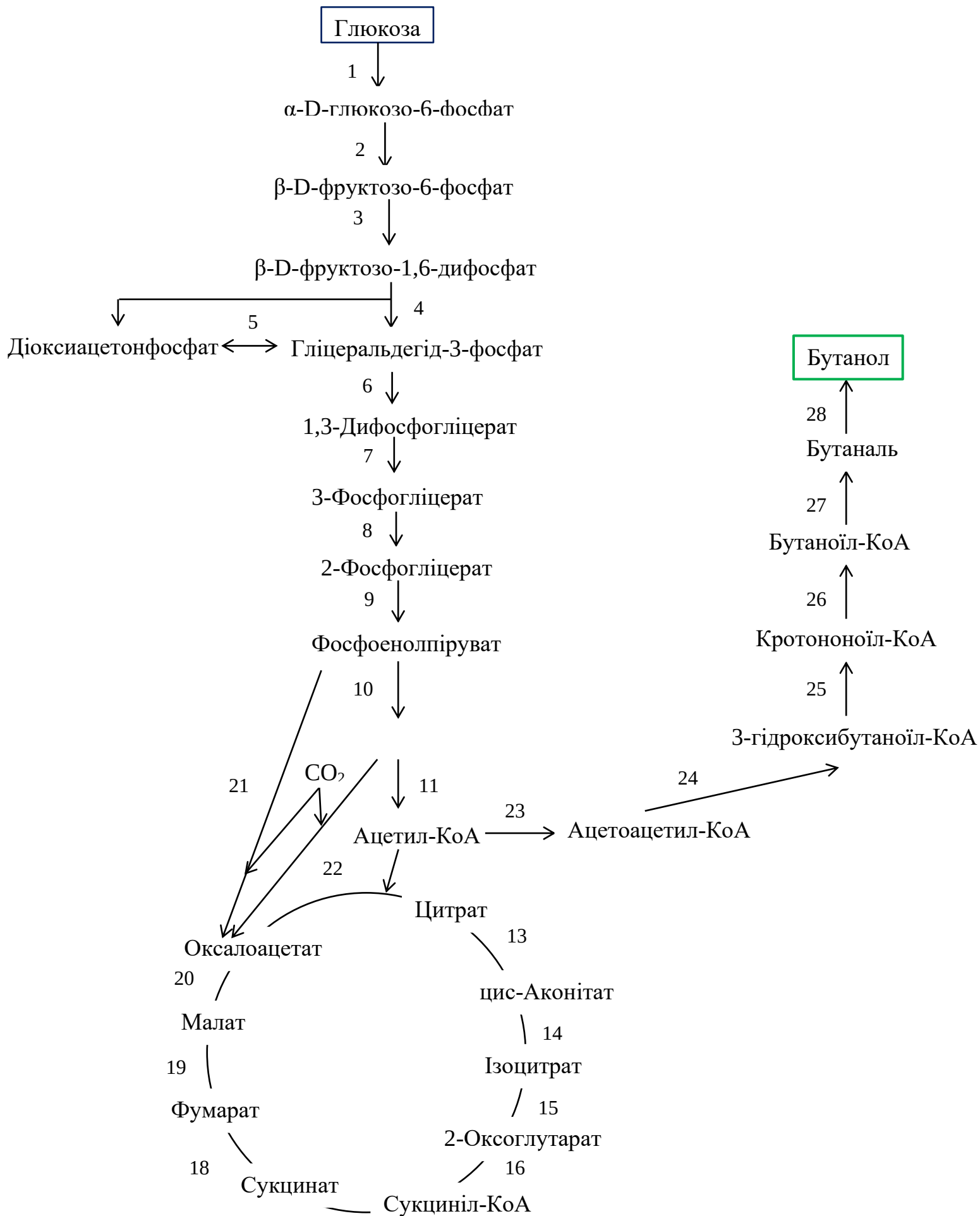


Рис 3.3. Схема біотрансформації глюкози
Clostridium acetobutylicum MTCC 11274 у бутанол

Ферменти:

1. КФ 2.7.1.2 Глюкокіназа
2. КФ 5.3.1.9 Глюкозо-6-фосфат-ізомераза
3. КФ 2.7.1.11 6-фосфофруктокіназа
4. КФ 4.1.2.13 Фруктозо-дифосфат альдолаза
5. КФ 1.2.1.12 Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
6. КФ 2.7.2.3 Фосфогліцераткіназа
7. КФ 5.4.2.11 Фосфогліцеромутаза
8. КФ 4.2.1.11 Енолаза
9. КФ 2.7.1.40 Піруваткіназа
10. КФ 1.2.7.11 Ферредоксиноксидоредуктаза
11. КФ 2.3.3.1 Цитратсинтетаза
12. КФ 2.3.3.1 Цитратсинтетаза
13. КФ 4.2.1.3 Аконітатгідратаза
14. КФ 4.2.1.3 Аконітатгідратаза
15. КФ 1.1.1.42 Ізоцитратдегідрогеназа
16. КФ 2.3.1.61 2-Оксоглутаратдегідрогеназа
17. КФ 6.2.1.5 Сукциніл-КоА-синтетаза
18. КФ 1.3.5.1 Сукцинатдегідрогеназа
19. КФ 4.2.1.2 Фумаратгідратаза
20. КФ 1.1.1.37 Малатдегідрогеназа
21. КФ 4.1.1.31 Фосфоенолпіруваткарбоксилаза
22. КФ 6.4.1. 1 Піруваткарбоксилаза
23. КФ 2.3.1.9 Ацетил-КоА ацетилтрансфераза
24. КФ 1.1.1.157 3-гідроксибутирил-КоА дегідрогеназа
25. КФ 4.2.1.17 3-гідроксибутирил-КоА дегідратаза
26. КФ 1.3.1.44 Транс-2-еноїл-КоА-редуктаза
27. КФ 1.2.1.10 Біфункціональна ацетальдегід-КоА/алкогольдегідрогеназа
28. КФ 1.1.1.- NADH-залежна бутанолдегідрогеназа

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ

4.1. Обґрунтування вибору умов культивування *Clostridium acetobutylicum* МТСС 11274 та типу ферментера

Обраний нами продуцент *C. acetobutylicum* МТСС 11274 є анаеробною бактерією [26]. Зважаючи на це, замість підготовки стерильного аераційного повітря потрібно у ферментаційному обладнанні потрібно забезпечити безкисневі умови. Для нормального функціонування такого бродіння слід безперервно подавати інертний газ або азот. При цьому, також для інтенсифікації масообмінних процесів і насичення поживного середовища азотом, необхідною умовою є наявність перемішуючого пристрою. Обираємо турбінну мішалку із частотою обертів 300 об/хв.

Постає також необхідність у забезпеченні оптимального температурного режиму (37 °С) і рН (6,1) [26] для активного росту продуцента із подальшим біосинтезом бутанолу. Для контролю таких показників у ферментаційному обладнанні встановлюються датчики температури і рН. Однак за даних умов здатна до розвитку велика кількість мезофільних та нейтрофільних бактерій. Ріст таких мікроорганізмів спричинює появу сторонньої контамінації поживних середовищ, посівного матеріалу і культуральної рідини, тому усі стадії проектного виробництва бутанолу повинні здійснюватися за асептичних умов.

Під час порівняння глибинного і поверхневого способів культивування, зупиняємося на виборі саме глибинного методу, оскільки за поверхневого культивування кінцева концентрація одержаного бутанолу буде суттєво нижчою. Зокрема, використання поверхневого способу характерне для грибних клітин, а наш продуцент є бактерією.

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ					
Зм	Анк	№	Підпис	Ла						
Розробник	Митницька				РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА			Ліценз	Анквнш	Анквншів
Керівник	Скрипська О.									34
Н. контр										105
Консульт								Кафедра БТМ		
Зав. каф	Стебніков									

Потрібно також зважати, що за поверхневого культивування мікроорганізми під час свого росту споживають кисень безпосередньо із повітря, а для обраного нами біологічного агента така сполука є токсичною.

У свою чергу, глибинне культивування може проходити як періодичним, так і безперервним способом. На відміну від періодичного методу, у процесі безперервного можливим є вимивання ще неспожитого середовища із ферментера, що є суттєвим недоліком даного способу. Зважаючи на це, обираємо саме періодичний спосіб культивування.

Також, потрібно звернути увагу на те, що концентрація субстрату складає 82,04 г/л [26], а отже, постає необхідність у підготовці підживлювального розчину глюкози. Початковий вміст глюкози в 1 л середовища складає 40 г. Час культивування складає 72 год, приймаємо, що розчин підживлення додається кожні 8 год, а отже, кількість необхідних порцій підживлення становитиме $(72 - 8) / 8 = 8$. Тому із кожною порцією підживлення у середовище вносимо $42,04 / 8 = 5,3$ г/л.

Отже, підсумувавши наведену вище інформацію, можна стверджувати, що біосинтез бутанолу здійснюватиметься за таких умов:

- ❖ стерильність;
- ❖ безкисневе культивування із безперервним продуванням азотом;
- ❖ температурний режим: 37 °С;
- ❖ рН 6,1;
- ❖ періодичність вирощування продуценту із підживленням;
- ❖ глибинний спосіб.

Як попередньо було обраховано у розділі 1, аби забезпечити потребу в бутанолі, необхідно для вирощування штаму *C. acetobutylicum* MTCC 11274 встановити ферментер об'ємом 10 м³. Для цього обираємо ферментер моделі Pfaudler DIN BE на 10 м³. Відповідний ферментер володіє такими характеристиками:

- ✓ термостійкість -25/+200°С;
- ✓ наявність сорочки;

- ✓ система покриття: антикорозійна алюхромова ґрунтовка, 2 шари;
- ✓ мінімальна товщина сухого шару 60 мкм;
- ✓ максимально допустимий тиск всередині реактора -1 ... +6 бар;
- ✓ універсальна турбінна мішалка частотою обертів до 320 об/хв;
- ✓ датчики контролю температури і рН, які дають змогу вимірювати та контролювати відповідні показники швидко та точно.

Ферментери Pfaudler DIN BE використовуються у всьому світі і вважаються еталоном безпеки, надійності та економічності. У цю серію входять великі біореактори із товстими стінками сорочки та номінальним об'ємом від 1600 літрів. Емаль Pfaudler WWG забезпечує чудову стійкість до корозійних та механічних/абразивних впливів. Це забезпечує тривалий термін служби. Довжина герметичних поверхонь виробником була зведена до мінімуму, оскільки наявний люк є найбільшим отвором у таких ферментерах [50].

4.2. Вибір миючих та дезінфікуючих засобів для виробництва бутанолу

У сучасних умовах ринку, якість продукції будь-якої промисловості залежить не лише від якості сировини та технології переробки, але й значною мірою від санітарно-гігієнічних показників виробництва. Підтримка належного рівня санітарного стану на підприємстві є важливим чинником для досягнення високих результатів у виробництві якісної продукції. Вирішення цього важливого завдання вимагає комплексного підходу. Наприклад, без використання сучасних миючих та дезінфікуючих засобів неможливо досягти передового рівня виробничої гігієни [51].

Мийні засоби представляють собою окремі хімічні речовини або складні суміші хімічних речовин, які взаємодіють між собою, включаючи поверхнево-активні речовини та компоненти, що призводять до утворення піни. Зазвичай, для миття буває цілком обґрунтованим використовувати складні суміші, оскільки вони мають більший спектр дії і забезпечують кращий миючий ефект [52].

Синтетичні миючі засоби (СМЗ) складають значну частину загального обсягу хімічної продукції. Вони знаходять широке застосування як на виробництві, так і в побуті. СМЗ відзначаються потужною миючою дією як в м'якій, так і в жорсткій воді, оскільки вони не взаємодіють з іонами кальцію і магнію, які містяться в жорсткій воді, і не утворюють з ними нерозчинних солей. СМЗ можна використовувати в слаболужних, нейтральних і кислих середовищах. Деякі з них також мають дезінфікуючі властивості. Розчини СМЗ найбільше ефективні при низькій температурі, що дозволяє їх використовувати для прання тканин із шовкових, вовняних і синтетичних волокон [53].

Для здійснення санітарної підготовки проектного біотехнологічного виробництва бутанолу обираємо такі миючі засоби як «Prima Soft Dez-1» і «Мультиклін Аква».

«Prima Soft Dez-1» – висококонцентрований слаболужний пінний миючий і дезінфікуючий засіб є оптимізованою сумішшю поверхнево-активних речовин (ПАР) та комплексоутворюючих речовин. Він легко розчиняється у воді, біорозкладається і містить активний хлор. Засіб є стабільним в хімічному відношенні у воді та на повітрі, і не розкладається з виділенням шкідливих речовин. Крім того, він має підвищений дезінфікуючий ефект. Миючий та дезінфікуючий засіб широкого спектру дії для ефективного очищення металевих, пластикових поверхонь, а також керамічної плитки від білкових та жирових забруднень, бруду [54, 55].

«Мультиклін Аква» має бактерицидну, фунгіцидну і віруцидну дію, використовується для ручної та машинної мийки, заповнення дезбар'єрів та дезкилимків, дезінфекції транспорту та приміщень, санації приміщень у присутності тварин. Зберігає свою активність при інтенсивному світлі, при використанні жорсткої води, в присутності органічних матеріалів (залишки корму, тваринні виділення та ін.). Миття даним засобом проводять методом ручного протирання, зрошення, генерування піни. Після ретельної механічної очистки засіб слід рівномірно нанести на поверхню до повного її змочування.

Місця можливого накопичення залишків деззасобу (кормушки, поїлки та ін.) промивають водою. З інших поверхонь змивати залишки препарату не потрібно [56].

Таблиця 4.1

Порівняльна характеристика миючих та дезінфікуючих засобів

Назва обраного засобу	Склад	Спектр дії	Необхідна кількість для обробки 1 м ²	Термін зберігання. Ціна за 1 л/1 кг	Заходи безпеки під час використання
1	2	3	4	5	6
«Prima Soft Dez-1»	вода, гіпохлорид натрію, гідроксид натрію, 5-15% неіоногенні ПАВ, глюконат натрію.	високий антибактеріальний ефект широкого спектру дії	Щоденне прибирання (миття підлоги і стін) - 5 мл миючого засобу на відро води 7-8 літрів (не вимагає змивання). Генеральне прибирання (миття підлоги і стін) - від 15 до 50 мл миючого засобу на відро води 7-8 літрів (після промити чистою водою). Для боротьби з грибком і цвілью - від 25 до 50 мл миючого засобу на 1 літр води.	Термін зберігання – 2 роки. 120 грн за 1 кг	При попаданні на шкірний покрив змити водою, просочений складом одяг зняти. Забороняється вдихати аерозольний туман. При попаданні на слизові оболонки очей промити холодною водою [54, 55].

Продовження табл. 4.1

«Мультиклін Аква»	алкілдиметилбензиламоній хлорид; дидецилдиметиламоній хлорид; глутаровий альдегід; ізопропіловий спирт полігексаметиленбігуанідин гідрохлорид. Допоміжні речовини: вода очищена та ін.	бактерицидної по відношенню до грампозитивних та грамнегативних бактерій, в тому числі ефективний для спороутворюючих форм мікроорганізмів; фунгіцидної по відношенню до дріжджових та пліснявих грибів (<i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.); віруліцидної по відношенню до ДНК- та РНК-вірусів: коронавіруси, збудників пташиного грипу типів H7N1 та H5N1, хвороби Ньюкасла і т. д.	Профілактична обробка: робочий розчин 0,2 – 0,5% із витратою 0,2 – 0,5 л/м ² та часом експозиції до 120 хв. Вимушена обробка: : робочий розчин 0,3 – 3% із витратою 0,2 – 0,5 л/м ² та часом експозиції до 5 год.	Термін зберігання – 2 роки. 415 грн за 1 кг	Приготування робочих розчинів проводити в провітрюваному приміщенні де є вода. Всі роботи, пов'язані із приготуванням робочих розчинів препарату, слід проводити із дотриманням заходів захисту органів дихання, шкіри та очей (використовувати гумові рукавиці, не наближатися обличчям до відкритої ємності із засобом). Після закінчення роботи обличчя і руки слід вимити водою з милом. У разі подразнення органів дихання слід негайно припинити роботу із засобом, вийти на свіже повітря або в інше приміщення, провітрити приміщення [56].
----------------------	--	---	---	---	---

Закінчення табл. 4.1

«DEZALDUM 20»	вода підготовлена; >15% бензалконію хлорид; > 10 % глутаровий альдегід, ізопропіловий спирт; н-ПАР, регулятор кислотності, комплексоутворювач.	патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми (кишкова паличка, бруцели, клостридії, стрептококи, стафілококи, сальмонели і ін.); мікобактерії туберкульозу; коронавіруси людини, в тому числі SARS-CoV-2, що викликає COVID-19; вірусу поліомієліту; вірусу імунодефіциту людини; вірусу кору; коро- і аденовірусів; ротавірусів; герпесу; гепатитів А, В, С, D; пліснявих грибів.	Встановлена норма витрат готового розчину цього засобу для протирання — 100 мл на 1 м ² , для зрошування — 300 мл на 1 м ² .	Термін придатності нерозкритого засобу складає 5 років. Після розкриття його необхідно використати протягом 2 тижнів. 160 грн за 1 л	Рекомендовано використовувати засоби індивідуального захисту (детальну інформацію дивись в методичних рекомендаціях). Не допускати контакту зі слизовими оболонками. У разі потрапляння в очі промити великою кількістю води і звернутися до лікаря [57, 58].
---------------	---	--	--	--	---

Сучасні дезінфекційні засоби – це багатокомпонентні композиції, що складаються з діючих та допоміжних речовин, які забезпечують їх цільове призначення. Удосконалення дезінфекційних технологій на практиці вимагає оптимального вибору дезінфікувальних засобів залежно від конкретної задачі. З цією метою має здійснюватися комплексна система оцінки всіх значимих властивостей дезінфекційного засобу, які визначають виконання поставленої мети – забезпечення найвищої ефективності проведення дезінфекційних заходів [59].

Сучасні вимоги до дезінфікуючих засобів включають:

- широкий спектр антимікробної дії;
- бактерицидний ефект;
- розчинність у воді;
- відсутність пошкоджуючої дії на оброблені поверхні;
- низька токсичність та алергенність [52].

Сьогодні в Україні зареєстровано широкий асортимент дезінфекційних засобів, які у переважній більшості є багатофункціональними композиціями, що складаються з діючих та допоміжних речовин. Асортимент дезінфекційних засобів є достатнім у кількісному складі і достатньо різноманітним щодо якості. В умовах можливості раціонального вибору дезінфекційних засобів слід відходити від практики виправдано широкого застосування універсальних за спектром протимікробної дії препаратів, а надавати перевагу найбільш придатним за своїм призначенням дезінфектантам [59].

Для проведення дезінфекції на виробництві бутанолу пропонується використання такого засобу як «Dezaldum 20». «Dezaldum 20» являє собою прозору безбарвну або жовтуватого кольору рідину зі слабким запахом. Даний засіб призначений для:

- 1) дезінфекції та миття поверхонь (зокрема зовнішніх поверхонь машин, апаратів, ємностей і т. п.);

- 2) боротьби з пліснявими грибами (ванні кімнати, душові та ін.);
- 3) дезінфекції, чистки і миття сміттєприбирального обладнання і сміттєзбірників.

Фізичні і хімічні властивості обраного засобу:

- прозора рідина з легким приємним запахом;
- значення рН (концентрату): 6,5–7,8;
- питома густина при 20 °С: 1,07–1,12 г/см³ [57, 58].

4.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для культивування *C. acetobutylicum* MTCC 11274

Відповідно до попередньо проведених розрахунків (див підрозділ 3.4) виробничий біосинтез бутанолу проходить у ферментері об'ємом 10 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,8. Вирощування посівного матеріалу здійснюють у 4 послідовні етапи (культивування у 6 колбах на качалках, інокуляторах об'ємом 10 і 100 л та посівному апараті на 1,25 м³).

Згідно з даними, зазначеними у статті [26], склад поживного середовища для культивування *C. acetobutylicum* MTCC 11274 наступний (г/л):

- Глюкоза – 82,04;
- пептон – 49,66;
- CaCO₃ – 5,0;
- K₂HPO₄ – 0,5;
- KH₂PO₄ – 0,5;
- MgSO₄ · 7H₂O – 0,46;
- MnSO₄ · H₂O – 0,023;
- FeSO₄ · 7H₂O – 0,023;
- NaCl – 0,023;
- ПАБК – 0,01;
- біотин – 0,01;
- ацетат амонію – 2,2.

pH середовища складає 6,1.

Для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках потрібен невеликий об'єм поживного середовища, який будемо стерилізувати в автоклаві. Для наступних стадій одержання інокуляту та виробничого біосинтезу підготовку компонентів середовища плануємо здійснювати в окремих реакторах-змішувачах або безпосередньо у ферментаційному обладнанні. Для стерилізації солей у біореакторах потрібно досягти pH середовища 4,0 – 4,5, а отже, передбачити підготовку титрувальних агентів. Задля проведення такої операції як підкислення середовища перед стерилізацією в інокуляторах та ферментері обираємо 6%-ий розчин соляної кислоти, а для подальшого підлужнення (культивування проходить за pH 6,1) – 6%-ий розчин натрію гідроксиду.

Джерело вуглецю – глюкозу, будемо стерилізувати за більш м'якого режиму, оскільки така сполука є термолабільною та здатна до карамелізації. Оскільки концентрація глюкози є достатньо високою (82,04 г/л), необхідним також є приготування і стерилізація її підживлювального розчину.

За такого ж режиму плануємо стерилізацію біотину та ПАБК, оскільки такі компоненти здатні до розпаду за дії високих температур. ПАБК є важливим фактором росту, необхідним для біосинтезу коензиму А, який виконує важливі функції в клітинах, зокрема, в метаболізмі жирів та вуглеводів. Біотин є необхідним вітаміном для багатьох організмів, оскільки він виконує роль кофактора для багатьох ферментів, що займаються обміном вуглеводів, жирів і амінокислот. Біотин також впливає на синтез нуклеїнових кислот і метаболізм глюкози. Найжорсткіших умов стерилізації зазнають солі, які зазвичай зберігають у мішках на підлозі промислових приміщень.

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

На даному етапі аби отримати потрібний об'єм інокуляту, потрібно приготувати 800 мл стерильного поживного середовища. Підготовлене середовище згодом розливаємо у 6 стерильних качалочних колб об'ємом 750

мл. Залежно від температурного режиму стерилізації та утворення можливих осадів кальцію і магнію фосфатів, поділ на композиції обраного середовища проводимо таким чином:

Композиція А: глюкоза, пептон (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ацетат амонію (режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, час 40 хв).

Композиція В: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, час 40 хв).

Композиція Г: CaCO_3 (режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, час 40 хв).

Окремо здійснюють приготування запасного розчину ПАБК та біотину, який стерилізують в автоклаві при 112 °С протягом 20 хв.

4.3.2. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання посівного матеріалу в інокуляторах об'ємом 10 і 100 л та посівному апараті на 1,25 м³

Такі етапи підготовки посівного матеріалу передбачають приготування 8,3, 82 і 812,1 л стерильного поживного середовища. Зважаючи на те, що такі компоненти як солі будемо стерилізувати у самих апаратах, склад і кількість композицій зміняться:

Композиція А: глюкоза, пептон, ПАБК, біотин (режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа, час 20 – 30 хв).

Композиція Б: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ацетат амонію, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, час 40 хв).

Композиція В: CaCO_3 (режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, час 40 хв).

4.3.3. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу бутанолу у ферментері об'ємом 10 м³

З метою одержання цільового продукту, необхідною умовою є підготовка 8036 л поживного середовища. З метою зменшення витрати води, пари та скоротити час обробки даного об'єму поживного середовища, економічно доцільним буде проведення процесу стерилізації в УБС, температурний режим якої складає 131 °С. Всі компоненти композиції А готують в одному реакторі, розчиняють і перекачують відцентровим насосом до збірника УБС-5.

Композиція А: глюкоза, пептон, ПАБК, біотин, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ацетат амонію, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCO_3 (режим стерилізації: 131 °С, час 5 – 7 хв).

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ

У табл. 5.1 представлено узагальнену інформацію щодо обладнання, використовуваного під час біотехнологічного виробництва бутанолу, та зображеного у графічній частині проекту (апаратурна схема).

Таблица 5.1

Специфікація обладнання проектного виробництва бутанолу

Позиція	Найменування апарату	Кількість	Узагальнена характеристика
1	2	3	4
РЗ-1, РЗ-3, РЗ-5	Реактор-змішувач для приготування робочих розчинів миючих та дезінфікуючих засобів	3	Реактор-змішувач СЕонв 0,16 об'ємом 160 л. Матеріал: нержавіюча сталь. Діапазон температур від -20 °С до 250 °С. Встановлена лопатева мішалка частотою обертів 100 об/хв. Двигун потужністю: 0,75 кВт. Розміри: 1040 x 930 x 2930 мм [60].
Н-2, Н-4, Н-6	Відцентровий насос	3	Насос відцентровий горизонтальний BGWHB 50-160. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Частота обертів: 2 880 об/хв. Продуктивність: до 12,5 м³/год. Макс. температура: 120 °С. Виробник: Китай [61].
РЗ-7	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор-змішувач із вакуумним фільтром Lab1st JGR-F об'ємом 5 л. Матеріал: високоякісне боросилікатне скло. Діапазон температур від -80 °С до 200 °С. Контролер обертання: частотно-регульований привод, 600 об/хв. Потужність двигуна мішалки: 120 Вт. Розміри: 600×500×1750 мм [62].
ІФ-8, ІФ-16, ІФ-25, ІФ-37	Індивідуальні фільтри	4	Індивідуальний фільтр серії FA-1. Максимальний робочий тиск: 12 бар. Матеріал: голова: алюмінієвий сплав; колба: сталь; ущільнення: Buna-N. Діапазон температур від -25 °С до 120 °С [63].

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ			
Зм	Арк	№	Підпис	Да				
Розробник		Митницька			РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ	Лімен	Анквил	Анквилів
Керівник		Скороцька О.					47	105
Н. контр						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав. каф		Стабніков						

I-9	Інокулятор	1	Інокулятор BLBIO-XGJ об'ємом 10 л. Матеріал: нержавіюча сталь 316L+боросилікатне скло. Обладнаний магнітною мішалкою із частотою обертів до 120 об/хв. Містить датчики температури, рН. Розміри: 800 x 500 x 600 мм [64].
Д-10, Д-12	Ваговий дозатор для компонентів поживного середовища	2	Дозатор для сипучих продуктів NPF-3000-201 Hualian. Похибка дози (допустима): до 2%. Потужність: 0,2 кВт. Діапазон дозування: 10-3000 г [65].
P3-11, P3-13, P3-14	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композицій А, Б і В	3	Реактор-змішувач СЕонв 0,04 об'ємом 40 л. Матеріал: нержавіюча сталь. Діапазон температур від -20 °С до 250 °С. Встановлена лопатева мішалка частотою обертів 100 об/хв. Двигун потужністю: 0,75 кВт. Розміри: 600 x 500 x 750 мм [60].
H-15, H-24, H-29, H-31, H-39	Відцентровий насос	5	Моноблочний відцентровий насос BZ 50-160/7,5. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 304. Потужність: 7,5 кВт. Продуктивність: до 42 м ³ /год. Виробник: Китай [66].
I-17	Інокулятор	1	Ферментер Pfaudler DIN AE об'ємом 100 л. Матеріал: нержавіюча сталь 304. До комплекту входять: датчики температури, рН і спожитого азоту, пробовідбірник, манометр, сорочка. Частота обертів турбінної мішалки: до 320 об/хв. Виробник: Німеччина. Розміри: 600 x 1980 мм [67].
Д-18, Д-20, Д-22, Д-27	Ваговий дозатор для компонентів поживного середовища	4	Ваговий дозатор для сипучих ВД-4 напівавтоматичний. Мінімальна межа дозування: 100 г. Максимальна межа дозування: 50 кг. Похибка дозування (%): 0,35. Виробник: Україна [68].
P3-19, P3-21, P3-23	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композицій А, Б і В	3	Реактор-змішувач об'ємом 400 л. Матеріал: нержавіюча сталь 316. Двигун потужністю 0,44 кВт при частоті обертів до 1300 об/хв. Тип мішалки: пропелерна. Розміри: 695 x 2000 мм [69].

ПА-26	Посівний апарат	1	Посівний апарат об'ємом 1,25 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI316L. Частота обертів мішалки: 70 об/хв. Температура у сорочці нагріву від +5 до +150 °С. Робочий тиск: 0,6 МПа. Розміри: 1100 x 3050 мм [70].
РЗ-28	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач RDS Inox об'ємом 10 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь типу 304. Діапазон температур від -30 °С до 200 °С. Робочий тиск: 6 бар. Потужність: 15 кВт. Розміри: 2200 x 5100 мм [71].
УБС-30	Установка безперервної стерилізації	1	Матеріал: нержавіюча сталь типу AISI 304. Потужність – 10 м ³ /год. Температура стерилізації – 131 °С. Містить 2 теплообмінника. Виготовлення на замовлення.
РЗ-32, РЗ-34	Реактор-змішувач для приготування розчинів титрувальних агентів концентрацією 6%	2	Реактор-змішувач Lab1st JGR-L об'ємом 20 л, що складається з реакційної ємності зі стійким до корозії скляним кожухом, датчика температури та цифрового дисплея. Діапазон температур: -120 °С ~ 250 °С. Контролер обертів: 1200 об/хв. Тип мішалки: лопатева. Розміри: 720×650×2110 мм [72].
Д-33	Ваговий дозатор для їдконого натру	1	Дозатор для сипучих продуктів FZ-1000 Hualian. Похибка дози (допустима): до 2%. Потужність: 0,2 кВт. Діапазон дозування: 10-1000 г [73].
Д-35	Ваговий дозатор для глюкози	1	Ваговий дозатор ФС-125. Межі зважування 0,15-50 кг. Похибка дози (допустима) 1%. Країна виробник: Україна [74].
РЗ-36	Реактор-змішувач для підготовки підживлювального розчину	1	Реактор-змішувач СЕонв 0,16 об'ємом 160 л. Матеріал: нержавіюча сталь. Діапазон температур від -20 °С до 250 °С. Встановлена лопатева мішалка частотою обертів 100 об/хв. Двигун потужністю: 0,75 кВт. Розміри: 1040 x 930 x 2930 мм [60].
ФР-38	Ферментер	1	Ферментер Pfaudler DIN BE об'ємом 10 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь 304. До комплексу входять: датчики температури, рН і спожитого азоту, пробовідбірник, манометр, сорочка. Частота обертів турбінної мішалки: до 320 об/хв. Виробник: Німеччина. Розміри: 2500 x 4522 мм [75].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ

Технологічна схема біосинтезу бутанолу *Clostridium acetobutylicum* МТСС 11274 включає в себе стадії допоміжних робіт і технологічного процесу. До допоміжних робіт (ДР) належать такі етапи: санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація титрувальних агентів, підготовка запасних та підживлювального розчинів, приготування і стерилізація певних об'ємів поживних середовищ. Технологічний процес включає в себе етапи підготовки посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину «Prima Soft Dez-1»

На такій стадії необхідним є приготування 120 л робочого розчину «Prima Soft Dez-1» концентрацією 0,1%. Для цього у реактор-змішувач об'ємом 160 л (РЗ-1), який знаходиться на підлозі другого поверху, подають відповідний концентрат об'ємом 120 мл і питну воду об'ємом 119,88 л. Отриманий робочий розчин потім охолоджують та перекачують за використання відцентрового насосу (Н-2) на наступні етапи (Кх 1.1.1).

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину «Мультиклін Аква»

Відповідна стадія потребує приготування 120 л робочого розчину «Мультиклін Аква» концентрацією 2%. У реактор-змішувач об'ємом 160 л (РЗ-3), який розташований на підлозі другого поверху, подається концентрат такого засобу об'ємом 2400 мл і питну воду об'ємом 157,6 л. Приготований робочий розчин потім охолоджують та перекачують за використання відцентрового насосу (Н-4) на наступні стадії (Кх 1.1.2).

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ		
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дат.			
Розробник	Митницька				РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ	Лімен	Анkvш
Керівник	Скpпилька О.						50
Н. контр.							50
Консульт.							50
Зав. каф.	Стабніков					Кафедра БТМ	

ДР 1.1.3. Приготування робочого розчину «Dezaldum 20»

Необхідним є підготовка 130 л робочого розчину «Dezaldum 20» концентрацією 1%. У реактор-змішувач об'ємом 160 л (РЗ-5), який планується встановити на підлозі II-го поверху, подається концентрат такого засобу об'ємом 1300 мл і питну воду об'ємом 128,7 л. Приготований робочий розчин потім охолоджують та перекачують за використання відцентрового насоса (Н-6) до наступних етапів (Кх 1.1.3).

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання приміщень

Щоденно здійснюється регулярне прибирання, включаючи миття підлоги, за допомогою вологої техніки. Під час цього процесу видаляють готову продукцію, напівфабрикати, виробничі відходи і невикористані матеріали з виробничих ділянок, лабораторій, побутових і службових приміщень.

Крім того, для контролю чистоти здійснюється мікробіологічний аналіз приміщення. Мета цього аналізу – перевірка наявності мікроорганізмів в приміщенні, з обмеженням кількості до 800 на кожному квадратному сантиметрі поверхні (КУО $<800/\text{см}^2$). Ця процедура полягає в забезпеченні високого стандарту чистоти в приміщенні (Км 1.2.1).

ДР 1.2.2. Здійснення генеральних прибирань

Один раз на місяць здійснюється такий вид прибирань, що включає миття стін, вікон і дверей. Для проведення генеральних прибирань використовують 0,1% робочий розчин «Prima Soft Dez-1» (згідно з ДР 1.1.1) і 1% робочий розчин «Dezaldum 20» (згідно з ДР 1.1.3). Як і на попередньому етапі, здійснюється мікробіологічний аналіз приміщення для контролю чистоти. На цьому етапі вимагається, щоб кількість мікроорганізмів не перевищувала 300 на кожному квадратному сантиметрі поверхні (КУО $<300/\text{см}^2$). Мета цієї процедури – забезпечити високий стандарт чистоти в приміщенні і підтримувати безпеку (Км 1.2.2)

ДР 1.3. Підготовка обладнання і комунікацій

ДР 1.3.1. Проведення миття обладнання

Миття обладнання проводять при застосуванні робочого розчину «Мультиклін Аква» з концентрацією 2% (згідно з ДР 1.1.2), який перед використанням нагрівають до температури, що становить 55°C. Процес миття обладнання виконується автоматизовано за допомогою системи СІР-мийки, використовуючи мийні засоби у кількості 20% від геометричного об'єму обладнання. Тривалість обробки складає 15-20 хвилин, після чого обладнання промивають питною водою за тим самим автоматизованим способом (Кт 1.3.1)

ДР 1.3.2. Технічний огляд технологічного обладнання

Процедури миття та ополіскування обладнання закінчуються шляхом проведення технічного огляду задля виявлення можливих нещільностей у комунікаціях або запірній арматурі на обладнанні. Якщо виявлено неущільнені ділянки, здійснюється підтягування різьбових з'єднань з метою забезпечення їх правильного функціонування та запобігання витокам або іншим проблемам (Кт 1.3.2)

ДР 1.3.3. Здійснення перевірки обладнання на герметичність

Перевірка герметичності ємнісного обладнання розпочинається закриттям всієї запірної арматури. Після цього подають аераційне повітря до досягнення рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Наступним кроком є закриття вентилів подачі повітря. Показники манометра на кришці апарата та тривалість витримки (30-60 хвилин) реєструють у спеціальному операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску в ньому не перевищує 0,01 МПа. Якщо спостерігається більше падіння тиску, застосовують галогенові течієпошукачі для виявлення нещільностей та визначення їх місця розташування.

Для виявлення нещільностей летку галогеновмісної речовини (фреон-12) вводять у невеликій кількості до апарату, а потім закривають усю запірну арматуру. Після цього апарат нагрівають до температури 80°C, одночасно

збільшуючи тиск до 0,2 МПа. Пари галогеновмісної речовини проникають через можливі неущільнення і можуть бути виявлені таким чином за допомогою щупа течієпошукача, який наближають до них. Процес проводять протягом 1,5-2 години. У разі виявлення нещільностей здійснюють підтягування різьбових з'єднань або проводять вимушену заміну ущільнюючої прокладки для усунення проблеми (Кт 1.3.3).

ДР 1.3.4. Проведення стерилізації обладнання

Така процедура проводиться протягом 1,5 годин, за використання гострої пари із температурою 110°C та тиском 0,2 МПа. Пару подають безпосередньо в апарат, а також до прилеглих комунікацій і сорочки. Для охолодження обладнання вода подається в сорочку. Також в апарат подається стерильне повітря для компенсації падіння тиску. Тривалість процесу охолодження проходить до досягнення температури 30-40°C та надлишкового тиску $P=0,003-0,005$ МПа і займає 0,5 години (Кт 1.3.4).

ДР 1.4. Підготовка персоналу

ДР 1.4.1 Навчання працівників

Важливо, щоб весь персонал, включаючи працівників, зайнятих складанням і технічним обслуговуванням, систематично проходив навчання з правильного виробництва продукції в асептичних умовах, збереження гігієни та основ мікробіології.

ДР 1.4.2. Санітарна підготовка персоналу

Проходження етапів миття та дезінфекції є необхідним і для персоналу. Для миття рук використовується господарське чи туалетне мило, а для дезінфекції – розчин етилового спирту з концентрацією 76%. Важливо дотримуватися правил гігієни і дезінфекції, аби забезпечити загальну безпеку виробництва та уникнути можливого ризику контамінації продукції.

ДР 2. Приготування і стерилізація титрувальних агентів

ДР 2.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти

ДР 2.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівних апаратах об'ємом 10 л, 100 л та 1,25 м³

Для приготування 1,8 л 6%-го розчину HCl у колбу об'ємом 3 л подають за допомогою мірного циліндра 1,5 л питної води і вносять за допомогою мірного циліндра на 500 мл при постійному перемішуванні 300 мл 37%-ого розчину HCl (Кх 2.1.1).

ДР 2.1.2. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у ферментаторі об'ємом 10 м³

Для приготування 16 л 6%-го розчину HCl у реактор-змішувач об'ємом 20 л (РЗ-32) подають за допомогою лічильника 13,4 л питної води і вносять через лічильник при постійному перемішуванні 2,6 л 37%-ого розчину HCl (Кх 2.1.2).

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлучення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 10 л

Для приготування 16,6 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 1 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 50 мл і за допомогою мірного циліндра на 25 мл додають 16,6 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кх, Кт, Км 2.2.1).

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлучення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 100 л

Для приготування 164 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 9,84 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 250 мл і за допомогою мірного циліндра на 250 мл додають 164 мл питної води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кх, Кт, Км 2.2.2).

ДР 2.2.3. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлучення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 1,25 м³

Для приготування 1,62 л 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 97,2 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу об'ємом 3 л і при постійному перемішуванні подають за допомогою мірного циліндра 1,62 л питної води. Стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кх, Кт, Км 2.2.3).

ДР 2.2.4. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH для підлучення поживного середовища у ферментаторі об'ємом 10 м³

Для приготування 16 л 6%-го розчину NaOH на ваговому дозаторі (Д-33) зважують 960 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у реактор-змішувач об'ємом 20 л (РЗ-34) і при постійному перемішуванні подають за допомогою лічильника 16 л питної води. Стерилізують у реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кх, Кт, Км 2.2.4).

ДР 3. Підготовка запасного розчину

ДР 3.1. Приготування і стерилізація запасного розчину ПАБК і біотину для вирощування інокуляту у колбах на качалках

На технічних терезах зважують 1,1 г ПАБК і біотину. Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл, додають 100 мл дистильованої води, відміряної мірним циліндром, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 3.1).

ДР 4. Підготовка підживлювального розчину

ДР 4.1. Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³

На ваговому дозаторі (Д-35) зважують 42,04 кг глюкози. Одержану наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 160 л (РЗ-36), за допомогою лічильника подають 105,1 л питної води і вмикають мішалку. Для кращого розчинення глюкози, у сорочку реактора подають пару. Такий розчин глюкози стерилізують у реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кх, Кт, Км 4.1).

ДР 5. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

Розраховані концентрації необхідних компонентів середовища, що далі буде використано при вирощуванні інокуляту у колбах на качалках, наведено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Склад композицій для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Необхідна кількість для приготування 800 мл середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Глюкоза	40	32	А	300
Вода	100			
Пептон	49,66	40	Б	300
Вода	100			
CaCO ₃	5	4	В	100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,46	0,37		
Вода	100			
K ₂ HPO ₄	0,5	0,4	Г	100
KH ₂ PO ₄	0,5	0,4		
Ацетат амонію	2,2	1,76		
NaCl	0,023	0,02		
MnSO ₄ · H ₂ O	0,023	0,02		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,023	0,02		
Вода	100			
Всього				800

ДР 5.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 32 г глюкози. Одержану наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, за використання мірного циліндра додають 300 мл дистильованої води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.1.1).

ДР 5.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 40 г пептону. Одержану наважку переносять у колбу об'ємом 500 мл, за використання мірного циліндра додають 300 мл дистильованої води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 121 °С (0,1 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.1.2).

ДР 5.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 4 г CaCO_3 , 0,37 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Одержані наважки переносять у колбу об'ємом 250 мл, за використання мірного циліндра додають 100 мл дистильованої води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.1.3).

ДР 5.1.4. Приготування і стерилізація композиції Г

На технічних терезах зважують 0,4 г K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , 1,76 г ацетату амонію, 0,02 г NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Одержані наважки переносять у колбу об'ємом 250 мл, за використання мірного циліндра додають 100 мл дистильованої води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.1.4).

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

На даному етапі необхідно врахувати, що 10% (830 мл) припадає на інокулят, а 10 % складає конденсат, що буде утворюватися при стерилізації поживного середовища в інокуляторі.

Розраховані концентрації необхідних компонентів середовища, що далі буде використано при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі на 10 л, наведено у табл. 6.2.

**Склад композицій для вирощування посівного матеріалу в
інокуляторі об'ємом 10 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Необхідна кількість для приготування 8,3 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Глюкоза	40	332	А	2000
ПАБК	0,01	0,08		
Біотин	0,01	0,08		
Вода	2000			
Пептон	49,66	412,2	Б	2100
Вода	2100			
CaCO ₃	5	41,5	В	4200
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,46	3,8		
K ₂ HPO ₄	0,5	4,2		
KH ₂ PO ₄	0,5	4,2		
Ацетат амонію	2,2	18,3		
NaCl	0,023	0,2		
MnSO ₄ · H ₂ O	0,023	0,2		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,023	0,2		
Вода	3700			
Конденсат	420			
Всього				

ДР 5.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 332 г глюкози, 0,08 г ПАБК і біотину. Одержані наважки переносять у колбу об'ємом 5 л, за використання мірного циліндра додають 2000 мл дистильованої води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.2.1).

ДР 5.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 412,2 г пептону. Одержану наважку переносять у колбу об'ємом 5 л, за використання мірного циліндра додають 2000 мл дистильованої води, перемішують і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 121 °С (0,1 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.2.2).

ДР 5.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 41,5 г CaCO_3 , 3,8 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,2 г K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , 18,3 г ацетату амонію, 0,2 г NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 5 л (РЗ-7), за використання лічильника подають 3700 мл питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів, у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури близько 40 °С. Отриманий розчин подають самоплином і стерилізують в інокуляторі об'ємом 10 л (І-9), додають необхідний об'єм 6%-го розчину соляної кислоти (від ДР 2.1.1) аби досягти рН на рівні 4,0 – 4,5 і здійснюють стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.2.3).

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

На даному етапі необхідно врахувати, що 10% (8,2 л) припадає на інокулят, а 10 % складає конденсат, що буде утворюватися під час здійснення стерилізації поживного середовища в інокуляторі та відповідних реакторах.

Розраховані концентрації необхідних компонентів середовища, що далі буде використано при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі на 100 л, наведено у табл. 6.3.

**Склад композицій для вирощування посівного матеріалу в
інокуляторі об'ємом 100 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Необхідна кількість для приготування 82 л середовища, г	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	40	3280	А	26
ПАБК	0,01	0,82		
Біотин	0,01	0,82		
Вода	20,1			
Конденсат	2,6			
Пептон	49,66	4072	Б	26
Вода	19,3			
Конденсат	2,6			
CaCO ₃	5	410	В	30
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,46	37,7		
K ₂ HPO ₄	0,5	41		
KH ₂ PO ₄	0,5	41		
Ацетат амонію	2,2	180,4		
NaCl	0,023	2		
MnSO ₄ · H ₂ O	0,023	2		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,023	2		
Вода	26,3			
Конденсат	3			
Всього				

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-10) зважують 3,28 кг глюкози, а на технічних терезах – 0,82 г ПАБК і біотину. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 40 л (РЗ-11), за використання лічильника подають 20,1 л питної води і вмикають перемішувач. Для кращого розчинення компонентів, у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури близько 40 °С. Отриманий розчин стерилізують у такому реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.3.1).

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-12) зважують 4,072 кг пептону. Одержану наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 40 л (РЗ-13), за використання лічильника подають 19,3 л питної води і вмикають

перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів, у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури близько 40 °С. Отриманий розчин стерилізують у такому реакторі при 121 °С (0,1 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.3.2).

ДР 5.3.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 410 г CaCO_3 , 37,7 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 41 г K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , 180,4 г ацетату амонію, 2 г NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 40 л (РЗ-14), за використання лічильника подають 26,3 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів, у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури близько 40 °С. Отриманий розчин перекачують за використання відцентрового насоса (Н-15) в інокулятор об'ємом 100 л (І-17), додають необхідний об'єм 6%-го розчину соляної кислоти (від ДР 2.1.1) для досягнення рН на рівні 4,0 – 4,5 і здійснюють стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.3.3).

ДР 5.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 1,25 м³

На даному етапі необхідно врахувати, що 10% (81,2 л) припадає на інокулят, а 10 % складає конденсат, що буде утворюватися під час здійснення стерилізації поживного середовища у посівному апараті, а також реакторах.

Розраховані концентрації необхідних компонентів середовища, що далі буде використано при вирощуванні інокуляту у посівному апараті на 1,25 м³, наведено у табл. 6.4.

**Склад композицій для вирощування інокуляту у посівному апараті
об'ємом 1,25 м³**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Необхідна кількість для приготування 812,1 л середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, л
Глюкоза	40	32,5	А	257
ПАБК	0,01	0,008		
Біотин	0,01	0,008		
Вода	200			
Конденсат	25,7			
Пептон	49,66	40,32	Б	256
Вода	190			
Конденсат	25,6			
CaCO ₃	5	4,1	В	300
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,46	0,37		
K ₂ HPO ₄	0,5	0,41		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,41		
Ацетат амонію	2,2	1,8		
NaCl	0,023	0,02		
MnSO ₄ · H ₂ O	0,023	0,02		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,023	0,02		
Вода	263			
Конденсат	30			
Всього				

ДР 5.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-18) зважують 32,5 кг глюкози, а за допомогою технічних терезів 8 г ПАБК і біотину. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 400 л (РЗ-19), за використання лічильника подають 200 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів, у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури близько 40 °С. Одержаний таким чином розчин стерилізують у такому реакторі при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.4.1).

ДР 5.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На ваговому дозаторі (Д-20) зважують 40,32 кг пептону. Одержану наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 400 л (РЗ-21), за використання лічильника подають 190 л питної води і вмикають

перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів, у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури близько 40 °С. Отриманий розчин стерилізують у такому реакторі при 121 °С (0,1 МПа) протягом 30 хв (Кт, Км 5.4.2).

ДР 5.4.3. Приготування і стерилізація композиції В

На ваговому дозаторі (Д-22) зважують 4,1 кг CaCO_3 і 1,8 кг ацетату амонію, а на технічних терезах – 370 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 410 г K_2HPO_4 і KH_2PO_4 , 20 г NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 400 л (РЗ-23), за використання лічильника подають 263 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів, у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури близько 40 °С. Отриманий розчин перекачують за використання відцентрового насоса (Н-24) у посівний апарат об'ємом 1,25 м³ (ПА-26), додають необхідний об'єм 6%-го розчину соляної кислоти (від ДР 2.1.1) для доведення рН до показників 4,0 – 4,5 і здійснюють стерилізацію при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Км 5.4.3).

ДР 5.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментаторі об'ємом 10 м³

На даному етапі необхідно врахувати, що 10% (803,6 л) припадає на інокулят, а 10 % складає конденсат, що буде утворюватися під час здійснення стерилізації поживного середовища у ферментері, а також реакторах.

Розраховані концентрації необхідних компонентів середовища, що далі буде використано при виробничому біосинтезі у ферментері на 10 м³, наведено у табл. 6.5.

**Склад композицій для виробничого біосинтезу бутанолу у
ферментері об'ємом 10 м³**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Необхідна кількість для приготування 8,036 м³ середовища, кг	Композиції	Об'єм композиції V, м³
Глюкоза	40	321	А	8,036
ПАБК	0,01	0,08		
Біотин	0,01	0,08		
Пептон	49,66	400		
CaCO ₃	5	40,2		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,46	3,7		
K ₂ HPO ₄	0,5	4		
KH ₂ PO ₄	0,5	4		
Ацетат амонію	2,2	17,7		
NaCl	0,023	0,18		
MnSO ₄ · H ₂ O	0,023	0,18		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,023	0,18		
Вода	7,06			
Конденсат	0,83			
Всього				8,036

ДР 5.5.1. Приготування композиції А

На ваговому дозаторі (Д-27) зважують 321 кг глюкози, 400 кг пептону, 40,2 кг CaCO₃ і 17,7 кг ацетату амонію, 3,7 кг MgSO₄ · 7H₂O, 4 кг K₂HPO₄ і KH₂PO₄, 180 г NaCl, MnSO₄ · H₂O і FeSO₄ · 7H₂O, а за допомогою технічних терезів 80 г ПАБК і біотину. Одержані таким способом наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-28) об'ємом 10 м³, додають через лічильник 7,06 м³ води питної, вмикають мішалку. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, аби досягти температури у реакторі 40°C (Кт, Км 5.5.1).

ДР 5.5.2. Стерилізація композиції А в УБС

Отриманий розчин солей (від ДР 5.5.1) перекачують відцентровим насосом (Н-29) в УБС-30, де відбувається стерилізація гострою парою за температури 131°C упродовж 5-7 хвилин (Кт, Кх, Км 5.5.2).

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

Колекційна культура *C. acetobutylicum* МТСС 11274 зазвичай зберігається у пробірці зі скошеним агаризованим середовищем (EG-агар [76]). Періодично здійснюють пересіви культури на свіжоприготоване поживне середовище (щомісяця). Обов'язковим є дотримання стерильності на даному етапі (Кт, Км 6.1).

ТП 6.2. Одержання робочої культури

Для отримання ізольованих колоній проводять розсів колекційної культури бактеріального штаму МТСС 11274 від ТП 6.1 на чашки Петрі із EG-агаром. Після цього одержану таким чином робочу культуру вирощують в анаеростаті за температурного режиму 37 °С протягом 48 год (Кт, Км 6.2).

ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу у пробірках на твердому середовищі

Ізольовані колонії робочої культури від ТП 5.3 із чашок Петрі пересівають за використання мікробіологічної петлі у пробірки зі скошеним EG-агаром. Слід прийняти, що при засіванні 1 пробірки застосовують 1 ізольовану колонію. Культуру вирощують за 37 °С протягом 48 годин. Необхідним є проведення мікробіологічного контролю, який здійснюють шляхом мікроскопіювання попередньо відібраної проби кожні 4 год (Кт, Км 6.3).

ТП 6.4. Вирощування інокуляту у колбах на качалках

За дотримання стерильних умов у попередньо простерилізовану колбу об'ємом 1 л вносять стерильні композиції А (від ДР 5.1.1), Б (від ДР 5.1.2), В (від ДР 5.1.3) і Г (від ДР 5.1.4), вносять запасний розчин ПАБК і біотину (від ДР 3.1), перемішують і розливають по 117 мл у 4 попередньо простерилізованих качалочних колб на 750 мл.

У пробірку із отриманою робочою культурою (від ТП 6.3) додають близько 5 мл фізіологічного розчину, клітини суспендують. Готову бактеріальну суспензію відбирають за використання стерильної піпетки і

вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують бактеріальну суспензію з 1 пробірки.

Вирощування посівного матеріалу здійснюють на качалці (200 об/хв) при 37 °С протягом 48 год. Після закінчення процесу проводять мікробіологічний контроль та визначення концентрації біомаси, що повинна становити 2,4 – 2,5 г/л [14]. Після таких операцій культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л (Кт, Км 6.4).

ТП 6.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор об'ємом 10 л (І-9) із простерилізованою композицією В (від ДР 5.2.3) через засівну колбу вносять простерилізовані композиції А (від ДР 5.2.1) і Б (від ДР 5.2.2), вмикають перемішувальний пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.1) за показником датчика рН 6,0 – 6,1. Через засівну колбу вносять попередньо одержаний посівний матеріал (від ТП 6.4). Вирощування інокуляту проводять за температури 37 °С і безперервної подачі азоту протягом 48 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси, що повинна складати 2,4 – 2,5 г/л (Кт, Км 6.5).

ТП 6.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л

В інокулятор (І-17) об'ємом 100 л із простерилізованою композицією В (від ДР 5.3.3) самоплином подають простерилізовані композиції А (від ДР 5.3.1) і Б (від ДР 5.3.2), вмикають перемішувальний пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.2) за показником датчика рН 6,0 – 6,1. Самоплином подають попередньо одержаний посівний матеріал (від ТП 6.5). Вирощування інокуляту проводять за температури 37 °С і безперервної подачі азоту протягом 48 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси, що повинна складати 2,4 – 2,5 г/л (Кт, Км 6.6).

ТП 6.7. Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 1,25 м³

У посівний апарат (ПА-26) об'ємом 1,25 м³ із простерилізованою композицією В (від ДР 5.4.3) самоплином подають простерилізовані композиції А (від ДР 5.4.1) і Б (від ДР 5.4.2), вмикають перемішувальний пристрій і доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.3) за показником датчика рН 6,0 – 6,1. Через трубу перетискування подають попередньо одержаний посівний матеріал (від ТП 6.6). Вирощування інокуляту проводять за температури 37 °С і безперервної подачі азоту протягом 48 год.

Кожні 4 год з інокулятора відбирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю і визначення концентрації біомаси, що повинна складати 2,4 – 2,5 г/л (Кт, Км 6.7).

ТП 7. Виробничий біосинтез

ТП 7.1. Виробничий біосинтез у ферментаторі об'ємом 10 м³

У попередньо підготовлений ферментер об'ємом 10 м³ (ФР-38) перекачують від УБС-30 відцентровим насосом (Н-31) простерилізовану композицію А (від ДР 5.5.2), вмикають перемішувальний пристрій і самоплином доводять 6%-им розчином NaOH (від ДР 2.2.4) за показником датчика рН 6,0 – 6,1 та за потреби регулюють 6%-им розчином HCl (від ДР 2.1.2). Через трубу перетискування подають попередньо одержаний посівний матеріал (від ТП 6.7). Вирощування інокуляту проводять за температури 37 °С і безперервної подачі азоту протягом 72 год. Через кожні 8 год вносимо порцію підживлювального розчину глюкози концентрацією 5,3 г/л від реактора-змішувача об'ємом 160 л (РЗ-36).

Кожні 4 год та після закінчення біосинтезу здійснюють мікробіологічний контроль, визначення концентрації біомаси (4,8 – 5,0 г/л) і бутанолу (52,0 – 54,3 г/л) у попередньо відібраних пробах культуральної рідини (Кт, Км 7.1). Після цього культуральна рідина перекачується відцентровим насосом (Н-39) у попередньо підготовлений збірник.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ

Постадійний контроль виробництва бутилового спирту здійснюється шляхом відбору проб протягом повного терміну культивування:

- 1) періодично (кожні 4 год);
- 2) наприкінці процесу біосинтезу.

Для цього проводять відбір проб культуральної рідини, посівного матеріалу та поживних середовищ. У таких пробах визначають показники росту і біосинтезу (концентрація біомаси, бутанолу, джерел вуглецю та азоту у середовищі – глюкози та пептону і ацетату амонію відповідно) та здійснюють мікробіологічний контроль шляхом мікроскопіювання або висіву на чашки із середовищами.

7.1. Мікробіологічний контроль

Оскільки продуцент бутанолу – *C. acetobutylicum* MTCC 11274 планується вирощувати у стерильних умовах (див. підрозділ 4.1), необхідною умовою є здійснення мікробіологічного контролю на кожному із зазначених раніше етапах біотехнологічного виробництва бажаного цільового продукту.

Мікробіологічний контроль здійснюється за використання таких методів:

- 1) прямий висів на агаризовані поживні середовища
- 2) експрес-метод: мікроскопіювання.

Перший метод проводять наступним чином. Пробу посівного матеріалу або культуральної рідини розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, із сусло-агаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для дріжджів і грибів. Далі чашки інкубують у термостаті за температури 37 °С (МПА) та 24 – 26 °С (СА або ГКА). Після інкубації чашки візуально розглядають на наявність сторонньої мікрофлори [77].

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ		
Зм.	Арк.	Но.	Підпис	Ла.			
Розробник	Митницька				РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА БУТАНОЛУ	Ліценз.	АнкVIII
Керівник	Скочилька О.						76
Н. контр.							103
Консульт.						Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Стабніков						

У результаті такого аналізу на чашках із висівами не повинно бути виявлено сторонньої мікробіоти, а наявні лише колонії бактеріального штаму *C. acetobutylicum* МТСС 11274. На картопляному середовищі з глюкозою та агаром через 48 годин росту при 37°C в анаеробних умовах бактеріальний штам утворює однорідні, сірувато-білі, непрозорі, з гладкою поверхнею, випуклі, круглі з рівними краями колонії діаметром 0,8–1,0 мм.

Мікроскопіювання здійснюють таким чином. На попередньо підготовлене знежирене предметне скло наносять за використання стерильної бактеріологічної петлі або піпетки краплю суспензії досліджуваного мікроорганізму. Акуратними рухами такий матеріал розподіляють на 1 – 2 см² по центру предметного скла. Отриманий зразок підсушують над вогнем або на повітрі, після чого фіксують за допомогою 1 – 2 крапель метиленового синього. Далі препарат висушують та мікроскопіюють з імерсією при 90х [78].

Клітини бактерій – паличкоподібні, розміщені попарно чи в коротких ланцюжках. У процесі розвитку утворюють довгі ланцюжки, які через годину розпадаються на окремі клітини (рис. 7.1). Розмір молодих вегетативних клітин 0,6–0,7 x 3–5 мкм. Вони мають одну субтермінальну овальну спору, нерухомі, фарбуються за Грамом позитивно [79].

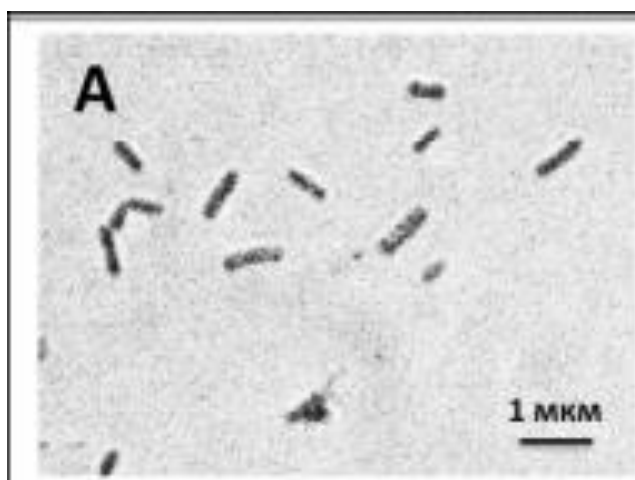


Рис. 7.1. Морфологія клітин *Clostridium acetobutylicum* [79]

7.2. Визначення концентрації біомаси

Концентрація біомаси бактерій у даному проекті визначається спектрофотометрично за показником оптичної густини, із подальшим її переведенням на суху масу відповідно до значень, отриманих у ході побудови калібрувального графіка.

Пробу культуральної рідини об'ємом 1 мл центрифугують при 10000 обертів протягом 10 хвилин при 4°C. Таким чином одержують осад біомаси і супернатант. Потім осад двічі промивають і повторно суспендують у фізіологічному розчині (0,85%, мас./мас. NaCl). Ріст біомаси визначали шляхом вимірювання оптичної густини ресуспендованої біомаси на спектрофотометрі при 600 нм. Перерахунок отриманого результату здійснюють за використання попередньо побудованого калібрувального графіка [80].

7.3. Визначення концентрації бутанолу

Концентрацію одержаного цільового продукту (бутилового спирту) пропонується визначати за використання методу високоефективної рідинної хроматографії.

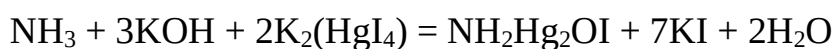
Пробу культуральної рідини об'ємом 1 мл центрифугують при 10000 обертів протягом 10 хвилин при 4°C. Зразок одержаного супернатанту об'ємом 10 мкл пропускають через фільтри із діаметром пор 0,2 мкм та аналізують на високоефективному рідинному хроматографі (HPLC, LC-20AD, Shimadzu, Японія), обладнаному колонкою Rezex ROA (300 × 7,8 мм, Phenomenex, США). Рухома фаза містить 0,005 н H₂SO₄, швидкість потоку становить 0,5 мл · хв⁻¹, а температуру колонки підтримується на рівні 28°C. Як зразок для порівняння (стандарт) використовують бутанол класу ВЕРХ. [80].

7.4. Визначення концентрації карбону (глюкози) і амінного (пептону) та амонійного (ацетат амонію) азоту

Для визначення концентрації глюкози зразок супернатанту (0,5 мл), отриманий після центрифугування (21000 g, 4 °C, 10 хв), фільтрують за

допомогою шприцевого фільтра Whatman Puradisc 4 мм з нейлоною мембраною (GE Healthcare Life Sciences, США) і зберігають при -20 °С для наступних аналізів. Зразок аналізують за допомогою системи HPLC-LS 920LC з детектором розсіювання світла (PL-ELS) (Agilent Technologies, США), оснащеної колонкою Microsorb MV NH₂ (5 мкм, 250 мм × 4,6 мм). MilliQ H₂O (А) і ацетонітрил (В) використовують в якості елюентів зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Температура колонки складає 30 °С. Глюкоза ідентифікується за використання стандарту чистої сполуки [81].

Концентрацію амонійного азоту (ацетату амонію) пропонується визначати за методом Несслера. Обрана нами методика ґрунтується на здатності аміаку та/або іонів амонію взаємодіяти з реактивом Несслера із подальшим утворенням забарвленої в жовто-коричневий колір сполуки. Далі така сполука аналізується за допомогою фотометричного аналізу і перераховується у масові одиниці сухої речовини визначеного компонента в пробі відібраного зразка [82].



У ході проведення аналізу 100 мкл попередньо одержаного супернатанту змішують із 50 мл дистильованої води. Згодом до утвореної таким чином суміші додають 1 мл реагенту Несслера, інкубують (10 хв, 25 °С) та вимірюють густину за допомогою спектрофотометра при 430 нм [83]. Після цього роблять перерахунок на суху масу за допомогою калібрувального графіка.

Концентрацію амінного азоту (пептону) можна визначити шляхом проведення аналізу за методом формольного титрування (метод Соренсена). До попередньо отриманого супернатанту об'ємом 50 мл додають 20 мл формальдегіду. Потім одержаний розчин титрують шляхом обережного додавання краплями 1 моль/л NaOH аби довести рН до заданого рівня (8,5). Аналіз проводять до того моменту, поки забарвлення розчину не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). З об'єму 0,1 моль/л NaOH,

необхідного для досягнення рН 8,5 шляхом титрування, можна отримати концентрацію пептону у мг/л після множення з поправочним коефіцієнтом 28 [84].

Узагальнені дані про проведення постадійного контролю виробництва бутилового спирту *Clostridium acetobutylicum* MTCC 11274 наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю виробництва бутанолу

Номер та назва контрольної точки	Контрольовані об'єкт та показник	Методи і засоби, використовувані для контролю	Порядок проведення контролю та періодичність відбору проб	Нормативне значення контрольованого показника
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1 <i>Приготування робочого розчину «Prima Soft Dez-1»</i>	Робочий розчин «Prima Soft Dez-1» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Наприкінці приготування	C = 0,1%
Кх 1.1.2 <i>Приготування робочого розчину «Мультиклін Аква»</i>	Робочий розчин «Мультиклін Аква» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після закінчення підготовки	C = 2%
Кх 1.1.3 <i>Приготування робочого розчину «DEZALDUM 20»</i>	Робочий розчин «DEZALDUM 20» Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після підготовки	C = 1%
Км 1.2.1 <i>Щоденне прибирання приміщень</i>	Апаратура, підлога Чистота	Шляхом візуального огляду	Після завершення прибирання	Неприсутність бруду і пилу
Км 1.2.2 <i>Здійснення генеральних прибирань</i>	Підлога, стіни, двері, вікна, апаратура Чистота	Шляхом візуального огляду та здійснення мікробіологічного контролю	Наприкінці прибирання	Неприсутність бруду і пилу, КУО<500/см ²

Продовження табл. 7.1

Кт 1.3.1 <i>Проведення миття обладнання</i>	Робочий розчин миючого засобу Концентрація, час і температура миття, чистота	Фізико-хімічний метод, годинник, термометр, візуальний огляд	Концентрація робочого розчину – на початку маніпуляцій, час і температура – безперервно, чистота – після закінчення процесу	$C = 0,1\%$, $C = 2\%$, $t = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 15 - 20\text{ хв}$, відсутність бруду
Кт 1.3.2 <i>Технічний огляд технологічного обладнання</i>	Апаратурні з'єднання Міцність	Перевірка здійснюється візуально	На початку проведення перевірки на герметичність	Неприсутність ущільнень і послаблень
Кт 1.3.3 <i>Здійснення перевірки обладнання на герметичність</i>	Технологічне обладнання Герметичність обладнання, тривалість процесу	Манометр, годинник	Тиск і час – безперервно протягом всього процесу	$P = 0,1 - 0,2\text{ МПа}$, $\tau = 30 - 60\text{ хв}$
Кт 1.3.4 <i>Проведення стерилізації обладнання</i>	Технологічне обладнання Температура, тиск, тривалість процесу	Манометр, термометр, годинник	Контроль усіх показників – безперервно протягом всього процесу	$t = 110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,2\text{ МПа}$, $\tau = 30 - 60\text{ хв}$
Кх 2.1.1, 2.1.2 <i>Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у посівних апаратах на 10 л, 100 л та $1,25\text{ м}^3$ і ферментері на 10 м^3</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація	Фізико-хімічний метод	Після закінчення приготування	$C = 6\%$
Кх, Кт, Км 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 <i>Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища у посівних апаратах на 10 л, 100 л та $1,25\text{ м}^3$</i>	Розчин натрію гідроксиду Концентрація, тиск, час, стерильність	Фізико-хімічний метод, манометр, годинник, мікробіологічний метод	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а концентрація і стерильність – після завершення процесу	$P = 0,15\text{ МПа}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $C = 6\%$, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Кх, Кт, Км 2.2.4 <i>Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища у ферментері на 10 м³</i>	Розчин натрію гідроксиду Концентрація, тиск, час, температура, стерильність	Фізико-хімічний метод, манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний метод	Тиск, температура і тривалість контролюються під час стерилізації, а концентрація і стерильність – після завершення процесу	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, C = 6 %, відсутність мікробіоти
Кт, Км 3.1 <i>Приготування і стерилізація запасного розчину ПАБК і біотину для вирощування інокуляту у колбах на качалках</i>	Розчин вітамінів Тиск, час, асептичність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль здійснюють після завершення процесу	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 4.1 <i>Приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³</i>	Підживлювальний розчин глюкози Концентрація, тиск, час, температура, стерильність	Фізико-хімічний метод, манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються під час стерилізації, а концентрація і стерильність – після завершення процесу	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, C = 40 %, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 5.1.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,1 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1.4 <i>Приготування і стерилізація композиції Г</i>	Композиція Г Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл.7.1

Кт, Км 5.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,1 МПа, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.2.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В Тиск, час, температура, рН, стерильність	Манометр, годинник, датчики температури і рН, мікробіологічний контроль	Тиск, температура, рН і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 100 л</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,1 МПа, t = 121 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 5.3.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В Тиск, час, температура, рН, стерильність	Манометр, годинник, датчики температури і рН, мікробіологічний контроль	Тиск, температура, рН і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 1,25 м³</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,1 МПа, t = 121 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.4.3 <i>Приготування і стерилізація композиції В</i>	Композиція В Тиск, час, температура, рН, стерильність	Манометр, годинник, датчики температури і рН, мікробіологічний контроль	Тиск, температура, рН і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, рН = 4,0 – 4,5, відсутність мікробіоти

Продовження табл. 7.1

Кт, Км 5.5.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 м³</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А в УБС</i>	Композиція А Тиск, час, температура, стерильність	Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль	Тиск, температура і тривалість контролюються під час стерилізації, а мікробіологічний контроль проводять після завершення процесу	P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 5-7 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 6.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>Clostridium acetobutylicum</i> МТСС 11274 Температура, тривалість, мікробіологічна чистота	Холодильник, годинник, мікробіологічний контроль	Температуру контролюють безперервно під час зберігання, мікробіологічний контроль здійснюють кожні 3 – 4 місяці	t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2 <i>Одержання робочої культури</i>	Робоча культура <i>Clostridium acetobutylicum</i> МТСС 11274 на чашках Петрі Температура, час, мікробіологічна чистота	Анаеростат, годинник, мікробіологічний контроль	Температуру і час контролюють безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль здійснюють наприкінці процесу	t = 37 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 <i>Вирощування посівного матеріалу у пробірках на твердому середовищі</i>	Робоча культура <i>Clostridium acetobutylicum</i> МТСС 11274 у пробірках Температура, тривалість, мікробіологічна чистота	Анаеростат, годинник, мікробіологічний контроль	Температуру і час контролюють безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль здійснюють наприкінці процесу	t = 37 °С, τ = 48 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл. 7.1

Кт, Км 6.4 <i>Вирощування інокуляту у колбах на качалках</i>	Посівний матеріал Температура, тривалість, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температуру, час і частоту обертів мішалки контролюють безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль і визначення концентрації біомаси проводять наприкінці процесу	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $w = 200$ об/хв, $C_6 = 2,4 - 2,5$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.5, 6.6, 6.7 <i>Вирощування посівного матеріалу в інокуляторах на 10, 100 л і 1,25 м³</i>	Посівний матеріал Температура, тривалість, рН, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота	Датчик температури і рН, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температуру, час, рН і частоту обертів мішалки контролюють безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль і визначення концентрації біомаси проводять кожні 4 год і наприкінці процесу	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 48$ год, $w = 200$ об/хв, $pH = 6,0 - 6,1$, $C_6 = 2,4 - 2,5$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 7.1 <i>Виробничий біосинтез у ферментаторі об'ємом 10 м³</i>	Культуральна рідина Температура, тривалість, рН, частота обертів мішалки, концентрація біомаси і бутанолу, мікробіологічна чистота	Датчик температури і рН, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль	Температуру, час, рН і частоту обертів мішалки контролюють безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль і визначення концентрації біомаси проводять кожні 4 год і наприкінці процесу	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, $w = 200$ об/хв, $pH = 6,0 - 6,1$, $C_6 = 4,8 - 5,0$ г/л, $C_{\text{цп}} = 52,0 - 54,3$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ У ВИРОБНИЦТВІ БУТИЛОВОГО СПИРТУ

8.1. Можливі місця утворення різних груп відходів під час виробництва бутилового спирту

Як уже зазначалося у попередніх розділах, біосинтез бутилового спирту за використання *S. acetobutylicum* MTCC 11274 включає в себе:

1) етапи допоміжних робіт:

- санітарна підготовка виробництва;
- підготовка титрувальних агентів;
- підготовка запасного розчину вітамінів;
- приготування і стерилізація підживлювального розчину глюкози;
- приготування і стерилізація поживних середовищ.

2) ферментаційні етапи:

- вирощування посівного матеріалу;
- виробничий біосинтез.

На етапі санітарної підготовки виробництва утворюються значні об'єми рідких відходів. У процесі різних видів прибирань приміщень (щоденного та генерального) використовують такі засоби як «Prima Soft Dez-1» і «Dezaldum 20». Миття всього виробничого обладнання здійснюється при застосуванні робочих розчинів «Мультиклін Аква». Утворювані відпрацьовані робочі розчини мийно-дезінфікуючих засобів, промивна вода надходять до каналізації.

Технологією передбачено підготовку розчинів таких титрувальних агентів як 6%-і розчини соляної кислоти і натрію гідроксиду. Кислотний агент необхідний для здійснення стерилізації компонентів поживних середовищ в інокуляторах та посівному апараті (pH 4,0 – 4,5).

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ				
Зм	Арк	№	Підпис	Ла	РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ У ВИРОБНИЦТВІ БУТИЛОВОГО СПИРТУ	Лімен	Анквш	Анквшів	
Розробни		Митишська						81	
Керівник		Скорошська О.					21	183	
Н. контр						Кафедра БТМ			
Консульт									
Зав. каф		Стабніков							

Зазначимо, що вирощування посівного матеріалу та біосинтез бутанолу здійснюється за нейтральних значень (рН 6,0 – 6,1) [26], тому перед такими стадіями вноситься лужний агент. Відходи на даному етапі не враховуються, оскільки утворення рідких відходів можливе лише за умови невідповідності підготовлених розчинів нормативним показникам та рівню асептики.

Під час підготовки запасного та підлужнюючого розчинів, компонентів поживних середовищ, можливе утворення твердих відходів у вигляді пакувальних матеріалів з-під різних типів сировини через невідповідність або повне використання.

Протягом стадій вирощування посівного матеріалу утворення твердих відходів (інокулят) не відбувається, оскільки таких посівний матеріал послідовно направляється від одного апарату до іншого і наприкінці до ферментера. Обраний продуцент бутанолу – бактеріальний штам є анаеробним мікроорганізмом, тому на етапах одержання інокуляту та виробничого біосинтезу безкисневі умови забезпечуються за постійної подачі азоту у відповідні апарати. Тому на таких етапах утворюється велика кількість відпрацьованих газів, зокрема азоту. Рідкі відходи на стадії виробничого біосинтезу не утворюються, оскільки одержана культуральна рідина направляється безпосередньо до спеціального збірника.

8.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

8.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Виробництво бутилового спирту планується проводити протягом 130 днів. Зважаючи на це, кількість щоденних прибирань складатиме 130 разів, а генеральних – близько 5 разів (1 раз на місяць). Як було зазначено у попередньому підрозділі, миття всього виробничого обладнання здійснюється при застосуванні робочих розчинів «Мультиклін Аква» (2%), а виробничих приміщень – за допомогою «Prima Soft Dez-1» (0,1%) і «Dezaldum 20» (1%). Об'єми, необхідні для проведення санітарної підготовки, таких розчинів зазначено у табл. 8.1.

Характеристика рідких відходів від виробництва бутанолу

Назва відходів	Сполуки-складові рідких відходів	Утворювані об'єми за 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
2% розчин «Мультиклін Аква»	алкілдиметилбензиламоній хлорид; дидецилдиметиламоній хлорид; глутаровий альдегід; ізопропіловий спирт полігексаметиленбігуанідин гідрохлорид. Допоміжні речовини: вода очищена та ін.	120	II
0,1% розчин «Prima Soft Dez-1»	вода, гіпохлорид натрію, гідроксид натрію, 5-15% неіоногенні ПАР, глюконат натрію	120	III
1% «Dezaldum 20»	вода підготовлена; >15% бензалконію хлорид; > 10 % глутаровий альдегід, ізопропіловий спирт; н-ПАР, регулятор кислотності, комплексоутворювач.	130	III
	Усього:	370	

Біологічне очищення стічних вод проводиться таким чином. В корпус 1 пристрою стічна вода подається по трубопроводу 12 в секцію біофлокуляції-флотації 3. В секцію біофлокуляції-флотації також подається робоча рідина із стисненим повітрям по трубопроводу 21, та надлишковий активний мул трубопроводом 10. Надлишковий активний мул сорбує своєю поверхнею стічні води, далі захоплюється бульбашками повітря, що інтенсивно вивільняються із робочої рідини, та виноситься у флотаційний шлам секції біофлокуляції-флотації 3. Із зони розділення в секції біофлокуляції-флотації 3, що відокремлена похилою перегородкою-екраном 4 від зони змішування, стічна вода відводиться по трубопроводу 15 в секцію аноксидного очищення стічних вод 5, а флотаційний шлам, через отвори 16 у вертикальній перегородці 2, надходить у секцію аноксидної обробки флотаційного шламу 6.

Обробка флотаційного шламу із високими концентраціями поверхнево-активних речовин, що сорбовані надлишковим активним мулом, проводиться в аноксидних умовах, що призводить до руйнування молекул поверхнево-

активних речовин факультативними мікроорганізмами, які містяться в надлишковому активному мулі, шляхом споживання ними кисню, який входить до гідрофільної частини поверхнево-активних речовин з наступною рекомбінацією їх залишкових конформацій вуглеводневого ланцюжку гідрофобної частини поверхнево-активних речовин в сполуки, які є органічним субстратом для аеробних автотрофів та гетеротрофів [85].

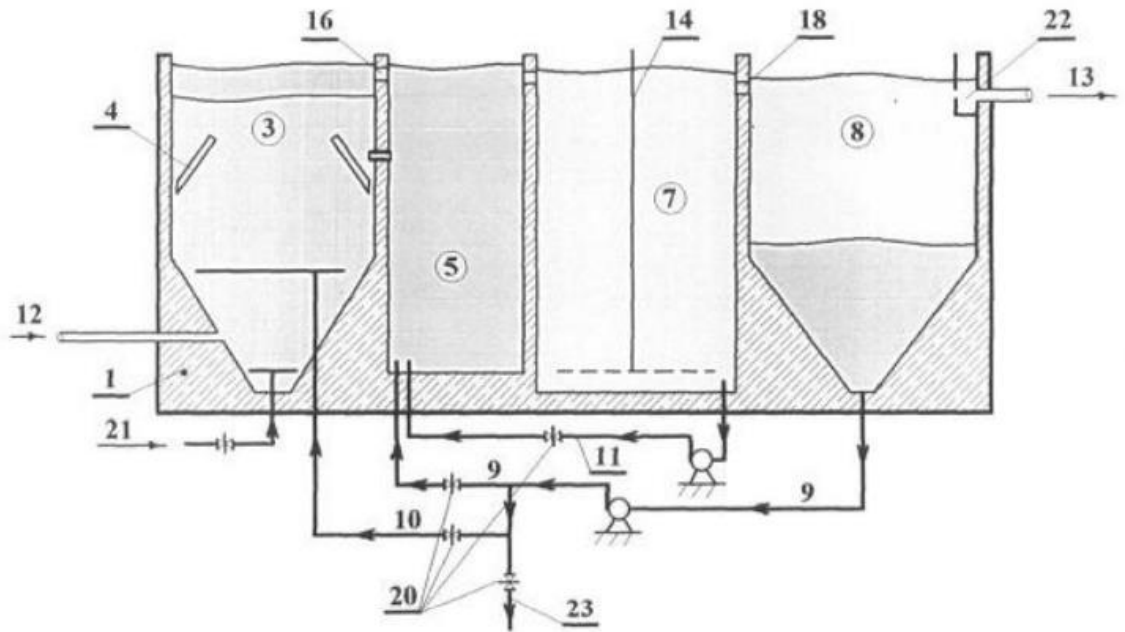


Рис. 8.1. Схематичне зображення установки біологічного очищення стічних вод [85]

Продукти аноксидної обробки флотаційного шламу, через отвір 17 в вертикальній перегородці 2, надходять до секції аеробного очищення стічних вод 6 аеротенка, що забезпечує аеробні 5 автотрофи та гетеротрофи активного мулу необхідним органічним субстратом для підтримання їх життєдіяльності, підтримання біомаси факультативних мікроорганізмів в активному мулі. У стічній воді, що надійшла в секцію аноксидного очищення стічних вод, відбуваються процеси біологічного руйнування частки поверхнево-активних речовин, що не сорбувалися надлишковим активним мулом в секції біофлотації-флотації, факультативними анаеробами та процеси денітрифікації, необхідна кількість нітратів та нітритів для яких

забезпечується рециркуляцією мулової суміші по трубопроводу 11 за допомогою рециркуляційного насоса 19.

Регулювання об'єму рециркуляції мулової суміші проводять за допомогою запірнорегулювальної арматури 20, що влаштована на трубопроводі рециркуляції мулової суміші 11. Аноксидна обробка стічних вод сприяє глибокому очищенню стічних вод від поверхнево -активних речовин.

Мулова суміш після секції аноксидного очищення стічних вод надходить через отвори 18 до секції аеробного очищення стічних вод. В секції аеробного очищення стічних вод 7 аеротенка відбувається інтенсивне окиснення мікроорганізмами, в аеробних умовах, органічних забруднень стічних вод. Для забезпечення життєдіяльності аеробних мікроорганізмів киснем повітря секція аеробного очищення стічних вод 7 обладнана аераційною системою 14. Повітря, що подається системою аерації 14, також підтримує мулову суміш в зваженому стані та рівномірно розподіленою по об'єму секції аеробного очищення в аеротенку. Мулова суміш надходить через отвори 18 із зони аеробного очищення стічних вод 7 в зону вторинного відстоювання 8, розділяється на активний мул і очищену стічну воду. Очищена стічна вода збирається збірним лотком 22, та відводиться за межі пристрою трубопроводом 13 [85].

8.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Даний тип відходів утворюється під час санітарної підготовки виробництва та підготовки поживних середовищ (пакувальні тари із пропілену, поліетилену та полівінілхлориду). Такі матеріали можливо утилізувати за наступною корисною моделлю. Суть корисної моделі пояснюється кресленням, де зображена схема знезараження, сушіння і охолодження відходів:

- 1 – термокамера;
- 2 – підігрівач;
- 3 – парогенератор;

- 4 - рециркуляційний вентилятор;
- 5 - знімна покрівля;
- 6 - фільтр осушення повітря з поглиначем газів;
- 7 - система розподільних клапанів;
- 8 - гільза для встановлення датчиків.

Спосіб виконують наступним чином: відходи, з яких попередньо вилучають негабаритні включення, завантажують пошарово в термокамеру 1 та дозовано пересипають негашеним вапном, а потім з підігрівача 2 подають підігріте повітря, яке за потреби, для проходження реакції гашення вапна та перенесення лугу в об'ємі відходів термокамери, зволожують водяною парою з парогенератора 3. Процес знезараження, сушіння, охолодження триває від 3 до 5 діб в залежності від пори року, вмісту харчових відходів та інших органічних речовин, які легко розкладаються [86].

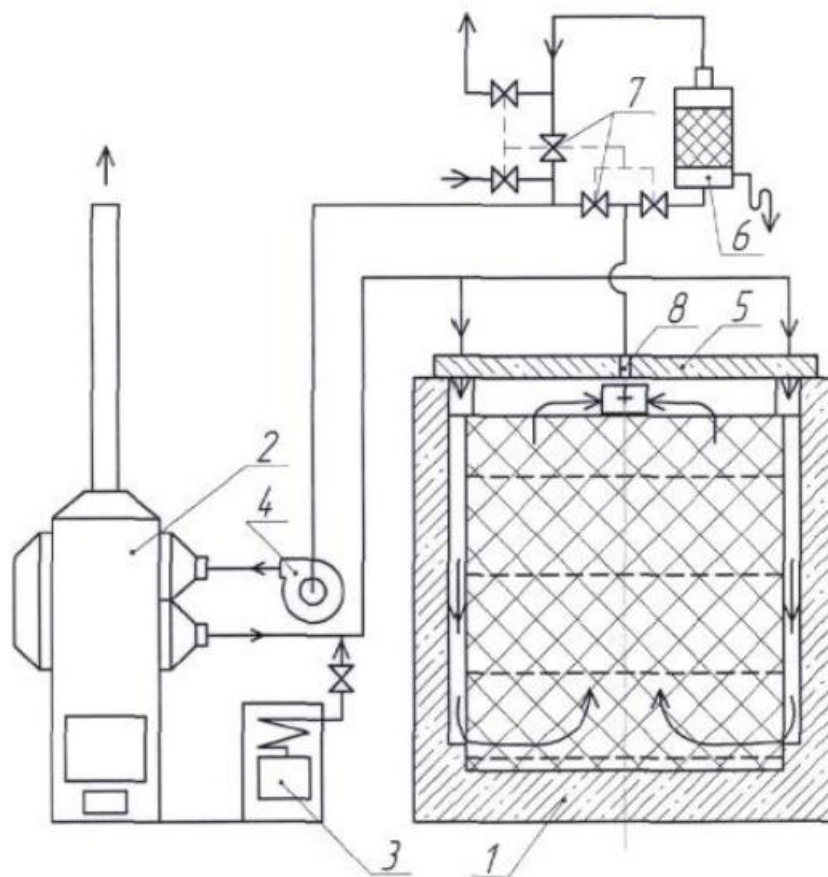


Рис. 8.2. Система знезараження, сушіння та охолодження твердих відходів [86]

Для полегшення доступу до термокамери 1 передбачена знімна покрівля 5. Крім цього, у способі передбачається використання фільтру 6 для осушення повітря і поглинання газів з відпрацьованого повітря та системи розподільних клапанів 7, які автоматично, за заданою програмою з використанням датчиків, встановлених у гільзі 8, підтримують тепловий та вологий режим в термокамері 1. Знезаражені, висушені і охолоджені відходи з термокамери 1 вивантажують для подальшого сортування [86].

8.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів

Газоподібні відходи виробництва бутанолу включають в себе відпрацьований азот, а також аерозоль бактеріального продуценту. Тривалість етапів одержання інокуляту складає 144 год, що водночас дорівнює 8640 хвилинам, а час, необхідний для виробничого біосинтезу органічного спирту становить 72 год, тобто 4320 хв. Слід врахувати, що вищеописані процеси проводяться за постійного продування азотом в анаеробних умовах, за швидкості потоку 1 л / (1 л КР · хв). Зважаючи на те, що у виробничому приміщенні попередньо встановлені 2 інокулятори об'ємами 10 і 100 л, посівний апарат на 1,25 м² та ферментер об'ємом 10 м³, приблизний об'єм відпрацьованих газів становить: $10 \cdot 2880 + 100 \cdot 2880 + 1250 \cdot 2880 + 10\,000 \cdot 4320 = 316\,800 + 3\,600\,000 + 43\,200\,000 = 47\,116\,800$ л, тобто 47 116,8 м³.

Очищення відпрацьованих газів, у складі яких наявний азот, пропонується здійснювати наступним шляхом, у 2 стадії. На першій стадії вихідну газову суміш з резервуару 1 пропускають крізь циліндричний роздільник 2 з адсорбентом і відділяють від діоксиду вуглецю і вуглеводневих газів, використовуючи циліндричний роздільник 3 з адсорбентом в режимі регенерації. Після першої стадії суміш метану, оксиду вуглецю, азоту і водню направляють у циліндричний роздільник 4. На другій стадії здійснюють комбіноване розділення суміші газів після першої стадії - фронтальне розділення, що передбачає заповнення циліндричного роздільника 4 з адсорбентом воднем з резервуару 5, а потім - пропускання

суміші газів з отриманням на виході послідовно водню, суміші водню і азоту та суміші водню, азоту і метану, і витискувальне розділення шляхом пропускання крізь той же циліндричний роздільник 4 з адсорбентом метану з резервуару 8 до появи на виході чистого метану та скидання тиску до атмосферного для виділення адсорбованого метану.

Суміш метану, оксиду вуглецю, азоту і водню, яка виходить із циліндричного роздільника 4 при витисненні метаном із резервуару 8 повертається в циліндричний роздільник. На третій стадії здійснюють відділення решти 4. компонентів від водню та один від одного шляхом пропускання крізь циліндричний роздільник 9 з адсорбентом суміші водню з азотом з використанням азоту для витискувального розділення із резервуару 10 та пропусканні суміші водню з азотом і оксидом вуглецю крізь циліндричний роздільник 11 з використанням оксиду вуглецю для витискувального розділення із резервуару 12. Суміш водню з азотом, яка виходить із роздільника 9 при витисненні азотом і з роздільника 11 при пропусканні суміші водню з азотом і оксидом вуглецю повертається в резервуар 6 для азоту і водню. Суміш водню з азотом і оксидом вуглецю, яка виходить із роздільника 11 при витисненні оксидом вуглецю з резервуару 12, повертається в резервуар 7 для суміші водню з азотом і оксидом вуглецю [87].

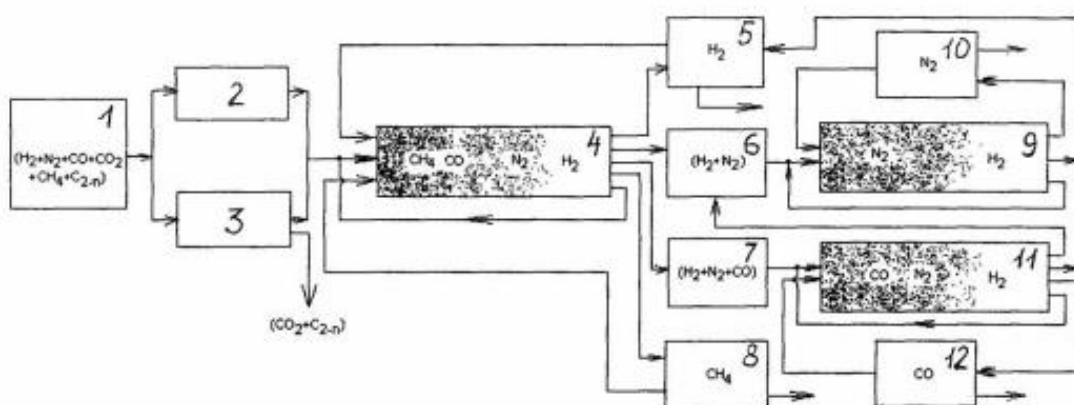


Рис. 8.3. Схематичне зображення установки для очищення газової суміші [87]

Список використаної літератури

1. Outram V., Lalander C. A., Lee J. G., Davies E. T., Harvey A. P. Applied in situ product recovery in ABE fermentation. *Biotechnology Progress*. 2017, 33 (3): 563-579. doi: 10.1002/btpr.2446.
2. Kongjan P., Tohlang N., Khaonuan S., Cheirsilp B., Jariyaboon R. Characterization of the integrated gas stripping-condensation process for organic solvent removal from model acetone-butanol-ethanol aqueous solution. *Biochemical Engineering Journal*. 2022, 182: 108437. doi: 10.1016/j.bej.2022.108437.
3. Kujawska A., Kujawski J., Bryjak M., Kujawski W. ABE fermentation products recovery methods—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 48: 648 – 661. doi: 10.1016/j.rser.2015.04.028.
4. Jin C., Yao M., Liu H., Lee C. F., Ji J. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2011, 15 (8): 4080 – 4106. doi: 10.1016/j.rser.2011.06.001.
5. Al-Shorgani N. K. N., Al-Tabib A. I., Kadier A., Zamil M. F., Lee K. M., Kalil M. S. Continuous Butanol Fermentation of Dilute Acid-Pretreated De-oiled Rice Bran by *Clostridium acetobutylicum* YM1. *Scientific Reports*. 2019, 9 (1): 4622. doi:10.1038/s41598-019-40840-y.
6. 1-Butanol. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/263#section=Computed-Properties>.
7. N-BUTYL ALCOHOL (N-BUTANOL). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.osha.gov/chemicaldata/490>.
8. N-BUTYL ALCOHOL. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/277>.
9. Segal D., Bale A. S., Phillips L. J. Issues in assessing the health risks of n-butanol. *J Appl Toxicol*. 2020, 40: 72 – 86. doi: 10.1002/jat.3820.

					НУХТ БТЕК 05.01.23 КР ПЗ СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ		
Зм	Арк	№	Підпис	Ла			
Розробник	Митницька				СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	Лімен	Анквн
Керівник	Скрипська О						89
Н. контр							102
Консульт						Кафедра БТМ	
Зав. каф.	Стабніков						

10. Haynes W. M. CRC handbook of chemistry and physics. 94th Edition. CRC press. 2013 – 2014, 3 – 78.
11. Ndaba B., Chiyanzu I., Marx S. n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. *Biotechnology Reports*. 2015, 8: 1 – 9. doi: 10.1016/j.btre.2015.08.001.
12. Azambuja S. P. H., Goldbeck R. Butanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: perspectives, strategies and challenges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020, 36 (3). doi: 10.1007/s11274-020-02828-z.
13. García V., Pääkilä J., Ojamo H., Muurinen E., Keiski R. L. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2011, 15 (2): 964 – 980. doi: 10.1016/j.rser.2010.11.008.
14. Zverlov V. V., Berezina O., Velikodvorskaya G. A., Schwarz W. H. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 71 (5): 587 – 597. doi: 10.1007/s00253-006-0445-z.
15. Kuroda K., Ueda M. Cellular and molecular engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biobutanol production. *FEMS Microbiology Letters*. 2016, 363 (3). doi: 10.1093/femsle/fnv247.
16. N-BUTYL ALCOHOL. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/48>.
17. Beedessee G., Ramanjooloo A., Aubert G., Eloy L., Surnam-Boodhun R., Van Soest R. W., Marie D. E. Cytotoxic activities of hexane, ethyl acetate and butanol extracts of marine sponges from Mauritian Waters on human cancer cell lines. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2012, 34 (2): 397 – 408. doi: 10.1016/j.etap.2012.05.013.
18. Bunc M., Pezdir T., Možina H., Možina M., Brvar M. Butanol ingestion in an airport hangar. *Human & experimental toxicology*. 2006, 25 (4): 195 – 197. doi: 10.1191/0960327106ht607oa.
19. O'Neil M. J. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: *Royal Society of Chemistry*. 2013, 272.

20. Mahapatra M. K., Kumar A. A short review on biobutanol, a second generation biofuel production from lignocellulosic biomass. *J Clean Energy Technol.* 2017, 5 (1): 27 – 30. doi: 10.18178/jocet.2017.5.1.338.
21. Mascal M. Chemicals from biobutanol: technologies and markets. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 2012, 6 (4): 483 – 493. doi: 10.1002/bbb.1328.
22. Poehlein A., Solano J. D. M., Flitsch S. K., Krabben P., Winzer K., Reid S. J., Dürre P. Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. *Biotechnology for Biofuels.* 2017, 10 (1). doi: 10.1186/s13068-017-0742-z.
23. Chen C.-T., Liao J. C. Frontiers in microbial 1-butanol and isobutanol production. *FEMS Microbiology Letters.* 2016, 363 (5): fnw020. doi: 10.1093/femsle/fnw020.
24. Lan E. I., Liao J. C. Microbial synthesis of n-butanol, isobutanol, and other higher alcohols from diverse resources. *Bioresource Technology.* 2013, 135: 339 – 349. doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.104.
25. Jiang Y., Zhang T., Lu J., Dürre P., Zhang W., Dong W., Xin F. Microbial co-culturing systems: butanol production from organic wastes through consolidated bioprocessing. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2018, 102 (13): 5419–5425. doi: 10.1007/s00253-018-8970-0.
26. Ahlawat S., Kaushal M., Palabhanvi B., Muthuraj M., Goswami G., Das D. Nutrient modulation based process engineering strategy for improved butanol production from *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Progress.* 2018, e2771. doi: 10.1002/btpr.2771.
27. Jiang M., Chen J., He A., Wu H., Kong X., Liu J., Chen P. Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. *Process Biochemistry.* 2014, 49 (8): 1238 – 1244. doi: 10.1016/j.procbio.2014.04.017.
28. Li S.-B., Qian Y., Liang Z.-W., Guo Y., Zhao M.-M., Pang Z.-W. Enhanced butanol production from cassava with *Clostridium acetobutylicum* by genome shuffling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2016, 32 (4). doi: 10.1007/s11274-016-2022-7.

29. Al-Shorgani N. K. N., Shukor H., Abdeslahian P., Kalil M. S., Yusoff W. M. W., Hamid A. A. Enhanced butanol production by optimization of medium parameters using *Clostridium acetobutylicum* YM1. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016, 25 (7): 1308 – 1321. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.017.
30. Janssen H., Wang Y., Blaschek H. P. M. *Clostridium: Clostridium acetobutylicum*. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. 2014, 449-457. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00070-7.
31. Zhang H., Yang P., Wang Z., Li M., Zhang J., Liu D., Ying H. *Clostridium acetobutylicum* biofilm: advances in understanding the basis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, 459. doi: 10.3389/fbioe.2021.658568.
32. Bi C., Jones S. W., Hess D. R., Tracy B. P., Papoutsakis E. T. SpoIIIE Is Necessary for Asymmetric Division, Sporulation, and Expression of F, E, and G but Does Not Control Solvent Production in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology*. 2011, 193 (19): 5130-7. doi: 10.1128/JB.05474-11.
33. Buakhiaw B., Sanguanchaipaiwong, V. Effect of media on acetone-butanol-ethanol fermentation by isolated *Clostridium* spp. *Energy Procedia*. 2017, 138: 864 – 869. doi: 10.1016/j.egypro.2017.10.104.
34. *Clostridium acetobutylicum*. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=1419.
35. *Clostridium acetobutylicum*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/2529>.
36. Tomasik P., Horton D. Enzymatic conversions of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 2012, 59 – 436. doi: 10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4.
37. Herman N. A., Kim S. J., Li J. S., Cai W., Koshino H., Zhang W. The industrial anaerobe *Clostridium acetobutylicum* uses polyketides to regulate cellular differentiation. *Nature communications*. 2017, 8 (1): 1514. doi: 10.1186/s13068-018-1316-4.
38. Haus S., Jabbari S., Millat T., Janssen H., Fischer R. J., Bahl H., Wolkenhauer O. A systems biology approach to investigate the effect of pH-induced gene

regulation on solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *BMC systems biology*. 2011, 5, 1-13. doi: 10.1186/1752-0509-5-10.

39. *Clostridium acetobutylicum*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1488&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.

40. Zhao J., Lu C., Chen C.-C., Yang S.-T. Biological Production of Butanol and Higher Alcohols. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. 2013, 235 – 262. doi: 10.1002/9781118642047.ch13.

41. Bao T., Feng J., Jiang W., Fu H., Wang J., Yang S.-T. Recent advances in n-butanol and butyrate production using engineered *Clostridium tyrobutyricum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020, 36 (9). doi: 10.1007/s11274-020-02914-2.

42. What Is N-Butanol? [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://ecolink.com/info/what-is-n-butanol/>.

43. Birgen C., Dürre P., Preisig H. A., Wentzel A. Butanol production from lignocellulosic biomass: revisiting fermentation performance indicators with exploratory data analysis. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12 (1). doi: 10.1186/s13068-019-1508-6.

44. Gwalwanshi M., Kumar R., Chauhan M. K. A review on butanol properties, production and its application in internal combustion engines. *Materials Today: Proceedings*. 2022, 62: 6573-6577. doi: 10.1016/j.matpr.2022.04.573.

45. What is N-Butanol? [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.solventis.net/products/alcohols/n-butanol/#:~:text=1%2DButanol%20can%20be%20used,waxes%2C%20rubber%2C%20and%20plasticizers>.

46. Butyl Alcohol. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.drugs.com/inactive/butyl-alcohol-449.html>.

47. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?cac00010.
48. Citrate cycle (TCA cycle) - *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/cac00020>.
49. Butanoate metabolism - *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?cac00650.
50. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.
51. Дезінфікуючий засіб «SOPUROXID 15». [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://b2f.org.ua/myuchi-prom/dezinfikuyuchij-zasib-sopuroxid-15>.
52. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
53. Проскуріна В. О., Панчева Г. М., Пилипенко О. І. Ризики використання синтетичних миючих засобів. *Екологічна безпека держави*. 2017, 73 – 74.
54. Дезінфікуючий миючий засіб з активним хлором, концентрат DEZ-1, 12кг. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://primaterra.ua/ua/p320339370-dezinfitsiruyuschee-moyuschee-sredstvo.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjwkNOpBhBEEiwAb3MvvYAV5zKxopW0MEHUWwZOlkHSAdaNsBGOXG9yLeG2OA4ywPKhrFIv3RoCKt0QAvD_BwE.
55. Концентрат для дезінфекції primaterra SOFT DEZ-1 (1,1кг). [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://primaterra.ua/ua/p219958749-kontsentrat-dlya-dezinfeksii.html>.
56. Комплексний миючо-дезінфікуючий засіб Мультиклін Аква. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kyiv.prom.ua/ua/p1731236804-kompleksnoe-moyusche-dezinfitsiruyuschee.html?&primelead=M4xNQ>.

57. Засіб дезінфікуючий для поверхонь DEZALDUM 20 5л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://atma.ua/profesijna-himiya/dezynfektsiya/zasib-dezinfikuyuchyj-dlya-poverhon-dezaldum-20-5l-da015000/>.
58. Dezaldum20 Методичні рекомендації. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://atma.ua/pdf/?id=183>.
59. Сучасні дезінфекційні засоби. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.oblses.ck.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=3411:suchasni-dezinfektsiini-zasoby&catid=96:2021-11-16-08-06-24&Itemid=114.
60. Апарати сталі емальовані з механічним змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_email_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php.
61. BGWHB 50-160 (12,5/32), 3kW, 2880, Ex - насос нержавіючий горизонтальний. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pumpcentre.com.ua/bgwhb-50-160-12532-3kw-2880-ex-nasos-nergaveyuschij-gorizontalnyj/>.
62. 5L Vacuum Filter Jacketed Glass Vessel Stirred Reactor. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://eshop.lab1st.com/products/5l-vacuum-filter-jacketed-glass-vessel-stirred-reactor>.
63. Корпусні фільтри Spin-On від NEW FILTER. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/hydraulic/korpusni-filtri-gidravliki-spin-on.html>.
64. CATALOG-Bioreactor-System-Innova. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://blanc-labo.fr/wp-content/uploads/2017/11/CATALOG-Bioreactor-System-Innova-2016.pdf>.
65. Дозатор для сипучих продуктів NPF-3000-201 Hualian. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://cicada.in.ua/dozator-dlya-sipuchih-produktiv-npf-3000-201-hualian>.
66. BZ 50-160/7,5 відцентровий моноблочний КАС насос із нержавіючої сталі. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pumpcentre.com.ua/bz->

50-16075-tsentrobegnyj-monoblochnyj-kas-nasos-iz-nergaveyuschej-stali/?gclid=CjwKCAiA9ourBhAVEiwA3L5RFqamoSiLpT5w-SOVXYwQg1h-Ir4Kt3CvixqmdymS6xdzvlnW7UZRvRoCQSSQAvD_BwE.

67. Pfaudler DIN AE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/A_Pfaudler-DIN-AE-Reactors-622-4E.pdf.

68. Ваговий дозатор для сипучих 1-50 кг ВД-4. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1155858084-vesovoj-dozator-dlya.html?&primelead=My42>.

69. Хімічний реактор 400 litros acero inoxidable 316 con serpentín interior. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://machineryline-tm.com/-/prodazha/himicheskie-reaktory/REACTOR-400-LITROS-ACERO-INOXIDABLE-316-CON-SERPENTIN-INTERIOR--23040417460913165600>.

70. Реактор 1300 літрів. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://energoprom.in.ua/ua/p1151925671-reaktor-1300-litriv.html>.

71. Reactor tank 10,000 L RDS Inox. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.camargoindustrial.com/used-machine/?e=Reactor+tank+10.000+L+RDS+Inox_636-207.

72. 20L Chemical Lab Jacketed Glass Reactor Vessel with Digital Display for Laboratory Reaction. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://eshop.lab1st.com/products/20l-chemical-lab-jacketed-glass-reactor-vessel-with-digital-display-for-laboratory-reaction?variant=44940200149287>.

73. Дозатор для сипучих продуктів FZ-1000 Hualian. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://cicada.in.ua/dozator-dlya-sipuchih-produktiv-fz-1000-hualian>.

74. Ваговий дозатор ФС-125. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://mlunok.com.ua/uk/vagovij-dozator-fs-125.html>.

75. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.pfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.

76. *Clostridium acetobutylicum*. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_number?JCM=1419.
77. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
78. Пирог Т. П., Антонюк М. М., Ігнатенко С. В. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, С. В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.
79. Скроцький С. О., Хоменко Л. А., Войчук С. І., Підгорський В. С. Особливості росту та біосинтетична активність сольвентогенних бактерій роду *Clostridium*. *Мікробіологічний журнал*. 2018, 80 (2): 3-13.
80. Kaushal M., Ahlawat S., Mukherjee M., Muthuraj M., Goswami G., Das D. Substrate dependent modulation of butanol to ethanol ratio in non-acetone forming *Clostridium sporogenes* NCIM 2918. *Bioresource technology*. 2017, 225: 349-358. doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.059.
81. Dvořák P., de Lorenzo V. Refactoring the upper sugar metabolism of *Pseudomonas putida* for co-utilization of cellobiose, xylose, and glucose. *Metabolic Engineering*. 2018, 48: 94 – 108. doi: 10.1016/j.ymben.2018.05.019.
82. Jeong H., Park J., Kim H. Determination of NH_4^+ in Environmental Water with Interfering Substances Using the Modified Nessler Method. *Journal of Chemistry*, 2013, 1 – 9. doi: 10.1155/2013/359217.
83. Malek R., Bonnarme P., Irlinger F., Frey-Klett P., Onésime D. Transcriptomic response of *Debaryomyces hansenii* during mixed culture in a liquid model cheese medium with *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 264: 53–62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.026.
84. Schnierda T., Bauer F. F., Divol B., van Rensburg E., Görgens J. F. Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production

using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology*. 2014, 58 (5): 478–485. doi: 10.1111/lam.12217.

85. Патент України на корисну модель № 113122. Спосіб біологічного очищення стічних вод від поверхнево-активних речовин / Россінський В. М., Саблій Л. А., Жукова В. С., Россінський Р. М. Опубл. 12.12.2016, Бюл. № 23.

86. Патент України на корисну модель № 120898. Спосіб знезараження та утилізації несорттованих твердих побутових відходів / Євдокименко О. М., Удовенко А. С., Євдокименко В. О. 27.11.2017, Бюл. № 22.

87. Патент України на корисну модель № 82940. Спосіб розділення газових сумішей / Сухін Є. І., Рудович І. М., Яремов П. С., Ільїн В. Г. Опубл. 26.05.2008, Бюл. № 10.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Table 1. Comparison of biomass and butanol productivity from *C. acetobutylicum* MTCC 11274 grown in un-optimized media and CCD-RSM based optimized media composition

Media component (g L ⁻¹)	Un-optimized media	Media optimized for biomass productivity	Media optimized for butanol productivity
Glucose	80	33.11	82.04
Peptone	40	21.12	49.66
K ₂ HPO ₄	0.5	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	0.36	0.46
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.01	0.018	0.023
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.018	0.023
NaCl	0.01	0.018	0.023
PABA	0.01	0.01	0.01
Biotin	0.01	0.01	0.01
Ammonium acetate	2.2	2.2	2.2
Biomass productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.135	0.28	ND
Butanol productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.22	ND	0.36
Percentage of increase in biomass productivity ^a	ND	103.5	ND
Percentage of increase in butanol productivity ^a	ND	ND	63.6

ND, Not determined.

^aRepresents the percentage increase of the biomass and butanol productivity in the optimized medium as compared to the un-optimized medium under flask conditions.

Table 2. Comparison of butanol titer and productivity by *Clostridium* sp. using calcium carbonate as inducer without product recovery

Organism	Substrate	CaCO ₃ (g L ⁻¹)	Mode	Butanol productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Butanol titer (g L ⁻¹)	Reference
<i>C. acetobutylicum</i> MTCC 11274	Glucose	5	Fed batch – Mg-Ca	0.59	16.5	This study
<i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461	Sweet sorghum juice	7	Batch	0.43	15.46	³⁰
<i>C. acetobutylicum</i> L7 (adapted ATCC 824)	Glucose	4	Batch – (Zn-Ca)	0.4	16.1	³
<i>C. acetobutylicum</i> L7 (A)	Glucose	4	Batch	0.36	14.4	³
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucose	4	Batch	0.31	14.78	³¹
<i>C. beijerinckii</i> P260	Glucose	4	Batch	0.29	13.89	³¹
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	Glucose	4	Batch	0.27	16.3	²⁸
<i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	Glucose	4	Batch	0.27	13	³²
<i>Clostridium</i> sp. BOH3	Cassava starch	1	Batch- (Ca-tryptophan)	0.25	17.8	¹⁷
<i>Clostridium</i> sp. BOH3	Cassava starch	1	Batch	0.16	11.8	¹⁷
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucose	5	Batch	0.15	10.8	³³
<i>Clostridium</i> sp. strain HN4	Food waste	3	Batch	0.12	17.64	³⁴
<i>C. acetobutylicum</i> CH02 (A)	Glucose	4	Batch	0.076	8	²⁷
<i>C. sporogenes</i> BE01	Rice straw hydrolysate	10	Batch	0.05	~5	³⁵

