

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)

« » лютого 2024р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ

(підпис) (ім'я та прізвище)

« » лютого 2024р.

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 оцтової кислоти *Acetobacter* *syboxydans*»

Виконала: здобувачка 5 курсу, групи 1

ЧЕРНЕЦЬКА Олександр Юліанівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КАРЛАШ Юрій Васильович
(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 СТОЙКО Вікторія
(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

ЧЕРНЕЦЬКОЇ Олександрі Юліанівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез оцтової кислоти *Acetobacter*
oxydans

керівник роботи КАРЛАШ Юрій Васильович, доц., к. т. н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 31 січня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Acetobacter pasteurianus*, цільовий продукт: лимонна кислота, об'єм ферментера 6,3 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

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

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва оцтової кислоти – 2 аркуші формату А1

Апаратурна схема виробництва оцтової кислоти – 1 аркуш 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 оцтової кислоти	06.11.2023 – 10.11.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика продуцента оцтової кислоти	11.11.2023 – 16.11.2023	
3	Техніко-економічне обґрунтування оцтової кислоти	17.11.2023 – 25.11.2023	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми виробництва оцтової кислоти	26.12.2023 – 02.01.2024	
5	Оцтова кислота. Специфікація необхідного обладнання	03.01.2024 – 09.01.2024	
6	Опис технологічної схеми виробництва оцтової кислоти	09.01.2024 – 14.01.2024	
7	Контроль виробництва оцтової кислоти	15.01.2024 – 19.01.2024	
8	Охорона довкілля	20.01.2024 – 22.01.2024	
9	Оформлення пояснювальної записки	23.01.2024 – 25.01.2024	
10	Виконання графічної частини проекту	26.01.2024 – 31.01.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Олександра ЧЕРНЕЦЬКА
(ім'я та прізвище)

Юрій КАРЛАШ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Створена кваліфікаційна робота присвячена розробці ділянки виробничого біосинтезу оцтової кислоти при культивуванні бактеріального штаму *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02. У загальному обсязі робота складається із вступу, п'яти розділів, графічної частини (технологічна схема, що представлена на 2 аркуші формату А1 і апаратурна схема на 1 аркуші формату А1) та списку використаних джерел із 94 найменувань. Загальний об'єм текстової частини – 102 сторінки, 9 рисунків, 15 таблиць, 3 креслення формату А1.

Для написання вступу було проведено детальний пошук та аналіз сучасної літератури про органічні кислоти, їх функціональне використання та переваги біотехнологічного синтезу. У процесі роботи було обґрунтовано використання мутованого бактеріального штаму *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02, який володіє найвищою продуктивністю оцтової кислоти, досягаючи значення 92,04 г/л. Були розглянуті його переваги і потенціал у виробництві такого цільового продукту.

Технологічна схема виробництва оцтової кислоти включає в себе етапи допоміжних робіт (санітарну підготовку виробництва, підготовку стерильного повітря, приготування і стерилізацію розчинів титрувальних агентів, підготовку компонентів поживних середовищ) та технологічного процесу (підготовку культури, п'ять стадій одержання посівного матеріалу та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м³ із коефіцієнтом заповнення 0,6. Також у ході написання роботи було систематизовано карту постадійного контролю та здійснено підбір оптимальних методик для проведення контролю виробництва оцтової кислоти.

Ключові слова: оцтова кислота, етанол, *Acetobacter pasteurianus*, біосинтез, ацетогенні бактерії.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ	9
1.1. Фізико-хімічні властивості оцтової кислоти	9
1.2. Хімічний синтез оцтової кислоти	10
1.3. Особливості біотехнологічного одержання	12
1.4. Сфери використання оцтової кислоти	13
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ	15
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента	15
2.2. Морфолого-культуральні ознаки <i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003- 02	20
2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003-02	22
2.4. Таксономічний статус <i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003-02	22
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ	23
3.1. Потреба в оцтовій кислоті	23
3.2. Розрахунок потужності біотехнологічного виробництва органічної кислоти	25
3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера для одержання оцтової кислоти	26
3.4. Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу	28
3.5. Схема біотрансформації етанолу в оцтову кислоту	31
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ	35
4.1. Обґрунтування вибору умов культивування <i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003-02 та типу ферментера	35

4.2. Обґрунтування стадій підготовки стерильного аераційного повітря...	36
4.3. Вибір дезінфікуючих та мийних засобів для виробництва оцтової кислоти	38
4.4. Обґрунтування способу приготування та стерилізації компонентів поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу оцтової кислоти	44
РОЗДІЛ 5. ОЦТОВА КИСЛОТА. СПЕЦИФІКАЦІЯ НЕОБХІДНОГО ОБЛАДНАННЯ	48
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ.....	52
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ.....	68
7.1. Мікробіологічний контроль виробництва	68
7.2. Визначення концентрації джерел карбону (етанол і глюкоза) та азоту (дріжджовий екстракт).....	69
7.3. Визначення концентрації клітин	71
7.4. Визначення концентрації оцтової кислоти.....	72
РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	81
8.1. Аналіз місць емісії можливих відходів під час виробництва оцтової кислоти	81
8.2. Перспективи впровадження систем екологізації виробництва оцтової кислоти	82
8.2.1. Рідкі відходи. Об'єми та можливі шляхи знешкодження.....	82
8.2.2. Розрахунок об'ємів та утилізація газоповітряних відходів	84
8.2.3. Знешкодження утворених твердих відходів.....	87
Список використаної літератури	89
ДОДАТКИ.....	100

В7003-02, що здатен до високої продукції цільового продукту (93,09 г/л) протягом доволі короткого часу [4].

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

1.1. Фізико-хімічні властивості оцтової кислоти

Оцтова (або етанова) кислота ($C_2H_4O_2$) – одна з найпростіших синтетичних карбонових кислот, що має молекулярну масу 60,05 [5]. За органолептичними властивостями є прозорою, безбарвною, рухомою рідиною або твердою речовиною із сильним різким запахом та пекучим смаком [5, 6].

Основні фізичні показники:

- 1) температура кипіння – 118 °С;
- 2) температура плавлення – 16 °С;
- 3) температура займання – 39 °С;
- 4) розчинність у воді – 475900 мг/л;
- 5) тиск пари – 12 мм рт. ст. при 20°С, 17,2 мм рт. ст. при 25°С [6].

Оцтова кислота комерційно представлена на ринку як крижана оцтова кислота з вмістом води менше 1% і концентрацією понад 98% (інші домішки є результатом виробничого процесу). Щільність чистої оцтової кислоти становить 1,0491 при 20°С і 0,9599 при 100°С. Оцтова кислота дуже гігроскопічна. Чистота водних розчинів може бути пов'язана з їх температурою замерзання [6].

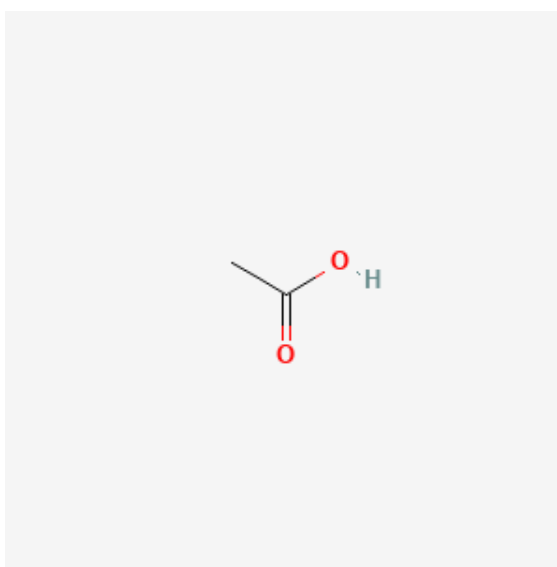


Рис. 1.1. Структурна формула оцтової кислоти [5]

					НУХТ БТЕК 05.01.29 КР ПЗ			
Зм	Дрк	№	Піппи	Пат		Пітен	Дркв	Дрквців
<i>Розробн</i>	<i>Чернецька</i>				РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА		<i>о</i>	<i>102</i>
<i>Керівник</i>	<i>Капаш Ю</i>							
<i>Н контр</i>								
<i>Консульт</i>								
<i>Зав каф</i>	<i>Стабніков</i>							
						Кафедра БТМ		

Суміш оцтової кислоти з водою має дуже своєрідні властивості. Вища щільність спостерігається між 67% і 87%, що доводить, що оцтова кислота розвиває молекулярні асоціації. Вимірювання густини пари чистої оцтової кислоти демонструє утворення димерів. Рідка фаза показує також існування мономерів, димерів і навіть вищих олігомерів. Підвищення концентрації сприяє утворенню димерів, тоді як підвищення температури утворення мономерів [7].

Крижана оцтова кислота (100%) має високу корозійну дію, і її потрапляння всередину спричиняє проникаючі ураження стравоходу, а пізніше — стриктури стравоходу та пілоруса у людини [5]. Оцтова кислота здатна до легкого змішування з етанолом, етиловим ефіром, ацетоном, бензолом та гліцерином; розчинна у чотирихлористому вуглеці, але не розчинна у сірковуглеці [8].

Токсичність. Потрапляння 4 – 10-го розчину оцтової кислоти в око людини викликає негайний гострий біль і гіперемію кон'юнктиви, іноді з пошкодженням епітелію рогівки. Повторний або тривалий контакт зі шкірою може спричинити дерматит. Оцтова кислота може негативно впливати на шлунково-кишковий тракт, що призводить до розладів травлення, включаючи піроз і запор. Також тривалий вплив такої речовини може призвести до потемніння шкіри, ерозії зубної емалі та хронічного запалення дихальних шляхів [9].

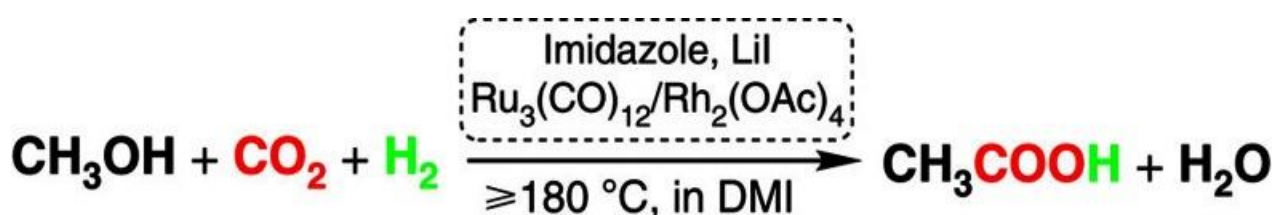
Токсичний ефект оцтової кислоти зумовлений її подразливими властивостями, а також її впливом на центральну нервову систему та нирки. Великі пероральні дози викликають пригнічення центральної нервової системи (ЦНС) і смерть у щурів і мишей. Крім опіків шкіри та подразнення слизових оболонок, проковтування може призвести до серйозних пошкоджень травної системи та потенційно смертельної зміни кислотності крові [5].

1.2. Хімічний синтез оцтової кислоти

Основні шляхи одержання синтетичної оцтової кислоти включають карбонілювання метанолу (*рис. 1.2*), окислення ацетальдегіду, окислення

бутану/нафти та карбонілювання метилацетату. Порівняно невеликі кількості кислоти утворюються в результаті рідкофазного окислення бутану, прямого окислення етанолу та синтез-газу [5].

Процес карбонілювання (або реакція Монсанто) є найбільш використовуваним комерційним шляхом для синтезу оцтової кислоти. Метанол і монооксид вуглецю реагують у рідкій фазі в присутності каталізатора на основі родію при температурі 150–200 °C і тиску 30–50 бар з утворенням оцтової кислоти з 95% селективністю та 5% побічних продуктів, таких як мурашина кислота і формальдегід [10].



$$\Delta H_{298\text{K}}^\circ = -137.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta G_{298\text{K}}^\circ = -66.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Рис. 1.2. Реакція карбонілювання метанолу [11]

Вуглеводні, отримані з нафтової сировини, такі як бутан і нафта, використовуються для отримання оцтової кислоти з використанням каталізатора з ацетату кобальту та ацетату хрому (рис. 1.3). Реакція протікає при порівняно високому інтервалі температур (150–230 °C) і тиску (50–60 бар). У процесі використовується нафтова сировина, яка містить суміш вуглеводнів, що призводить до утворення, окрім оцтової кислоти, ще й інших побічних продуктів (ацетону, мурашиної та пропіонової кислот) [10].

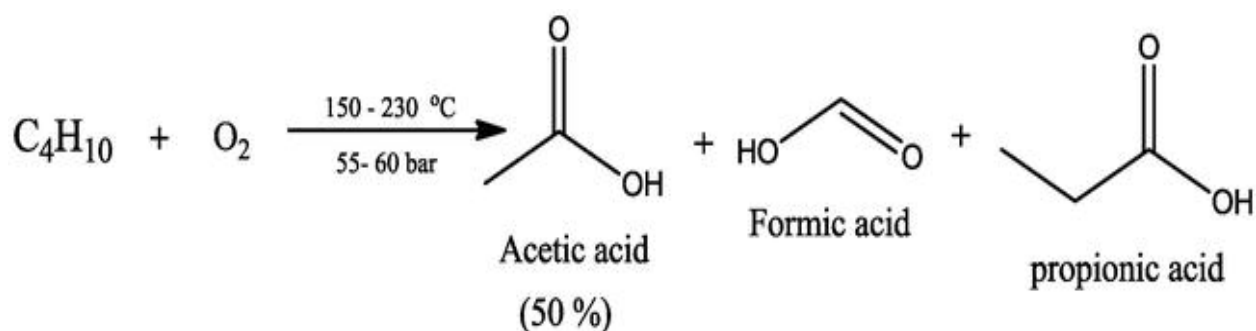


Рис. 1.3. Одержання оцтової кислоти шляхом окиснення вуглеводнів [10]

1.3. Особливості біотехнологічного одержання

Оцтова кислота (або оцет) - це водний розчин, який отримують шляхом вирощування мікроорганізмів на розведеному етанолі з використанням вуглеводів. Мікроорганізми, які окислюють етанол до оцтової кислоти, зазвичай називають оцтовокислими бактеріями. Існує ряд факторів, які впливають на ріст та виживання оцтовокислих бактерій, серед яких концентрація етанолу, оцтова кислоти, кисню, температура і доступність поживних речовин [12].

Добре відомо, що види оцтовокислих бактерій мають високу здатність окислювати спирти, альдегіди, цукри або цукрові спирти в присутності кисню. В результаті цих окисних властивостей відповідні продукти окислення, такі як карбонові кислоти, накопичуються в культуральній рідині. Ці окисні реакції каталізуються первинними дегідрогеназами, розташованими на зовнішній поверхні цитоплазматичної мембрани [13].

Ферментація оцтової кислоти може проходити шляхом, який зазвичай включає три незалежні стадії:

- 1) оцукрювання складних вуглеводів;
- 2) етанольне бродіння;
- 3) оцтовокисле бродіння.

На всіх трьох етапах використовуються три різні мікроорганізми. Ці три біохімічні процеси вимагають різних оптимальних умов, які потребують багато часу для завершення виробництва оцтової кислоти. Можна використовувати змішану культуру, що збільшить ефективність процесу за рахунок скорочення часу реакції. Крім того, усі три етапи можна проводити в одному біореакторі, що зменшить капіталовкладення [14].

Спільна культура *Saccharomyces cerevisiae* і *Acetobactor pasteurianus* використовується для виробництва оцтової кислоти з використанням глюкози як субстрату. Також можливим є застосування іншої змішаної культури –

Zyotomonas mobilis ATCC10988 і *Acetobacter* sp. TC-1 з використанням глюкози як джерела вуглецю [14].

1.4. Сфери використання оцтової кислоти

Оцтова кислота знаходить застосування у виробництві мономеру вінілацетату, терефталевої кислоти, фарб, харчового оцту, клеїв, фотопродуктів тощо, які в даний час виробляються в основному з нафтових ресурсів, таких як метанол, етанол або ацетальдегід [15]. Оцтова кислота також використовується як коагулянт у виробництві гуми, а також у виробництві багатьох барвників і парфумів [16]. У харчовій промисловості застосовується як харчова добавка (E260), а саме як ароматизатор, регулятор кислотності і консервант у різних продуктах харчування. Зокрема, оцтова кислота набула широкого використання у консервній промисловості як ароматизатор у виробництві солінь, риби, м'яса, цукерок і глазури [5].

Оцтова кислота використовується як лабораторний реагент при хімічному та біохімічному аналізі, при польових випробуваннях парів свинцю, визначенні вінілхлориду, сечової кислоти в сечі, парах аніліну та виділенні газів. Крім того, оцтова кислота використовується у складі пестицидів як гербіцид для боротьби з бур'янами на фруктах, овочах, декоративних рослинах і газоні [9]. У наукових дослідженнях зустрічається інформація про застосування у дезінфекції ультразвуку у поєднанні з органічними кислотами. Так, автори статті [17] показали, що за використання альтернативної обробки капусти оцтовою кислотою з ультразвуком знижується вміст аеробних мезофілів, цвілі та дріжджів, а також коліформ при 35 °C, а отже, підвищується час зберігання такої капусти.

Етанова кислота володіє високими антимікробними властивостями. Тому використовується як антисептик у вигляді розчину, має ефективну дію проти бактерій (стрептококів, стафілококів, синьогнійних паличок, ентерококів та ін.) [18]. Зокрема, зустрічається у складі лікарських засобів для лікування хвороб вух, горла і носа у вигляді місцево-отологічних спиртових крапель (2%) [5]. Також оцтова кислота може бути використана як біоцидний

агент для запобігання або зменшення мікробної контамінації шкірних ран, зокрема як компонент у виготовленні протиопікових пов'язок [19].

У медичній практиці оцтова кислота може використовуватися в ортопедичній хірургії через її асептичні властивості [20]. Нещодавно даний продукт було адаптовано для інших цілей, залежно від уподобань оперуючого хірурга, які включають усунення пошкоджень м'яких тканин, зменшення післяопераційних рубців, видалення біоплівки (перипротезування) та санацію [21]. Також активно з'являється інформація щодо використання цільового продукту для виявлення кишкової метаплазії та ранньої неоплазії Барретта. Якісна візуалізація та ідентифікація досягається шляхом застосування оцтової кислоти у хромоендоскопії [22]. Оцтова кислота знаходить активне використання у кольпоскопічних дослідженнях уражень шийки матки з/без кольпоскопічної біопсії [23].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦЕНТА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента

Лише 10% світового виробництва цільового продукту – оцтової кислоти реалізується біологічним шляхом, переважно таку кислоту одержують синтетичним шляхом [24]. У біотехнологічному виробництві використовують велику групу оцтовокислих бактерій, які синтезують оцтову кислоту з етанолу. Ці бактерії широко поширені на поверхнях квітів і фруктів, у цукровмісних сполуках або в алкогольних напоях [25].

До основних 4 груп оцтовокислих бактерій належать мікроорганізми родів *Acetobacter*, *Gluconobaeter*, *Gluconacetobacter* і *Komagataeibacter*. На сьогоднішній день ідентифіковано 19 родів і 92 види, здатних до біосинтезу оцтової кислоти. Такі бактерії в основному використовуються в промисловому виробництві оцту та фруктових оцтових напоїв, зокрема відомо про застосування *Acetobacter* і *Komagataeibacter* у виготовленні оцту [26].

Оцтова кислота є основним метаболітом оцтовокислих бактерій і утворюється у результаті біоконверсії етанолу за допомогою двох реакцій, що каталізуються зв'язаною з мембраною піролохінолінхінон-залежною алкогольдегідрогеназою (АДГ) та альдегіддегідрогеназою(АДДГ). АДГ окиснює етанол до ацетальдегіду, який потім перетворюється на оцтову кислоту при функціонуванні АДДГ і вивільняється у навколишнє середовище [27].

					НУХТ БТЕК 05.01.29 КР ПЗ			
Зм	Дпк	№	Піппи	Пат	РОЗДІЛ ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА	Літен	Дпкв	Дпквiiiв
<i>Розробн</i>	<i>Чернецька</i>						15	105
<i>Керівник</i>	<i>Капаш Ю</i>							
<i>Н контр</i>								
<i>Контсиль</i>								
<i>Зав каф</i>	<i>Стабніков</i>					Кафедра БТМ		

Після опрацювання доступної наукової літератури для порівняння було обрано бактеріальні штами роду *Acetobacter*. Найвищою продуктивністю оцтової кислоти характеризуються бактерії *Acetobacter senegalensis* LMG 23690T (43, 67 г/л), *A. senegalensis* sp. nov. CWBI-B418 (55 г/л), *A. pasteurianus* JST-S (61,42 г/л), *A. pasteurianus* CICIM B7003-02 (93,09 г/л), *A. aceti* 10-8S2 (105 г/л) [28, 4, 29, 30, 31]. Потрібно звернути увагу, що умови культивування та склад поживних середовищ (ПС) для вирощування таких бактерій досить різняться. Отже, слід проаналізувати вартість складових ПС та обрати оптимальний біологічний агент.

Таблиця 2.1

Особливості синтезу оцтової кислоти за використання оцтовокислих бактерій

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація оцтової кислоти, г/л	Особливості біосинтезу	Література
	компонент	вміст, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Acetobacter pasteurianus</i> JST-S генно-інженерний	Етанол глюкоза дріжджовий екстракт MgSO ₄ · 7H ₂ O K ₂ HPO ₄	42 5 5 1,1 3,3	72	61,42	Культивування у колбах на качалках (n = 170 об/хв; t° = 32 °C; pH = 6,8 – 7,0)	[28]
<i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003-02 мутантний	Етанол оцтова кислота глюкоза дріжджовий екстракт MgSO ₄ KH ₂ PO ₄	36 12 5 5 0,4 0,6	20	93,09 ± 0,24	Культивування у біореакторі з робочим об'ємом 8 л (n = 170 об/хв; t° = 30 °C; pH = 6,8 – 7,0)	[4]
<i>Acetobacter senegalensis</i> LMG 23690T	Етанол глюкоза оцтова кислота дріжджовий екстракт MgSO ₄ K ₂ HPO ₄ (NH ₄) ₂ HPO ₄	50 20 10 5 0,5 1 1	60	43,67	Культивування у біореакторі з робочим об'ємом 15 л (n = 120 об/хв; t° = 38 °C; pH = 6,8 – 7,0)	[29]

Продовження табл. 2.1

<i>Acetobacter aceti</i> 10–8S2 генно-інженерний	Етанол глюкоза оцтова кислота дріжджовий екстракт поліпептон	30 30 10 5 2	150	105	Культивування у біореакторі з об'ємом 5 л (n = 400 об/хв; t° = 30 °C; рН = 6,5)	[30]
<i>Acetobacter senegalensis</i> sp. nov. CWBI-B418	Етанол оцтова кислота глюкоза дріжджовий екстракт MgSO ₄ (NH ₄) ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ натрій цитрат	50 25 2 1 1 1 1 1	35	55	Культивування у біореакторі з об'ємом 300 л (n = 400 об/хв; t° = 35 °C; рН = 4,0)	[31]

**Вартість поживних середовищ для вирощування продуцентів оцтової
кислоти**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація компонента, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість складової (грн) на 1 л ПС	Джерело (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Acetobacter pasteurianus</i> JST-S	Етанол	42 (0,052 л)	115 (грн/л)	5,98	1
	глюкоза	5	51	0,255	2
	дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	3
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,1	19	0,021	4
	K ₂ HPO ₄	3,3	47,33	0,156	
	Вартість 1 л середовища – 11,912 грн				
<i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003-02	Етанол	36 (0,045 л)	115 (грн/л)	5,18	1
	оцтова кислота	12	97,9	1,175	5
	глюкоза	5	51	0,255	2
	дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	3
	MgSO ₄	0,4	30	0,012	4
	КН ₂ РO ₄	0,6	97	0,0582	
Вартість 1 л середовища – 12,18 грн					
<i>Acetobacter aceti</i> 10–8S2	Етанол	30 (0,037 л)	115 (грн/л)	4,255	1
	глюкоза	30	51	1,53	2
	оцтова кислота	10	97,9	0,979	5
	дріжджовий екстракт	5	1100	5,5	3
	поліпептон	2	1060	2,12	
	Вартість 1 л середовища – 14,384 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на квітень 2023 р. 1 – <https://alcomol.com/>, 2 – <https://chemsale.com.ua/>, 3 – <https://kiev.prom.ua/>, 4 – <https://flagma.ua/uk/>, 5 – <https://all-him.com.ua/>.

Опираючись на дані, наведені у табл. 2.2, можна зробити попередній висновок, що поживне середовище для культивування *A. pasteurianus* JST-S є дешевшим, ніж для вирощування *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02 і *A. aceti* 10–8S2 у близько 1,5 разів. Однак суттєвою перевагою використання штаму СІСІМ В7003-02 є найменший час для його культивування, а саме 18 год [4].

Умовна вартість 1 г оцтової кислоти, синтезованої за умов росту на поживних середовищах схожого складу

Продуцент	Концентрація оцтової кислоти, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість оцтової кислоти, синтезованої за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г оцтової кислоти, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Acetobacter pasteurianus</i> JST-S	61,42	72	0,853	11,912	0,194
<i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003-02	93,09	20	4,655	12,18	0,131
<i>Acetobacter aceti</i> 10-8S2	105	150	0,7	14,384	0,137

Під час остаточного вибору біологічного агента потрібно звернути увагу на попередньо розраховану умовну вартість синтезованої оцтової кислоти (див. табл. 2.3). Одержані дані свідчать, що найвища кількість оцтової кислоти, синтезованої за 1 год, характерна для бактерій *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02 – 4,655 г/год, що у 6,1 – 7,4 разів є більшим, ніж в інших продуцентів, представлених у таблиці. Варто також зазначити, що умовна вартість 1 г одержуваної оцтової кислоти бактеріальним штамом СІСІМ В7003-02 є найнижчою. Тому, як найефективніший біологічний агент для біосинтезу оцтової кислоти обираємо *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02.

2.2. Морфолого-культуральні ознаки *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02

Acetobacter pasteurianus – типова кислотостійка і кислотоутворювальна грамнегативна бактерія паличкоподібної форми [32]. Даний мікроорганізм нерухомий, а також не здатний до утворення будь-яких спор [33]. У природі ендофіт *A. pasteurianus* пов'язаний із рослинами, присутній на багатих цукром субстратах, таких як фрукти, квіти та овочі, і здатний окислювати алкоголь або

джерела цукру у відповідні органічні кислоти, включаючи найбільш затребувані, зокрема перетворення етанолу в оцтову кислоту [34].

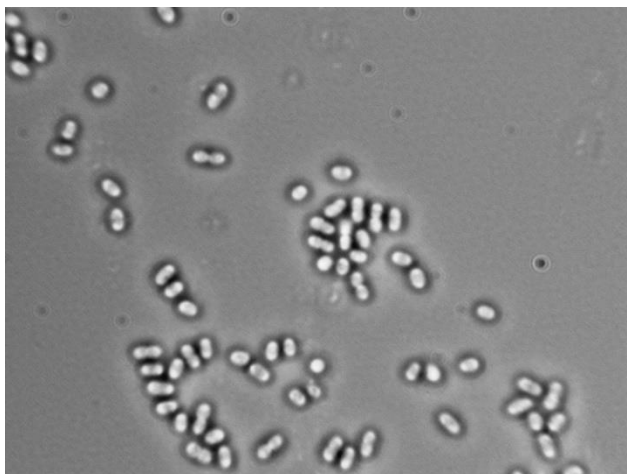


Рис. 2.1. Зображення *Acetobacter pasteurianus* під мікроскопом [35]

Бактерії після вирощування на середовищі №597 при 25 °С протягом 9 діб утворюють круглі випуклі колонії кремового кольору [36]. Варто зазначити, що більшість штамів оцтовокислих бактерій не синтезують пігменти, однак існує дуже невелика кількість штамів, які здатні до утворення рожевих колоній завдяки наявності у складі порфіринів. Бактерії роду *Acetobacter* зазвичай розвиваються на поверхні поживного середовища, утворюючи тонку плівку [37].



Рис. 2.2. Колонії *Acetobacter pasteurianus* на агаризованому середовищі №597 [36]

2.3. Фізіолого-біохімічні ознаки *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02

По відношенню до температури мікроорганізм є мезофілом, оскільки здатен до активного росту за 30 °С [33]. Оптимальний діапазон рН = 5,4-6,3, тобто така бактерія є нейтрофілом. Бактерії роду *Acetobacter* є хемоорганотрофами, облігатно аеробними організмами, що окиснюють етанол з утворенням оцтової кислоти. Зокрема мікроорганізми є вимогливими до ростових субстратів, а також потребують у складі середовищ вітамінів. Не здатні гідролізувати крохмаль та лактозу [38]. Відомо, що такі цукри як: арабіноза, ксилоза, рибоза, глюкоза, галактоза, маноза, мелібіоза та трегалоза можуть бути активно ферментовані більшістю з штамів *Acetobacter*, зокрема *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02 [37].

2.4. Таксономічний статус *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02

Згідно з [39] сучасна (філогенетична) класифікація *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02 має наступний вигляд:

Царство: *Bacteria*

Тип: *Pseudomonadota*

Клас: *Alphaproteobacteria*

Ряд: *Rhodospirillales*

Родина: *Acetobacteraceae*

Рід: *Acetobacter*

Вид: *pasteurianus*

Штам: СІСІМ В7003-02

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

3.1. Потреба в оцтовій кислоті

Оцтова кислота — одна з найпростіших карбонових кислот. Він має різноманітне застосування, починаючи від харчових і медичних до промислових. Даний цільовий продукт в основному міститься в оцті. Його також використовують як харчову добавку (номер Е 260) для регулювання кислотності та як консервант [40]. Оцтова кислота має властивість консерванту, тобто несе бактерицидну дію. Відомо, що патогенна мікрофлора найбільш сприятливо розвивається в лужному середовищі, тому підкислення продуктів оцтовою кислотою, що має рН 3,3 – 4,0, запобігає розвитку мікроорганізмів. Більшість патогенних мікроорганізмів гине в 2%-му розчині оцтової кислоти [41].

Харчова промисловість є найбільшим споживачем оцтової кислоти. Даний продукт знаходить своє використання у виробництві:

- консервації та соління;
- сиру і молочних продуктів;
- соусів;
- готових салатів [42].

Консервна промисловість – одна з найважливіших галузей харчової промисловості України. Основним напрямом цього підрозділу є виробництво плодоовочевих, м'ясних, рибних і молочних консервів. Найбільший відсоток (майже 80%) займає консервоване виробництво плодоовочевого напрямку [43].

					НУХТ БТЕК 05.01.29 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Дрк</i>	<i>№</i>	<i>Піппи</i>	<i>Лат</i>	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ПІТОВОЇ КИСЛОТИ	<i>Пітен</i>	<i>Дркв</i>	<i>Дркв</i> ²³
<i>Розробн</i>	<i>Чернецька</i>						23	102
<i>Керівник</i>	<i>Капаш Ю</i>				Кафедра БТМ			
<i>Н контр</i>								
<i>Книгуль</i>								
<i>Зав каф</i>	<i>Стабніков</i>							

Консервна промисловість є однією зважливих ланок у вирішенні продовольчої проблеми, оскільки продукція даної галузі дає змогу забезпечувати протягом року населення високо вітамінізованим харчуванням, і при правильній обробці та переробці вона тривалий час не лише зберігає, але й поліпшує свої поживні якості [44].

На сьогодні, оцтова кислота, використовується у виробництві консервованих овочів або закусок, виробляється виключно шляхом хімічного синтезу. На ринку України представлено товари оцтової кислоти, вироблені за використання етапів хімічного синтезу як закордонними, так і вітчизняними підприємствами (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Перелік найбільш уживаних товарів оцтової кислоти,
представлених на ринку України**

Назва продукту	Країна-виробник	Концентрація, %, об'єм, л / маса, кг	Ціна, грн
Крижана оцтова кислота Харчова добавка Е-260	Китай	99,8%, 1 л	210
Оцтова кислота		80%, 22 кг	2100
Оцтова кислота льодяна		99,9%, 1 кг	98
Оцтова кислота	Україна	99,85%, 1 кг	180
Оцтова кислота (Крижана)		99,9%, 5 л	750
Кислота оцтова харчова столова		9%, 0,925 л	26,5
Оцтова кислота		9%, 0,9 л	16,5

Використання оцтової кислоти, синтезованої шляхом біотехнологічного синтезу, у харчовій промисловості не є розповсюдженим, але залишається достатньо перспективним. Біотехнологічне виробництво оцтової кислоти із використанням мікроорганізмів має ряд переваг з точки зору найнижчих необхідних витрат і найвищої специфічності. Крім того, біологічні агенти мають найбільшу стійкість до впливу токсичних речовин і у процесі розвитку залишають мінімальний викид забруднюючих речовин [3].

3.2. Розрахунок потужності біотехнологічного виробництва органічної кислоти

ПАТ «Одеський консервний завод» випускає товари ТМ «Господарочка», включає у себе продукцію асортиментом у близько 44 найменувань продукції харчового призначення. Серед такого асортименту 13 найменувань містять у своєму складі регулятор кислотності – кислоту оцтову Е 260. Дані товари є консервованими овочами та закусками, що випускаються під назвами «Кабачки різані мариновані», «Томати мариновані», «Томати неочищені в томатному соці», «Огірки мариновані», «Асорті «Буковинське №1», «Асорті «Буковинське №2», «Рагу з овочів в томатному соусі», «Баклажани в аджиці», «Баклажани різані з овочами в томатному соусі», «Лечо по-домашньому», «Перець солодкий в заливці» та «Томати очищені в томатному соку» [45].

Відповідно до доступних даних, потужність виробництва ТМ «Господарочка» обраного Одеського заводу складає 25 млн умовних банок/рік, що є достатнім для забезпечення значної частини українського ринку консервованих продуктів [46].

Підприємство «Одеський консервний завод» пропонується забезпечити консервантом Е 260 шляхом створення виробничого цеху для виготовлення крижаної оцтової кислоти. Даний продукт буде використано в якості регулятора кислотності. Таке технологічне рішення дозволить уникнути додаткової закупівлі цього компонента і зменшити загальні витрати на подальше виробництво.

Зазначимо, що з-поміж 44 найменувань консервної продукції, регулятор кислотності Е 260 використовують у 13 товарах, що відсотковому співвідношенні становить 30%. Отже, загальна кількість банок, вироблених за рік, складатиме:

$$25\ 000\ 000 \times 30\% = 7\ 500\ 000 \text{ банок/рік}$$

Задля забезпечення найвищої ефективної дії використовуваного регулятора кислотності необхідно до 100 г готового консервованого продукту додати 3-6% оцтової кислоти концентрацією 9 % (оцет) [47]. Тому приймаємо, що у 100 г готового продукту буде міститися 3 г оцтової кислоти концентрацією 9%. У 100 г 9%-го розчину оцтової кислоти міститься 9 г чистої оцтової кислоти. Тому на 100 г продукту потрібно $9 \text{ г} \times 0,03 = 0,27 \text{ г}$ чистої оцтової кислоти. За використання регулятора кислотності Е 260 з концентрацією оцтової кислоти 99,8%, необхідна кількість чистої оцтової кислоти на 100 г консервів складатиме:

$$0,27/0,998 = 0,271 \text{ г Е 260.}$$

Продукти, що входять в асортимент ТМ «Господарочка» випускаються у банках масою 390 – 2500 г [45]. Із представленого діапазону обираємо значення, тобто 500 г. Тому, зважаючи на вище наведену інформацію, допускаємо, що для 500 г консервованого продукту необхідно 1,355 г регулятора кислотності Е 260. З цього випливає, що для забезпечення потреби «Одеського консервного заводу» у регуляторі кислотності Е 260 потрібно:

$$7\,500\,000 \times 0,001355 = 10\,162 \text{ кг/рік}$$

Отже, потужність проєктованого виробництва оцтової кислоти складатиме 10 162 кг або 10,16 т за рік.

3.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера для одержання оцтової кислоти

Як зазначалося у попередньому підрозділі, потужність проєктованого виробництва оцтової кислоти становить $G_{\text{п}} = 10,16 \text{ т/рік}$. Продуцент – *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02 синтезує 93,09 г оцтової кислоти на 1 л культуральної рідини [4]. Тому об'єм культуральної рідини становить:

$$10\,162 / 0,09309 = 109\,163 \text{ л}$$

Із урахуванням сумарних втрат цільового продукту при виділенні (20 %), об'єм культуральної рідини, що зливається за один цикл буде складати:

$$109\,163 / (1-0,2) = 136\,454 \text{ л, або } 136,454 \text{ м}^3$$

Плануємо, вироблення зазначеної кількості субстанції буде здійснюватися протягом $T_{рд} = 55$ робочих трудовнів. Тому, кількість циклів за рік складатиме:

$$V_d = V_{гп} / T_{тр} = 136,454 / 55 = 2,48 \text{ м}^3$$

Кількість культуральної рідини за цикл буде становити:

$$V_{цк} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф}) / 24 = (1,1 \cdot 2,48 \cdot 28,5) / 24 = 3,24 \text{ м}^3/\text{цикл},$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$), $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (20 год) та час підготовки ферментера до роботи (8,5 год), що складається з таких операцій:

- 1) миття та огляд апарата (1,5 год),
- 2) перевірка на герметичність (1 год),
- 3) підігрів (0,5 год),
- 4) стерилізація апарату (1 год),
- 5) охолодження (1 год),
- 6) завантаження середовища (2 год),
- 7) засів (0,5 год),
- 8) вивантаження культуральної рідини (1 год).

Також слід врахувати, що у процесі одержання культуральної рідини можливою є частка втрат у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%.

3,24 м³ культуральної рідини ($V_{кр}$) можна одержати протягом біосинтезу у ферментері, робочий об'єм якого складатиме:

$$V_{роб1} = V_{кр} / (1 - Eф) = 3,24 / (1 - 0,1) = 3,6 \text{ м}^3,$$

де $Eф$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Можливий геометричний об'єм ферментера при $Kз = 0,6$:

$$V_{мф} = V_{роб1} / Kз = 3,6 / 0,6 = 6 \text{ м}^3$$

Найближчим за об'ємом є стандартний ферментер $Vф = 6,3 \text{ м}^3$.

Після цього уточнений коефіцієнт заповнення складає:

$$K_{зф} = V_{роб1} / V_{ф} = 3,6 / 6 = 0,6 \text{ – не перевищує заданого значення.}$$

3.4. Розрахунок кількості необхідних стадій підготовки посівного матеріалу

Складовими обрахованого робочого об'єму ферментера є об'єм поживного середовища ($V_{пс1}$) і об'єм посівного матеріалу ($V_{пм1}$), який отримують шляхом вирощування у посівному апараті. Зазвичай, на частку посівного матеріалу припадає 10% від об'єму поживного середовища, що подається в апарат.

$$V_{пс1} = V_{роб1} / (1 + X_{пм1}) = 3,6 / (1 + 0,1) = 3,27 \text{ м}^3$$

$$V_{пм1} = V_{роб1} - V_{пс1} = 3,6 - 3,27 = 0,33 \text{ м}^3$$

Посівний матеріал одержуємо шляхом вирощування культури у посівному апараті із робочим об'ємом:

$V_{роб2} = V_{пм1} / (1 - E_{пм}) = 0,33 / (1 - 0,1) = 0,37 \text{ м}^3$, де $E_{пм}$ – втрати культуральної рідини при вирощуванні інокуляту у посівному апараті, що утворюються внаслідок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації.

Для одержання інокуляту у посівному апараті потрібно визначити необхідний об'єм поживного середовища:

$$V_{пс2} = V_{роб2} / (1 + X_{пм2}) = 0,37 / (1 + 0,1) = 0,34 \text{ м}^3$$

Кількість посівного матеріалу складатиме:

$$V_{пм2} = V_{роб2} - V_{пс2} = 0,37 - 0,34 = 0,03 \text{ м}^3, \text{ або } 30 \text{ л}$$

Геометричний об'єм апарата, для одержання такого об'єму посівного матеріалу складає:

$$V_{па} = V_{роб2} / K_{з} = 0,37 / 0,6 = 0,62 \text{ м}^3$$

Відповідно до інформації про розміри стандартних посівних апаратів найближчий за геометричним об'ємом посівний апарат 1 – $V_{гін1} = 630 \text{ л}$. А, отже, дійсний коефіцієнт заповнення складає:

$$K_{зд} = V_{роб2} / V_{гін1} = 370 / 630 = 0,59, \text{ що входить у межі } 0,5 - 0,65.$$

Посівний матеріал одержуємо шляхом вирощування культури в інокуляторі 1 із робочим об'ємом:

$V_{роб3} = V_{пм2}/(1-E_{пм}) = 30/(1-0,1) = 33,33$ л, де $E_{пм}$ – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі, що утворюються внаслідок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації.

Для одержання посівного матеріалу в інокуляторі 1 потрібно визначити необхідний об'єм поживного середовища:

$$V_{пс3} = V_{роб3}/(1+X_{пм3}) = 33,33/(1+0,1) = 30,3 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу складатиме:

$$V_{пм3} = V_{роб3} - V_{пс3} = 33,33 - 30,3 = 3,03 \text{ л}$$

Геометричний об'єм апарата, для одержання такого об'єму посівного матеріалу складає:

$$V_{па} = V_{роб3}/K_3 = 33,33/0,6 = 55,6 \text{ л}$$

Відповідно до інформації про розміри стандартних інокуляторів найближчий за геометричним об'ємом інокулятор 1 – $V_{гін1} = 60$ л. А, отже, дійсний коефіцієнт заповнення складає:

$$K_{зд} = V_{роб3}/V_{гін1} = 33,33/60 = 0,56, \text{ що входить у межі } 0,5 - 0,65.$$

Посівний матеріал одержуємо шляхом вирощування культури в інокуляторі 2 із робочим об'ємом:

$V_{роб4} = V_{пм3}/(1-E_{пм}) = 3,03/(1-0,1) = 3,37$ л, де $E_{пм}$ – втрати культуральної рідини при вирощуванні посівного матеріалу в інокуляторі, що утворюються внаслідок краплевиносу частини культуральної рідини під час аерації.

Для одержання посівного матеріалу в інокуляторі 2 потрібно визначити необхідний об'єм поживного середовища:

$$V_{пс4} = V_{роб4}/(1+X_{пм4}) = 3,37/(1+0,1) = 3,06 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу складатиме:

$$V_{пм4} = V_{роб4} - V_{пс4} = 3,37 - 3,06 = 0,31 \text{ л, або } 310 \text{ мл}$$

Геометричний об'єм апарата, для одержання такого об'єму посівного матеріалу складає:

$$V_{па} = V_{роб4}/K_3 = 3,37/0,6 = 5,62 \text{ л}$$

Відповідно до інформації про розміри стандартних інокуляторів найближчий за геометричним об'ємом інокулятор 2 – $V_{гін2} = 6$ л. А, отже, дійсний коефіцієнт заповнення складає:

$$K_{зд} = V_{роб5}/ V_{гін3} = 3,37/6 = 0,56.$$

Об'єм інокуляту, що одержуємо у колбах на качалці, як правило, складає не більше 2 л. Оскільки максимальна кількість посівного матеріалу за використання качалочних колб $V_{пм4} = 0,31$ л, втратами при культивуванні в колбах нехтуємо, оскільки вони малі.

$$V_{роб5} = V_{пм4} = 0,31 \text{ л}$$

Для одержання посівного матеріалу у колбах на качалці потрібно визначити необхідний об'єм поживного середовища:

$$V_{пс5} = V_{роб5}/(1+X_{пм6}) = 0,31/(1+0,1) = 0,28 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу складатиме:

$$V_{пм5} = V_{роб5} - V_{пс5} = 0,31 - 0,28 = 0,03 \text{ л, або } 30 \text{ мл}$$

Для культивування використовуємо колби об'ємом $V_{кол} = 0,75$ л та коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,2$

Отже, кількість колб становить:

$$N_k = V_{роб5}/V_{кол} \times K_3 = 0,31/0,75 \cdot 0,2 = 2,07, \text{ а отже, } 3 \text{ колби}$$

Отже, процес одержання посівного матеріалу для біосинтезу оцтової кислоти у ферментері об'ємом $6,3 \text{ м}^3$ і з коефіцієнтом заповнення $0,6$ буде проходити у 4 етапи. Узагальнені дані щодо етапів підготовки посівного матеріалу наведено у таблиці 3.2.

Тому, підсумовуючи уже вище написане, для біосинтезу вітаміну оцтової кислоти за використання *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02 приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом $6,3 \text{ м}^3$, один посівний апарат об'ємом 630 л та два інокулятори об'ємом 60 і 6 л.

**Узагальнена інформація щодо необхідних об'ємів апаратів для
підготовки інокуляту та виробничого біосинтезу**

№ етапу	Тип апарату	Геометричний об'єм, л	Коефіцієнт заповнення, частка	Робочий об'єм, л	Об'єм поживного середовища, л	Об'єм посівного матеріалу, л	Найближчий об'єм апарату, л
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Колби, шт	3 шт	0,2	0,31	0,28	0,03	0,75
2	Інокулятор 2	6	0,56	3,37	3,06	0,31	5,62
3	Інокулятор 1	60	0,56	33,33	30,3	3,03	55,6
4	Посівний апарат 1	630	0,59	370	340	30	620
5	Ферментер	6 300	0,6	3 600	3 270	330	6 000

3.5. Схема біотрансформації етанолу в оцтову кислоту

Відповідно до даних, зазначених у статті [4], вихідною сполукою у синтезі оцтової кислоти виступає етанол. Оскільки у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [11] відсутня інформація про шляхи катаболізму етанолу в штаму *Acetobacter pasteurianus* CICIM B7003-02, ми можемо використати близькоспоріднений мікроорганізм, такий як *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-01 [11], для побудови шляху метаболізму даного спирту.

Згідно з KEGG катаболізм етилового спирту у *A. pasteurianus* IFO 3283-01 [48] здійснюється шляхом його перетворення під дією алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.5.5) на ацетальдегід, з якого далі під впливом альдегіддегідрогенази (НАД⁺) (КФ 1.2.1.3) утворюється ацетат, з якого синтезується ацетил-КоА (вихідна сполука для функціонування ЦТК [49]) за функціонування ферменту ацетил-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.1).

Анаплеротичні реакції, які забезпечують поповнення оксалоацетату - інтермедіату циклу Кребса (ЦТК) при рості на етанолі, включають реакції гліюксилатного циклу. Ці реакції каталізуються ферментами, такими як ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1), малатсинтетаза (КФ 2.3.3.9) і малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37) [50].

Для утворення фосфоенолпірувату (ФЕП), 3-фосфогліцерату, фруктозо-6-фосфату і глюкозо-6-фосфату потрібно активувати реакції гліюконеогенезу. Ключовим ферментом цих реакцій є фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (АТФ) (КФ 4.1.1.49), яка перетворює оксалоацетат на ФЕП [11].

Цільовий продукт – оцтова кислота утворюється за дії ферменту ацетальдегіддегідрогенази (КФ.1.2.1.3) із ацетату, синтезованого шляхом катаболізму субстрату. Оцтова кислота також синтезується під впливом оксалоацетатдекарбоксілази (КФ 4.1.1.3) із оксалату, що утворюється шляхом розпаду інтермедіата ЦТК – оксалоацетату.

Ферменти, необхідні для біосинтезу:

- 1) алкогольдегідрогеназа (КФ 1.1.5.5);
- 2) альдегіддегідрогеназа (НАД⁺) (КФ 1.2.1.3);
- 3) ацетальдегіддегідрогеназа (КФ.1.2.1.3);
- 4) ацетил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.1);
- 5) цитратсинтетаза (КФ 2.3.3.1);
- 6) аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3);
- 7) аконітатгідратаза (КФ 4.2.1.3);
- 8) ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42);
- 9) 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 2.3.1.61);
- 10) сукциніл-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.5);
- 11) сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1);
- 12) фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2);
- 13) малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37);
- 14) оксалоацетатдекарбоксілаза (КФ 4.1.1.3);
- 15) оксалоацетатдекарбоксілаза (КФ 4.1.1.3);
- 16) ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1);
- 17) малатсинтетаза (КФ 2.3.3.9);
- 18) малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37);
- 19) фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.49);

- 20) фосфогліцератфосфомутаза (КФ 5.4.2.11);
- 21) фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3);
- 22) гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12);
- 23) фруктозодифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13);
- 24) фруктозодифосфатаза (КФ 3.1.3.11);
- 25) глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9);
- 26) глюкозо-6-фосфатаза (КФ 3.1.3.9).

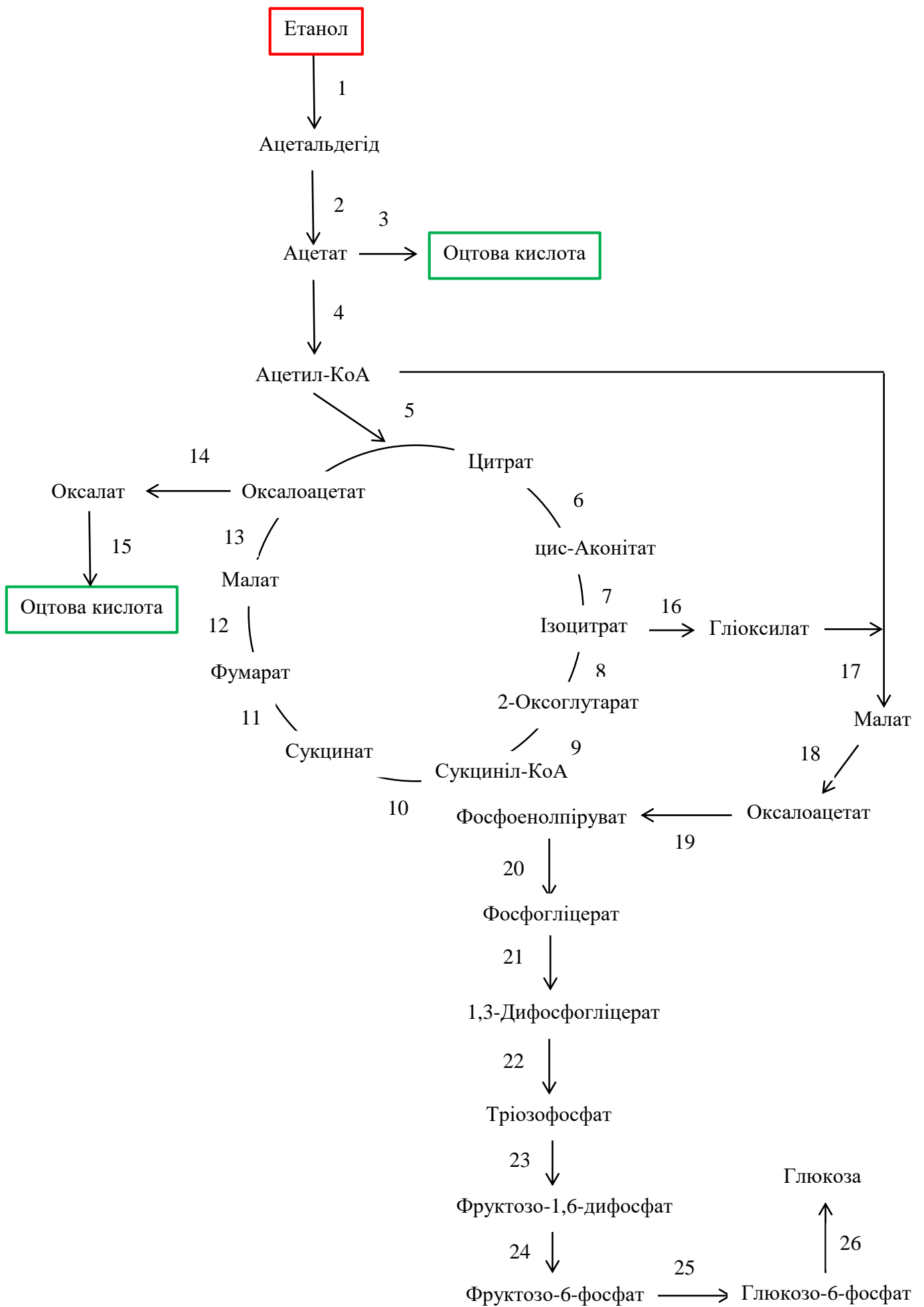


Рис. 3.1. Схема біотрансформації етанолу в оцтову кислоту бактеріями *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

4.1. Обґрунтування вибору умов культивування *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02 та типу ферментера

Для того, аби обрати оптимальний спосіб для ефективного виробництва оцтової кислоти, потрібно звернути увагу на фізіолого-біохімічні ознаки продуцента. Забезпечувати ефективність біосинтезу будуть такі умови:

1. Як зазначають автори статті [4], вирощування культури здійснюють за температури 30 °С і нейтрального рН (6,8 – 7,0). Тому для контролю таких показників у заданих межах ферментаційне обладнання оснащується датчиками температури і рН.

2. Вирощування посівного матеріалу та виробничий біосинтез оцтової кислоти слід проводити в асептичних умовах, оскільки за попередньо описаних температурного режиму і нейтрального рН, здатні розвиватися більшість мезофільних мікроорганізмів. Стерильні умови попередять розвиток сторонньої контамінації у поживних середовищах, посівному матеріалі та культуральній рідині.

3. Біологічний агент *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02 облигатна аеробна бактерія [33]. Задля постійного підтримання аерації на заданому рівні, необхідною є підготовка і безперервна подача стерильного повітря через барботер, що встановлюється у ферментаційному обладнанні. Обов'язковим етапом очищення аераційного повітря є його пропускання через індивідуальні фільтри, які безпосередньо встановлюються над інокуляторами, посівним апаратом і ферментером. Для контролю спожитого кисню у таких апаратах встановлюють датчики O₂ і CO₂.

					НУХТ БТЕК 05.01.29 КР ПЗ				
Зм	Дрк	№	Піппи	Лат	РОЗДІЛ ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	4.	Пітер	Дркв	Дрквів
Розробн	Чернецька							35	102
Керівник	Каплаш Ю							35	102
Н клнтп									
Клнсупль									
Зав каф	Стабніков								
							Кафедра БТМ		

З метою інтенсифікації масообмінних процесів в апаратах і розчиненні кисню у поживному середовищі, апарати повинні бути обладнані турбінною мішалкою із частотою обертів 170 об/хв.

4. Біосинтез оцтової кислоти проводять як періодичним, так і безперервним способом. Спираючись на інформацію дослідників [4], обираємо напівбезперервний спосіб, який забезпечить високу ефективність процесу шляхом постійних подачі свіжого та вивантаження відпрацьованого субстрату (етанолу). Для забезпечення вищого виходу цільового продукту обираємо глибинне вирощування бактеріальної культури.

Аби узагальнити усе вище описане, робимо такий висновок, що біосинтез оцтової кислоти проводитиме у таких умовах:

- 1) безперервна подача повітря;
- 2) стерильність;
- 3) температура 30 °С;
- 4) рН 6,8 – 7,0;
- 5) напівбезперервне глибинне культивування.

4.2. Обґрунтування стадій підготовки стерильного аераційного повітря

Зважаючи на те, що виробництво оцтової кислоти повинно проходити за безперервної аерації, постає необхідність у розробці стадій підготовки та стерилізації повітря, які буде подалі висвітлено у технологічній схемі. Існує достатня кількість методів забезпечення стерильності повітря – обробка повітря хімічними, фізичними або іншими чинниками.

Для біотехнологічних виробництв традиційними методами підготовки повітря є метод фільтрування через перегородки з різних матеріалів. Вибір методу стерилізації повітря в загальному вигляді є вибором фільтруючого матеріалу і способу його фіксації в корпусі фільтра. Виходячи з теорії стерилізації повітря, для видалення контамінантів використовують волокнисті фільтруючі матеріали з різних мінеральних або органічних речовин, пористі перегородки з кераміки або полімерних матеріалів [51].

Забір атмосферного повітря є першим важливим етапом у процесі підготовки повітря для використання в промисловому виробництві. Відповідний етап проводиться на висоті від двох до трьох метрів від найвищої точки будівлі. Ця висота обрана для того, щоб забрати повітря на оптимальній висоті, де концентрація мікроорганізмів є стабільною і прийнятною для подальшого використання. Для цього процесу використовується відповідний апарат – повітрозабірник [52].

Наступна стадія – попереднє очищення повітря, яка є важливою для видалення великих часток пилу та забруднень перед подальшою підготовкою повітря для використання в промислових процесах. Вибір фільтруючих матеріалів грає ключову роль у цьому процесі. Ось деякі типи матеріалів, які можуть бути використані на цій стадії: багатошарові дротяні сітки, набивання зі стружок металів, з полімерних матеріалів, із грубих мінеральних і синтетичних волокон [53].

Далі відбувається стадія компресування повітря. Такий процес необхідний для подолання гідравлічного опору при диспергуванні повітря у культуральній рідині. Потужність компресора підбирають із таким розрахунком, щоб забезпечити подачу повітря через всю систему очищення у ферментатори й щоб у процесі культивування підтримувався надлишковий тиск 0,01 - 0,03 МПа. Турбокомпресор використовується для створення високого тиску і подачі стиснутого повітря у систему, забезпечуючи оптимальні умови для проведення біотехнологічних процесів [52, 53].

При високому вмісті вологи в початковому атмосферному повітрі, під час охолодження, стає ще більше конденсації водяної пари. Накопичення вологи на фільтрах неприпустиме, оскільки це може спричинити злипання волокон та утворення каналів, що значно ускладнює процес вилучення частинок. Тому далі повітря проводить через теплообмінник-охолоджувач (25 – 40 °C), утворювана волога вловлюється за використання ресивера, а далі

повітря потрапляє до наступного теплообмінного апарату, де нагрівається до 70 – 90 °С [52].

На наступній стадії – грубого очищення повітря використовуються головні фільтри. Ці фільтри призначені для ефективного видалення часток повітря з діаметром приблизно 1-1,5 мікрон, включаючи бактеріальні забруднення. Ефективність очищення повітря на цій стадії досягає 98%.

Далі повітря надходить до кінцевого етапу – очищення на індивідуальних фільтрах, що встановлені безпосередньо біля ферментаційного обладнання. Фільтруючі матеріали здатні були ефективно очищувати повітря від часток з діаметром 0,3 мікрони на 99,999% [53]. Фільтрувальний матеріал повинен відповідати наступним основним вимогам: мати високу ефективність при мінімальному опорі, достатню пилоємкість і механічну міцність; повинен бути стійкими до впливу гострої пари як основного агента, що стерилізує, бути зручним і надійним в експлуатації [51].

Також слід врахувати те, що підготовка поживних середовищ та інокуляту для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках здійснюється у боксах мікробіологічних лабораторій. У таких боксах стерилізація повітря проходить шляхом опромінення ультрафіолетовими променями, що чинять згубну дію на усі групи мікроорганізмів [52].

4.3. Вибір дезінфікуючих та мийних засобів для виробництва оцтової кислоти

Очищення і дезінфекція у промисловості є достатньо важливими процесами будь-якого виробничого процесу. Ці процеси допомагають забезпечити високий стандарт гігієни, знизити ризик зараження мікроорганізмами, запобігти росту та поширенню бактерій, грибків і вірусів, і, таким чином, забезпечити безпечну і якісну продукцію. Розрізняють органічні і неорганічні види забруднень:

1. Органічні забруднення включають в себе органічні сполуки, такі як жири, білки, вуглеводи і інші органічні речовини. Вони можуть бути джерелом

живлення для бактерій і грибів і сприяти їхньому росту. Видалення органічних забруднень може вимагати миття, відмивання або використання спеціалізованих мийних засобів.

2. Неорганічні забруднення включають в себе немінеральні речовини, такі як пил, інші тверді частки, метали, солі та інші неорганічні речовини. Ці забруднення можуть бути осадами, розчинами або суспензіями. Їх видалення може здійснюватися через фільтрацію, осадження або відмивання. Важливо розуміти природу забруднень та використовувати відповідні методи очищення та дезінфекції для забезпечення безпеки та якості продукції. Кожна галузь промисловості може мати свої особливості та вимоги до цих процесів, і вони повинні враховуватися в проектуванні систем очищення та дезінфекції [54].

Очищення - це видалення різних типів забруднення (наприклад, залишків продукту чи дезінфекційного засобу) фізичними засобами або відповідним агентами для надання видимої чистоти поверхні [55].

«Бланідас-Ц Фоам-МС» є лужним миючим засобом, безпечним для м'яких матеріалів, розробленим для щоденного миття сильно забруднених поверхонь. Препарат ефективно видаляє більшість харчових забруднень, включаючи жир, олію, мінеральну олію. Концентрація робочого розчину засобу Бланідас-Ц Фоам-МС повинна становити від 3 до 10% (об'ємних) в залежності від типу і ступеня забруднення. Застосовувати при кімнатній температурі. Час дії до 15 хв [56, 57].

Препарат є високоефективною збалансованою сумішшю силікатів, лугів, органічних секверстантів і зволожуючих компонентів з високим рівнем піноутворення. Засіб ефективно видаляє навіть застарілі харчові забруднення (жир рослинного і тваринного походження, протеїн, крохмаль). Присутність силікатів дозволяє запобігти корозії м'яких металів, особливо алюмінію. Може застосовуватися для миття підлог, стін, обробних столів, конвеєрів та іншого обладнання. Засіб «Бланідас-Ц Фоам-МС» може застосовуватися з

різноманітним обладнанням для пінної мийки для безпосереднього миття і замочування [56].

Каустична сода являє собою крупнофракційний порошок нагадує маленькі кристали білого кольору. Його хімічна формула - NaOH. Відомий під такими назвами як натрій їдкий, сода каустична. **Властивості їдкого натру:**

- Гігроскопічний: поглинає пар води з повітря;
- При контакті з пластиком, гумою, сталлю і чавуном, сода каустична чешуїрована не виробляє ніяких реакцій;
- Бурхливо реагує на цинкованої і алюмінієві поверхні;
- Речовина відмінно «роз'їдає» харчові залишки, жирові відкладення, а також всю органіку.
- Каустична сода їдкий натрій має високий показник летючості, тому його потрібно зберігати в щільній тарі.

Концентрат і робочі розчини – їдкі (2 клас небезпеки за ГОСТ). При роботі застосовувати:

1. Приміщення, в якому буде використовуватися сода каустична, має добре провітрюватися.
2. Потрібно одягнути спеціальні окуляри для захисту очей, гумові рукавички, а також спецодяг.
3. Якщо їдкий натрій потрапила на шкіру, нейтралізувати уражену ділянку невеликою кількістю оцту, потім промити водою. При попаданні в очі, в терміновому порядку необхідно промити їх великою кількістю води.
4. Не брати кристали руками, оскільки концентрація каустичної соди може призвести сильну реакцію з шкірою.
5. Зберігати Каустичний їдкий натрій в щільно закритій пластиковій банці або в поліетиленовому мішку [58].

Дезінфекція - це процес, за допомогою якого зменшення кількості мікроорганізмів досягається незворотною дією засобу на їхню структуру або метаболізм до рівня, котрий вважають відповідним певній меті. Одні

дезінфекційні засоби ефективні тільки проти вегетативних мікробів, тоді як інші - мають додаткову здатність ефективно знищувати бактерії та спори грибів [55].

«Saraclean C» – препарат, що готовий до використання в нерозбавленому вигляді призначений та придатний для швидкої обробки поверхонь. Засіб очищає поверхню від потенційно небезпечних бактерій, вірусів і грибків. Створено за оригінальною японською формулою. Знищує 99,9% мікробів.

Особливості засобу:

- призначений для дезінфекції поверхонь усіх галузей промисловості, хірургії, лабораторій тощо;
- не потребує змивання;
- викликає загибель грампозитивних та грамнегативних бактерій, бактерії туберкульозу, різного типу грибів та вірусів;
- має миючі та знежирювальні властивості;
- не містить віддушки та барвників [59].

«Clean Pro Surface» – рідкий дезінфікуючий засіб, що володіє захисним, очищувальним та підсушуючим ефектами. Швидкість дії такого засобу є достатньо високою – 15 секунд. Сфера застосування:

- 1) дезінфекція поверхонь, приміщень, обладнання, меблів;
- 2) стоматологічних інструментів;
- 3) виробів медичного призначення;
- 4) лабораторного обладнання;
- 5) перукарського, косметологічного та манікюрного інструменту;
- 6) санітарного обладнання [60].

Узагальнену інформацію щодо обраних засобів, призначених для проведення санітарної підготовки виробництва оцтової кислоти представлено у табл. 4.1.

Порівняльна характеристика обраних миючих та дезінфекційних засобів

Назва препарату	Склад засобу	Спектр дії	Потрібний об'єм для обробки 1 м ²	Термін зберігання. Ціна за 1 л
1	2	3	4	5
«Бланідас-Ц Фоам-МС»	збалансована суміш лужних миючих компонентів, ПАР, інгредієнтів з хелатуючим ефектом з високим вмістом активного хлору	Поверхнево активні речовини у поєднанні з лугом утворюють систему, що ефективно видаляє забруднення. Активний хлор, що міститься в засобі, служить для видалення протеїну, що допомагає вирішити проблему протеїнових плівок, що в'їдаються.	Концентрація робочого розчину від 2 до 10 % залежно від ступеня та типу забруднення	2 роки, 120 грн [56, 57]
Каустична сода	Їдкий натр	Для видалення жирових і білкових забруднень з технологічного обладнання, трубопроводів і ємностей у виробничих приміщеннях і цехах	Обладнання промити водою (t=30-40°C), потім залити систему трубопроводів і ємностей 2% робочим розчином (t=50-60°C)	1 рік, 28,6 грн [58]

«Saraclean C»	100 мл розчину містить активної речовини 60 мл етанолу та бензалконій хлориду 0,1 г	Має широкий спектр антимікробної дії по відношенню до транзиторної та резидентної мікрофлори. Активний до бактерій, включаючи <i>Mycobacterium terrae</i> (туберкулоцидну активність), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ; грибів роду <i>Candida</i> , вірусів – герпесу, грипу (H1N1, H5N1), ротавірус, риновіруси, коронавірусу (BCV).	Норма витрати 100 мл робочого розчину на 1 м ² обробленої площі. Розчин є готовим до використання	2 роки, 155 грн [59]
«Clean Pro Surface»	вміст діючих речовин, мас. %: спирт етиловий - 70,0; Ізопропанол - 2,0%, дидецилдиметиламоній хлорид - 0,025-0,046 перекис водню в межах 0,2-0,5%.	Засіб виявляє бактерицидні (включаючи збудників внутрішньолікарняних інфекцій, мікобактерій туберкульозу, мультирезистентного стафілококу (MRSA), ентерогеморагічну кишкову паличку, синьогнойну паличку, сальмонели та інші антибіотикорезистентні бактерії), віруліцидні (включаючи парентеральні вірусні гепатити (B,C), вірус СНІД (ВІЛ), папова-, адено-, поліома-, поліо-, норо-, рота-, ентеро-, вакциніявіруси, SARS, віруси герпесу, віруси грипу, вірус «пташиного грипу» А(H5N1), вірус «свинячого грипу» А(H1N1) тощо, фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, трихофітій) властивості.	Норма витрати 100 мл робочого розчину на 1 м ² обробленої площі. Розчин є готовим до використання	2 роки, 195 грн [60]

Враховуючи узагальнену інформацію про спектр дії, склад та ціну мийно-дезінфікуючих засобів, зупиняємо свій вибір саме на «Бланідас-Ц Фоам-МС» (підготовка поверхонь та обладнання) та каустичній соді (миття

трубопроводів та обладнання). Використання таких засобів буде економічно вигіднішим.

4.4. Обґрунтування способу приготування та стерилізації компонентів поживного середовища для одержання інокуляту і виробничого біосинтезу оцтової кислоти

Відповідно до вищенаведених розрахунків виробничий біосинтез оцтової кислоти проводимо у ферментері об'ємом 6,3 м³. Посівний матеріал одержуємо у 5 етапів: у колбах на качалці, інокуляторах об'ємом 630, 60 і 6 л та посівному апараті на 6,3 м³. Поживне середовище для одержання інокуляту має такий склад (г/л):

- етанол – 32;
- оцтова кислота – 10;
- дріжджовий екстракт – 10;
- глюкоза – 10;
- CaCO₃ – 15.

Для виробничого біосинтезу поживне середовище дещо відрізняється та має такий склад (г/л):

- етанол – 36;
- оцтова кислота – 12;
- глюкоза – 5;
- дріжджовий екстракт – 5;
- MgSO₄ – 0,4;
- KН₂PO₄ – 0,6.

Аби забезпечити стерильність усього терміну виробництва цільового продукту, на наступному етапі потрібно провести правильний композиційний поділ.

Поділ на композиції будемо здійснювати за температурним режимом. Такі компоненти як етанол і оцтову кислоту у поживне середовище будемо

вносити без попередньої стерилізації. Термолабільні складові середовища (глюкоза, дріжджовий екстракт) не плануємо піддавати дії високої температури. По-перше, глюкоза здатна до карамелізації при високому температурному режимі, а по-друге, дріжджовий екстракт за тих же умов може розкластися. Солі (карбонат кальцію, сульфат магнію та дигідроортофосфат калію) піддаємо жорсткішій стерилізації, через умови до їх зберігання у складських приміщеннях.

Оскільки у складі середовища наявна оцтова кислота, а також така речовина є цільовим продуктом, потрібно передбачити підготовку розчинів титрувальних агентів, аби рН середовища у процесі культивування був на рівні 6,8 – 7,0. Розрахунок необхідних об'ємів таких розчинів, а також етанолу та оцтової кислоти, і визначення із потрібним обладнанням для їх приготування наведено у табл. 4.2. Етанол вноситься концентрацією 96%, густина якого становить 0,8014 кг/л, а оцтова кислота – 98%, густина якої 1,05 кг/л. такі речовини не піддають стерилізації, а безпосередньо вносять перед культивуванням.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	Етанол		Оцтова кислота		HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, кг	Вміст, л	Вміст, кг	Вміст, л	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,28	0,009	0,01	0,0027	0,003	0,56	у колбі на 2 л	0,56	у колбі на 2 л
3,06	0,1	0,12	0,03	0,029	6,12		6,12	
30,3	1,152	1,44	0,36	0,34	60,6		60,6	
340	11,23	14,01	3,51	3,34	680		680	
3 270	94,34	117,72	41,2	39,24	6 540	у реакторі на 10 л	6 540	у реакторі на 10 л

1. Особливості підготовки поживного середовища для одержання посівного матеріалу у колбах на качалці та інокуляторі об'ємом 6 л

Для вирощування інокуляту у 2 качалочних колбах та інокуляторі на 6 л потрібно підготувати 280 мл та 3,06 л середовища відповідно. Приготовані об'єми середовищ стерилізуємо в автоклаві. Зважаючи на температурні умови, склад композицій буде таким:

Композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза. Режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція Б: СаСО₃. Режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, протягом 40 хв.

2. Особливості підготовки поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 і посівному апараті на 630 л

Для одержання посівного матеріалу на даних етапах необхідно підготувати 30,3 і 340 л середовища відповідно. Стерилізація композиції Б буде проводити безпосередньо в інокуляторі та посівному апараті, але поділ на композиції залишається із попередньої стадії:

Композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза. Режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція Б: СаСО₃. Режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, протягом 40 хв.

3. Особливості приготування і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м³

Для виробничого біосинтезу оцтової кислоти необхідно підготувати поживне середовище об'ємом 3 270 л. Стерилізація композиції Б буде проводити безпосередньо у ферментері, але принцип поділу на композиції залишається із попередніх стадій:

Композиція А: дріжджовий екстракт, глюкоза. Режим стерилізації: 112 °С, тиск 0,05 МПа протягом 20 – 30 хв.

Композиція Б: MgSO_4 , KH_2PO_4 . Режим стерилізації: 131 °С, тиск 0,15 МПа, протягом 40 хв.

Продовження табл. 5.1

T-8	Теплообмінник охолодження	1	Кожухотрубний теплообмінник. Матеріал корпусу: нерж. сталь AISI304. Робоча температура: від -60°C до +350°C. Потужність: 0,1 кВт. Номінальний робочий тиск: 2,5 МПа. Витрата: 10 – 80 л/хв [66].
P-9	Ресивер	1	Ресивер газоповітряний горизонтальний. Матеріал: нержавіюча сталь. Номінальний тиск: 3 МПа. Температура: від -35 до +45 °С. Виробник: Україна [67].
T-10	Теплообмінник нагрівання	1	Кожухотрубний підігрівач. Матеріал корпусу: нерж. сталь AISI316. Робоча температура: від -60°C до +400°C. Потужність: 0,1 кВт. Номінальний робочий тиск: 4 МПа. Витрата: 10 – 80 л/хв [68].
Ф-11	Фільтр для тонкої очистки	1	Фільтр тонкої очистки серії Futura, 0,3 мкм, розміри різьби від 1/4 до 1 дюйма. Матеріал: поліамід. Температура: -10 °С до +50 °С. Тиск максимальний: 16 бар. Фільтрація: 0,3 мкм [69].
ІФ-12, ІФ-16, ІФ-23, ІФ-33	Фільтр для індивідуального очищення	4	Фільтр у сталевому корпусі ВФ. Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно. Робочий тиск: 16 бар. Температура: 1,5-65 °С. Ступінь очищення повітря фільтром: 99,999 % [70].
I-13	Інокулятор	1	Інокулятор Minifors 2 об'ємом 6 л. Матеріал: боросилікатне скло; прямий привід - до 1600 об/хв; робота з газами – повітря, повітря/О ₂ , або повітря/Ν ₂ ; цифрові датчики рН та рО ₂ ; габарити, Ш × Г × В, мм - 455 × 375 × 740 [71].
P3-14	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Реактор 25л – являє собою ємність з нержавіючої сталі технічних або харчових марок AISI 304 або AISI 316, оснащена теплоізолюваною сорочкою нагріву, приводом обертання, вузлом ущільнення, валом з рамною мішалкою і щитом управління. Підтримує температуру до 160 °С. Габарити: 520 x 450 x 600 мм [72].

Продовження табл. 5.1

РЗ-15	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Реактор-змішувач на 10 л. Діапазон температур: -120 °С ~ 250 °С. Матеріал: боросилікатне скло високої якості. Контролер обертів: 1200 об/хв. Габарити: 420 x 350 x 450 мм [73].
І-17	Інокулятор	1	Інокулятор РФ-60 на 60 л. Матеріал: сталь AISI 316 L (контактуюча з продуктом частина), сталь AISI 304 (не контактуюча); робоча температура: +0 ...+40 (122 при стерилізації); потужність: 0,8 кВт; швидкість мішалки: 0-300 об/хв (плавно-регульовальна); габарити: 1437 x 856 x 1580 мм [74].
Д-18, Д-20, Д-25, Д-28	Ваговий дозатор для зважування компонентів поживного середовища	4	Шнековий дозатор СВЕДА ДВС-301-50-3. Висока $\pm 0,5\%$ точність; діапазон дозування: 10 – 50 кг [75].
РЗ-19	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Хімічний реактор об'ємом 250 л. Матеріал: нержавіюча сталь 316; частота обертів мішалки: 1450 об/хв; потужність: 2 кВт; габарити: 1700 x 900 мм [76].
РЗ-21	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Апарат перемішувачий на 160 л. Робоча температура: до 85 °С; мішалка частотою обертів 300 об/хв; матеріал: нержавіюча харчова сталь AISI 304; габарити: 1040 x 930 x 2900 мм [77].
Н-22	Відцентровий насос для перекачування композиції Б	1	NOVAX G 20 HP 0.6 шестеренчатий насос. Продуктивність: 0,9 м ³ /год [78].
ПА-24	Посівний апарат	1	Посівний апарат type DIN AE 630 об'ємом 630 л. Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; частота обертів мішалки: до 1600 об/хв (додатково встановлена); наявні датчики температури, кисню і рН; габарити: 2600 x 1000 мм [79].
РЗ-26	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції А	1	Апарат перемішувачий на 2,5 м ³ . Виробник: «СанТермо»; температура: до 150 °С; матеріал: нерж. сталь AISI 304; мішалка частотою обертів 300 об/хв; габарити: 2030 x 2030 x 4060 мм [77].

Закінчення табл. 5.1

Н-27	Відцентровий насос для перекачування композиції А до ФР-34	1	Насос поверхневий Speroni CAM 200. Виробник: Італія; максимальна продуктивність: до 6 м ³ /год; тиск: до 8 бар; матеріал: чавун [80].
РЗ-29	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	1	Апарат перемішувачий на 160 л. Робоча температура: до 85 °С; мішалка частотою обертів 300 об/хв; матеріал: нержавіюча харчова сталь AISI 304; габарити: 1040 x 930 x 2900 мм [77].
РЗ-30	Відцентровий насос для перекачування композиції Б до ФР-34	1	Насос NOVAX G 20 HP 0.8 шестеренчатий. Виробник: ROVER POMPE; максимальна продуктивність: до 1,75 м ³ /год [81].
РЗ-31	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації лужного агенту	1	Реактор WRS-1503-011 об'ємом 10 л. Матеріал: боросилікатне скло високої якості; температурний діапазон: -60~200 °С; швидкість перемішування: до 500 об/хв. Габарити: 720x600x2080 мм [82].
РЗ-32	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації кислотного агенту	1	Реактор WRS-1503-011 об'ємом 10 л. Матеріал: боросилікатне скло високої якості; температурний діапазон: -60~200 °С; швидкість перемішування: до 500 об/хв. Габарити: 720x600x2080 мм [82].
ФР-34	Ферментер	1	Посівний апарат type DIN AE 6300 об'ємом 6,3 м ³ . Матеріал: нержавіюча сталь AISI 316L; частота обертів мішалки: до 1600 об/хв (додатково встановлена); наявні датчики температури, кисню і рН; габарити: 5290 x 2100 мм [83].
Н-35	Відцентровий насос	1	BZ 40-125/2.2 - відцентровий моноблочний насос з нержавіючої сталі. Максимальна продуктивність: до 20 м ³ /год; тиск: до 10 бар [84].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

Технологічна схема проєктованого виробництва оцтової кислоти *Acetobacter pasteurianus* СІСІМ В7003-02 включає в себе етапи допоміжних робіт (санітарну підготовку виробництва, підготовку стерильного аераційного повітря, підготовку розчинів титрувальних агентів, приготування та стерилізацію поживних середовищ) та технологічного процесу (підготовку посівного матеріалу та виробничий біосинтез).

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка мийно-дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування робочого розчину «Бланідас-Ц Фоам-МС»

Необхідний об'єм робочого розчину «Бланідас-Ц Фоам-МС» концентрацією 3% становить 80 л. Даний об'єм розчину готують у реакторі-змішувачі (РЗ-1) об'ємом 100 л шляхом подавання відповідного концентрату у кількості 2,4 л та питної води об'ємом 77,6 л. Приготований робочий розчин далі охолоджують та використовують на наступних стадіях шляхом перекачування за використання відцентрового насосу (Н-2) (Кх 1.1.1).

ДР 1.1.2. Приготування робочого розчину каустичної соди

Кількість робочого розчину каустичної соди концентрацією 2% становить 80 л. Даний об'єм розчину готують у реакторі-змішувачі (РЗ-3) об'ємом 100 л шляхом подавання 1,6 кг порошку їдкого натру та питної води об'ємом 80 л. Готовий робочий розчин далі охолоджують та використовують на наступних етапах шляхом перекачування за використання відцентрового насосу (Н-4) (Кх 1.1.2).

					НУХТ БТЕК 05.01.29 КР ПЗ			
<i>Зм</i>	<i>Дпк</i>	<i>№</i>	<i>Пілпи</i>	<i>Лат</i>	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ЛІТІРНОЇ КИСЛОТИ	<i>Літен</i>	<i>Дпкв</i>	<i>Дпквітв</i>
<i>Розпобн</i>	<i>Чернецька</i>							52
<i>Керівник</i>	<i>Каппаш Ю</i>						52	102
<i>Н кхтп</i>						Кафедра БТМ		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав каф</i>	<i>Стабніков</i>							

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Прибирання щоденне

Для забезпечення безпеки та якості продукції, що виробляється, також необхідно проводити щоденне прибирання виробничих приміщень (зокрема, підлоги). Це дозволяє видаляти забруднення та мікроорганізми, які можуть бути джерелом інфекції та забруднення продукції. Прибирання має проводитись з використанням спеціальних засобів та обладнання, які забезпечують ефективне видалення забруднень та мікроорганізмів. Обов'язковим після завершення прибирань є проведення мікробіологічного контролю, який оцінюється за показником КУО ($<800/\text{см}^2$) (Км 1.2.1).

ДР 1.2.2. Прибирання генеральне

Також важливо проводити генеральні прибирання виробничих приміщень з регулярністю, щоб усунути більш глибокі забруднення. Під час генерального прибирання необхідно використовувати спеціальні засоби (робочий розчин «Бланідас-Ц Фоам-МС» від ДР 1.1.1) та обладнання, які дозволяють ефективно очищати приміщення від бруду та мікроорганізмів. Обов'язковим після завершення прибирань є також проведення мікробіологічного контролю, який оцінюється за показником КУО. На такому етапі відповідний показник встановлений за значенням $<300/\text{см}^2$ (Км 1.2.2).

ДР 1.3. Підготовка обладнання і комунікацій

ДР 1.3.1. Здійснення миття обладнання

Миття обладнання проводять з використанням робочого розчину каустичної соди з концентрацією 2% (від ДР 1.1.2), що попередньо нагрівають до температури 55°C. Миття обладнання здійснюється автоматизовано, за допомогою СІР-мийки, при цьому використовується мийний засіб в об'ємі 20% від геометричного об'єму обладнання. Обробка здійснюється протягом 15-20 хвилин, після чого відпрацьований розчин подають на відновлення або зливають. Після завершення миття обладнання промивається питною водою таким же чином, відпрацьована вода йде на переробку (Кт 1.3.1).

ДР 1.3.2. Технічний огляд помитого обладнання

Після миття технологічного обладнання необхідно провести технічний огляд, щоб переконатися в його правильному функціонуванні та відсутності пошкоджень. Також варто перевірити, чи не залишилися залишки мийних засобів на обладнанні, які можуть негативно вплинути на якість продукту. Також обов'язковою є виявлення можливих неущільнень у запірній арматурі обладнання та комунікацій (Кт 1.3.2).

ДР 1.3.3. Проведення перевірки обладнання на герметичність

Перед проведенням перевірки на герметичність уся запірна арматура закривається і до апарату подається аераційне повітря задля досягнення тиску на рівні 0,1 – 0,2 МПа. Далі закривається вентиль подачі повітря і фіксується час витримки (30 – 60 хв) і показання тиску, встановлених на манометрі. Якщо тиск падає більше, ніж на 0,01 МПа, потім здійснюється пошук неущільнень

Пошук неущільнень проходить за використання шестифтористого сульфуру – легкої галогенвмісної речовини. Таку речовину подають у незначному об'ємі, закривають запірну арматуру, апарат, що перевіряється, нагрівають до температури 80 °С. Тиск повинен становити 0,2 МПа, час проведення операцій – 1 година. Якщо неущільнення будуть виявлені, здійснюють перевірку за вище зазначеними етапами (Кт 1.3.3).

ДР 1.3.4. Здійснення стерилізації

Забезпечення стерильності технологічного обладнання є невід'ємною частиною процесу виробництва та має отримувати достатню увагу та ресурси. Для цього відбувається подача глухої пари до сорочки апарату, що стерилізується. Таким чином температура в апараті досягається 80 – 90 °С. Потім через попередньо відкриту запірну арматуру подається гостра пара в апарат. Після того, як температура в апараті досягається 130 – 135 °С та витримування заданого часу, вся запірна арматура, окрім парової, закривається. Згодом холодна вода подається до сорочки апарату, а стерильне

повітря безпосередньо в сам апарат. Простерилізований таким чином апарат охолоджують ($t=30 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$; $p_{\text{надл}} = 0,003 - 0,005 \text{ МПа}$) (Кт 1.3.4).

ДР 1.4. Підготовка персоналу виробництва оцтової кислоти

ДР 1.4.1. Навчання персоналу

Для забезпечення санітарної підготовки персоналу необхідно проводити регулярне навчання та тренінги за правилами гігієни, мікробіології та виробництва продукції в асептичних умовах. Це може бути організовано у формі лекцій, практичних занять, семінарів та тренінгів. Також слід розробити програму навчання, яка включатиме основні принципи санітарної підготовки персоналу, а також практичні навички та вміння.

Важливо також проводити регулярні перевірки знань та навичок персоналу, щоб переконатися, що всі співробітники справді засвоїли необхідні знання та вміння. Для цього можна використати тестування, практичні завдання та інші методи оцінки знань.

ДР 1.4.2. Санітарна підготовка

Для миття рук використовується господарське чи туалетне мило, а для дезінфекції – розчин етилового спирту з концентрацією 76%. Крім того, необхідно забезпечити доступність необхідних засобів індивідуального захисту для персоналу, таких як маски, рукавички, захисні окуляри та інші засоби захисту від інфекцій та бактерій.

ДР 2. Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 2.1 Забір повітря у найвищій точці

За використання вертикального повірозабірника (ПЗ-5) відбувається забір атмосферного повітря у найвищій точці проектного виробництва, а саме – 10 метрів (Кт 2.1).

ДР 2.2. Очищення повітря на фільтрі від грубих часток

На наступному етапі здійснюється попередня очистка забраного повітря від грубих часточок і пилу 50 мкм на відповідному фільтрі (Ф-6) (Кт 2.2).

ДР 2.3. Компресування повітря

Потім попередньо очищене повітря стискають на компресорі (К-7), в якому воно нагрівається до температури від 120 до 200 °С (Кт 2.3).

ДР 2.4. Охолодження очищеного повітря і позбуття від вологи

Далі стиснене повітря необхідно охолодити до температури «точки роси». Даний процес проходить у теплообміннику-охолоджувачі (Т-8). Протягом процесу охолодження повітря утворюється зайва волога, позбутися якої потрібно за використання ресиверу (Р-9) (Кт 2.4).

ДР 2.5. Нагрівання у теплообміннику

Наступним кроком повітря нагрівають у відповідному теплообміннику (Т-10) задля стабілізації показників. Температура повітря на цьому етапі складає 45 – 50 °С (Кт 2.5).

ДР 2.6. Тонке очищення повітря

Далі підігріте повітря проходить через фільтр головної очистки (Ф-11). Ступінь очистки після проходження має становити 95 % (Кт 2.6).

ДР 2.7. Очищення в індивідуальних фільтрах

На наступній стадії повітря проходить через індивідуальні фільтри (ІФ-12, ІФ-16, ІФ-23, ІФ-33), що розташовані на відповідних інокуляторах (І-13, І-17), посівному апараті (ПА-24) і ферментері (ФР-34). Ступінь очищення на такій стадії складає до 99,999% (Кт 2.7).

ДР 3. Підготовка розчинів титрувальних агентів

ДР 3.1. Підготовка 6%-го розчину натрію гідроксиду

ДР 3.1.1. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища у колбах на качалці та інокуляторах на 6, 60, 630 л

Оскільки на даному етапі необхідно приготувати 750 мл 6%-го розчину NaOH, то на технічних вагах зважують 45 г кристалічного їдкого натру. Одержану таким чином наважку переносять у колбу об'ємом 2 л, додають за використання мірного циліндру 750 мл дистильованої води і закривають ватно-марлевою пробкою. Отриманий розчин стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 3.1.1).

ДР 3.1.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину натрію гідроксиду для підлужнення середовища у ферментері об'ємом 6,3 м³

Оскільки на даному етапі необхідно приготувати 6,54 л 6%-го розчину NaOH, то на технічних вагах зважують 392,4 г кристалічного їдкого натру. Одержану таким чином наважку переносять у реактор-змішувач об'ємом 10 л (РЗ-31), додають за використання лічильника 6,54 л питної води і вмикають мішалку. Отриманий розчин стерилізують у даному реакторі при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 3.1.2).

ДР 3.2. Підготовка 6%-го розчину соляної кислоти

ДР 3.2.1. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища у колбах на качалці та інокуляторах на 6, 60, 630 л

Для приготування 750 мл 6%-го розчину HCl слід у колбу об'ємом 2 л внести 628 мл дистильованої води за використання мірного циліндра і додати за допомогою мірного циліндра при постійному змішуванні 122 мл 37%-го розчину хлоридної кислоти (Кх 3.2.1).

ДР 3.2.2. Приготування 6%-го розчину соляної кислоти для підкислення середовища у ферментері об'ємом 6,3 м³

Для приготування 6,54 л 6%-го розчину HCl слід у реактор-змішувач об'ємом 10 л (РЗ-32) внести за використання лічильника 1,06 л питної води і додати за допомогою лічильника із увімкненим перемішувачем пристроєм 5,48 л 37%-го розчину хлоридної кислоти (Кх 3.2.2).

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

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

Розрахований вміст кожного із компонентів для приготування середовища для одержання посівного матеріалу у колбах на качалці представлено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Склад композицій для одержання інокуляту у колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для середовища об'ємом 280 мл, г (мл)	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Дріжджовий екстракт	10	2,8	А	167
Глюкоза	10	2,8		
Вода		167		
CaCO ₃	15	4,2	Б	100
Вода		100		
Етанол	32	10	-	10
Оцтова кислота	10	3	-	3
Усього				280

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

За використання технічних вагів зважують по 2,8 г дріжджового екстракту і глюкози. Одержані наважки переносять у колбу об'ємом 500 мл, додають за допомогою мірного циліндра 167 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Кх, Км 4.1.1).

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 4,2 г кальцію карбонату і переносять таку наважку у колбу на 250 мл. У колбу згодом також додають за використання мірного циліндра 100 мл дистильованої води, ретельно перемішують, закривають пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 4.1.2).

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

Слід обов'язково враховувати, що на інокулят припадає 10% від об'єму середовища (306 мл). У табл. 6.2 зазначено розраховані дані щодо кількостей компонентів, потрібних для підготовки середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі на 6 л.

Таблиця 6.2

Склад композицій для одержання посівного матеріалу в інокуляторі на 6 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для середовища об'ємом 3,06 л, г (мл)	Композиції	Об'єм композиції V, мл
Дріжджовий екстракт	10	30,6	А	1500
Глюкоза	10	30,6		
Вода		1500		
СаСО ₃	15	46	Б	1411
Вода		1411		
Етанол	32	120	-	120
Оцтова кислота	10	29	-	29
Усього				3060

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

За допомогою технічних вагів зважують по 30,6 г дріжджового екстракту і глюкози. Одержані наважки переносять у колбу об'ємом 3 л, додають за допомогою мірного циліндра 1500 мл дистильованої води, перемішують, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв (Кт, Кх, Км 4.2.1).

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 46 г кальцію карбонату і переносять таку наважку у колбу на 2 л. У колбу потім також додають за використання мірного циліндра 1411 мл дистильованої води, ретельно перемішують, закривають пробкою та стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 4.2.2).

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

Необхідним є врахування того, що на інокулят припадає 10% від об'єму середовища (3,03 л). Також 10% складає конденсат, утворюваний у процесі стерилізації. У табл. 6.3 наведено розрахований вміст компонентів, потрібних для підготовки середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі на 60 л.

Таблиця 6.3

Характеристика композицій для одержання посівного матеріалу в інокуляторі на 60 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Необхідна кількість для середовища об'ємом 30,3 л, г (л)	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	10	303	А	20
Глюкоза	10	303		
Вода		17,4		
Конденсат		2		
CaCO ₃	15	455	Б	8,52
Вода		7,2		
Конденсат		0,852		
Етанол	32	1,44	-	1,44
Оцтова кислота	10	0,34	-	0,34
Усього				30,3

ДР 4.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують по 303 г дріжджового екстракту і глюкози. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 25 л (РЗ-14),

додають за допомогою лічильника 17,4 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для поліпшення розчинення компонентів необхідно підтримувати температуру в реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку реактора. Отриманий розчин піддають стерилізації у такому реакторі за температури 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хвилин (Кт, Кх, Км 4.3.1).

ДР 4.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою технічних вагів зважують 455 г кальцію карбонату і переносять таку наважку у реактор-змішувач на 10 л (РЗ-15), додають за допомогою лічильника 7,2 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для поліпшення розчинення компонентів необхідно підтримувати температуру в реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку реактора. Отриманий розчин подають самоплином в інокулятор на 60 л (І-17) і піддають стерилізації за температури 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 4.3.2).

ДР 4.4. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 630 л

Потрібно врахувати, що на інокулят припадає 10% від об'єму поживного середовища (34 л). Також 10% складає конденсат, утворюваний у процесі стерилізації. У табл. 6.4 наведено розрахований склад компонентів, потрібних для підготовки середовища з метою одержання інокуляту у посівному апараті на 630 л.

Характеристика композицій для одержання інокуляту в посівному апараті на 630 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для середовища об'ємом 340 л, кг (л)	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	10	3,4	А	200
Глюкоза	10	3,4		
Вода		173,2		
Конденсат		20	Б	123
СаСО ₃	15	5,1		
Вода		105,6		
Конденсат		12,3		
Етанол	32	14,01	-	14,01
Оцтова кислота	10	3,34	-	3,34
Усього				340

ДР 4.4.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-18) зважують по 3,4 кг дріжджового екстракту і глюкози. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 250 л (РЗ-19), додають за допомогою лічильника 173,2 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для поліпшення розчинення компонентів необхідно підтримувати температуру в реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку реактора. Отриманий розчин піддають стерилізації у такому реакторі за температури 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хвилин (Кт, Кх, Км 4.4.1).

ДР 4.4.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатора (Д-20) зважують 5,1 кг кальцію карбонату і переносять таку наважку у реактор-змішувач на 160 л (РЗ-21), додають за допомогою лічильника 105,6 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для поліпшення розчинення компонентів необхідно підтримувати температуру в реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку реактора. Отриманий розчин перекачують відцентровим

насосом (Н-22) у посівний апарат на 630 л (ПА-24) і піддають стерилізації за температури 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 4.4.2).

ДР 4.5. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 6,3 м³

Необхідно врахувати, що на посівний матеріал припадає 10% від об'єму поживного середовища (327 л). Також 10% складає конденсат, утворюваний у процесі стерилізації. У табл. 6.5 представлено розрахований склад компонентів, потрібних для підготовки середовища з метою виробничого біосинтезу у ферментері на 6,3 м³.

Таблиця 6.5

Характеристика композицій для виробничого біосинтезу у ферментері на 6,3 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування середовища об'ємом 3270 л, кг (л)	Композиції	Об'єм композиції V, л
Дріжджовий екстракт	5	16,35	А	2000
Глюкоза	5	16,35		
Вода		1767		
Конденсат		200		
MgSO ₄	0,4	1,3	Б	1113
KN ₂ PO ₄	0,6	1,96		
Вода		998		
Конденсат		111,3		
Етанол	36	117,72	-	117,72
Оцтова кислота	12	39,24	-	39,24
Усього				3270

ДР 4.5.1. Приготування і стерилізація композиції А

На ваговому дозаторі (Д-25) зважують по 16,35 кг дріжджового екстракту і глюкози. Одержані наважки переносять у реактор-змішувач об'ємом 2,5 м³ (РЗ-26), додають за допомогою лічильника 1767 л питної води і вмикають перемішувач. Для поліпшення розчинення компонентів необхідно підтримувати температуру в реакторі на рівні 40 °С, що досягається

шляхом подачі пари у сорочку реактора. Отриманий розчин піддають стерилізації у такому реакторі за температури 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хвилин (Кт, Кх, Км 4.5.1).

ДР 4.5.2. Приготування і стерилізація композиції Б

За допомогою вагового дозатора (Д-28) зважують 1,3 кг сульфату магнію, 1,96 кг дигідрофосфату калію і переносять таку наважку у реактор-змішувач на 1,6 м³ (РЗ-29), додають за допомогою лічильника 998 л питної води і вмикають перемішуючий пристрій. Для поліпшення розчинення компонентів необхідно підтримувати температуру в реакторі на рівні 40 °С, що досягається шляхом подачі пари у сорочку реактора. Отриманий розчин перекачують відцентровим насосом (Н-30) у ферментер на 6,3 м³ (ФР-34), подають 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 3.2.2), доводячи таким чином рН до 4,0 – 4,5 і піддають стерилізації за температури 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв (Кт, Кх, Км 4.5.2).

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-025 зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі, зокрема на середовищі №597 [33] при температурі 2 – 4 °С. Щомісяця або 2 рази на місяць проводять пересів на свіжоприготоване середовище. Під час роботи з такою колекційною культурою обов'язково дотримуються правил асептики (Кт, Км 5.1).

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Пересів колекційної культури *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-025 від ТП 5.1 проводять на чашки Петрі із агаризованим середовищем №597 з метою отримання ізольованих колоній. Робочу культуру вирощують у термостаті при температурі 30 °С протягом 24 годин (Кт, Км 5.2).

ТП 5.3. Вирощування інокуляту на щільному середовищі

Для пересіву ізольованих колоній бактеріального продуцента від *ТП 5.2* використовують петлю для перенесення на пробірки зі скошеним середовищем №597. Для засіву однієї пробірки використовують одну ізольовану колонію. Інокулянт вирощують протягом 24 годин при температурі 30 °С. Для здійснення мікробіологічного контролю відбирають пробу з пробірок кожні 4 години (Кт, Км 5.3).

ТП 5.4. Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці

У стерильних умовах у колбу об'ємом 500 мл зі стерильною композицією А (від *ДР 4.1.1*) вносять простерилізовану композицію Б (від *ДР 4.1.2*), вносять 10 мл етанолу, 3 мл оцтової кислоти, перемішують та розливають по 100 мл у 2 попередньо простерилізовані качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з попередньо одержаною робочою культурою від *ТП 5.3* додають 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини за допомогою стерильної піпетки. Готову бактеріальну суспензію відбирають піпеткою і вносять у качалочні колби. Слід врахувати, що для засіву 1 колби, використовують бактеріальну суспензію з 1 пробірки.

Процес вирощування проводять на качалках зі швидкістю 200 обертів на хвилину при температурі 30 °С протягом 24 годин. Для регуляції кислотності у процесі культивування доводять рН до 6,8 – 7,0 шляхом подачі 6%-ого розчину NaOH (від *ДР 3.1.1*) та 6%-ого розчину соляної кислоти (від *ДР 3.2.1*). Після цього визначають концентрацію клітин, яка повинна складати 6×10^8 КУО/мл [4], і здійснюють мікробіологічний контроль. Після контролю культуральну рідину переливають в засівну колбу об'ємом 1 літр (Кт, Км 5.4).

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л

В інокулятор об'ємом 6 л (І-13) вносять простерилізовані композиції А (від *ДР 4.2.1*) і Б (від *ДР 4.2.2*), 120 мл етанолу, 29 мл оцтової кислоти, вмикають мішалку. Через засівну колбу вносять посівний матеріал від *ТП 5.4*. Культивування здійснюють за температури 30 °С і концентрації розчиненого

кисню (20 – 30 % від насичення повітря) протягом 24 год. Для регуляції кислотності у процесі культивування доводять рН до 6,8 – 7,0 шляхом подачі 6%-ого розчину NaOH (від ДР 3.1.1) та 6%-ого розчину соляної кислоти (від ДР 3.2.1).

Кожні 4 години з інокулятора беруть проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації клітин. Концентрація клітин повинна бути 6×10^8 КУО/мл (Кт, Км 5.5).

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 60 л

В інокулятор об'ємом 60 л (І-17) із простерилізованою композицією Б самоплином подають простерилізовану композицію А (від ДР 4.3.1), 1,44 л етанолу, 340 мл оцтової кислоти, вмикають мішалку. Самоплином подають із попередньої стадії посівний матеріал (від ТП 5.5). Культивування здійснюють за температури 30 °С і концентрації розчиненого кисню (20 – 30 % від насичення повітря) протягом 24 год. Для регуляції кислотності у процесі культивування доводять рН до 6,8 – 7,0 шляхом подачі 6%-ого розчину NaOH (від ДР 3.1.1) та 6%-ого розчину соляної кислоти (від ДР 3.2.1).

Кожні 4 години з інокулятора беруть проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації клітин. Концентрація клітин повинна бути 6×10^8 КУО/мл (Кт, Км 5.6).

ТП 5.7. Вирощування інокуляту у посівному апараті об'ємом 630 л

У посівний апарат об'ємом 630 л (ПА-24) із простерилізованою композицією Б самоплином подають простерилізовану композицію А (від ДР 4.4.1), 14,01 л етанолу, 3,34 л оцтової кислоти, вмикають мішалку. Самоплином подають із попередньої стадії посівний матеріал (від ТП 5.6). Культивування здійснюють за температури 30 °С і концентрації розчиненого кисню (20 – 30 % від насичення повітря) протягом 24 год. Для регуляції кислотності у процесі культивування доводять рН до 6,8 – 7,0 шляхом подачі 6%-ого розчину NaOH (від ДР 3.1.1) та 6%-ого розчину соляної кислоти (від ДР 3.2.1).

Кожні 4 години із посівного апарату беруть проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації клітин. Концентрація клітин повинна бути 6×10^8 КУО/мл (Кт, Км 5.7).

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м³

У ферментер об'ємом 6,3 м³ (ФР-34) зі стерильною композицією Б, відцентровим насосом (Н-27) перекачують простерилізовану композицію А (від ДР 4.6.2), подають через лічильник 1534,7 л етанолу, 327,3 л оцтової кислоти, вмикають мішалку. Через трубу перетискування подають із попередньої стадії посівний матеріал (від ТП 5.7). Культивування здійснюють за температури 30 °С і концентрації розчиненого кисню (20 – 30 % від насичення повітря) протягом 20 год. Для регуляції кислотності у процесі культивування доводять рН до 6,8 – 7,0 шляхом подачі 6%-ого розчину NaOH (від ДР 3.1.2) та 6%-ого розчину соляної кислоти (від ДР 3.2.2).

Кожні 4 години та після завершення біосинтезу із ферментера беруть проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації клітин і оцтової кислоти. Концентрація клітин повинна бути 6×10^8 КУО/мл, а оцтової кислоти – $93,09 \pm 0,24$ г/л (Кт, Км 6.1).

Після завершення процесу біосинтезу (досягнення вище зазначеного значення концентрації оцтової кислоти) культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-35) у спеціальний збірник.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ

7.1. Мікробіологічний контроль виробництва

Як зазначено раніше (див. розділ 4.1), для синтезу оцтової кислоти використовується вирощування бактеріального продуцента *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02 в асептичних умовах. Тому на кожному з етапів виробництва даного цільового продукту необхідним є здійснення мікробіологічного контролю.

Для перевірки чистоти культур мікроорганізмів, стерильності поживних середовищ і посівного матеріалу проводиться висівання на поживні середовища. Культуральну рідину розсіюють петлею на окремі колонії на чашках Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, суло-агаром (СА) або картопляно-глюкозним агаром (КГА) – для виявлення дріжджів і грибів. Інкують при 37 °С (МПА) та при 24 – 26 °С (СА або КГА) протягом 24 годин [85].

Після вирощування в термостаті чашки перевіряють візуально, щоб виявити наявність зовнішньої мікрофлори. На чашках з посівами культуральної рідини та посівного матеріалу повинні бути присутні лише колонії бактерій штаму *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02, а також повна відсутність сторонньої контамінації. Після вирощування *A. pasteurianus* методом поверхневого висіву на агаризованому середовищі спостерігаються круглі випуклі колонії кремового кольору, що утворюють плівку. У разі аналізу проби поживних середовищ на чашках повинна бути відсутньою будь-яка мікробіота.

У зв'язку зі значною тривалістю (доба) отримання результатів методом висіву на щільних поживних середовищах, часто контроль чистоти культури здійснюється за допомогою мікроскопії.

					НУХТ БТЕК 05.01.29 КР ПЗ			
Зм	Дрк	№	Піппи	Пат	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ	Пітєп	Дркв	ДркVIII
Розробн	Чернецька							68
Керівник	Каплай Ю						68	102
Н контп						Кафедра БТМ		
Консульт								
Зав каф	Стабніков							

Для цього підготовлюють фіксований та забарвлений препарат клітин і досліджують його з використанням імерсійного мікроскопа. За відсутності сторонньої мікробіоти (проба культуральної рідини і посівного матеріалу) у мікроскопі можна побачити мікроорганізм, що є грамнегативною бактерією з паличкоподібною формою, розмірами 1,8 x 0,6 мкм [32]. *A. pasteurianus* є нерухомою і не утворює спори [13]. Під час аналізу проби поживного середовища у полі зору мікроскопу не повинно бути контамінації, що свідчить про стерильність.

7.2. Визначення концентрації джерел карбону (етанол і глюкоза) та азоту (дріжджовий екстракт)

Концентрацію етанолу визначали методом газової хроматографії (ГФ). Попередньо із культуральної рідини одержують супернатант. Для цього використовують центрифужні пробірки, в які наливають 100 мл ретельно перемішаної культуральної рідини. Центрифугування проводять при швидкості 10000 об/хв протягом 3-5 хвилин. Після центрифугування уважно зливають надосадову рідину, а осад промивають злегка підкисленою дистильованою водою (1 мл концентрованого HCl на 1 літр води). Потім повторно проводять центрифугування за того ж режиму швидкості.

Аналіз можна здійснити за використання системи Agilent 7890A GC (Agilent Technologies Investment Co., Ltd., Шанхай, Китай) з капілярною колонкою DB624 30 м × 1,25 мм × 0,4 мкм. N-бутиловий спирт (0,1 мл n-бутилового спирту на мілілітр культуральної рідини) додавали як внутрішній стандарт. Швидкість потоку газу-носія (азоту) становить 30 мл/хв. Температури інжектора та детектора встановлюють на рівні 200 °C та 250 °C відповідно. Температурна програма ГХ капілярної колонки встановлюється такою, що збільшується до 100 °C протягом 1 хв, а згодом підвищується до 190 °C при 15 °C/хв⁻¹ і утримується 3 хв. Відповідно до внутрішньої стандартної кривої та співвідношення площі піку етанолу та n-бутанолового спирту в зразку, розраховується вміст етанолу у культуральній рідині [6].

Іншим джерелом вуглецю у середовищі виступає глюкоза. Один з найпоширеніших методів визначення її концентрації – це використання ферментативного аналізу з використанням глюкозооксидази. Основний принцип цього методу полягає в тому, що глюкоза реагує з глюкозооксидазою, утворюючи глюконову кислоту і перекис водню. Цей перекис водню потім реагує з хромогенним реагентом, що призводить до утворення кольорового продукту. Інтенсивність кольору пропорційна концентрації глюкози у супернатанті.

Відібрану пробу культуральної рідини центрифугують при 10000 об/хв протягом 20 хв. До 1 мл одержаного супернатанту додають 3 мл ензимо-хромогенного реактиву. Змішану пробу з реагентами інкубують при певній температурі, зазвичай приблизно 37 °С, протягом 20 хв. Після інкубації вимірюють оптичну щільність кольорового розчину за допомогою спектрофотометра (при 625 нм) або спеціального аналізатора глюкози. Інтенсивність кольору буде залежати від концентрації глюкози у супернатанті [86].

Як розчин порівняння використовують стандартний розчин глюкози. Згодом концентрацію глюкози визначають за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = \frac{D_{\text{досл.}} \cdot C}{D_{\text{ст}}}$$

де $D_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби; $D_{\text{ст.}}$ – оптична густина розчину стандартного зразка глюкози; C – концентрація глюкози в розчині стандартного зразка [87].

Джерелом амінного азоту у поживному середовищі виступає дріжджовий екстракт. Концентрацію амінного азоту пропонується визначати за використання методу Бредфорда, який є достатньо швидким (10 хвилин) і чутливим. Основний принцип аналізу полягає у використанні барвника Coomassie Brilliant Blue G-250, який зв'язується з денатурованими білками і змінює свою поглинаючу спроможність (465 – 595 нм) [88].

Для побудови стандартної кривої потрібно підготувати розчини білкового стандарту з різними концентраціями (0 – 20 мкг (0–20 мкл 1 мг/мл IgG) у кінцевому об'ємі 20 мкл деіонізованої води). У кожен розчин стандарту додається буфер (10 мкл), а також у дослідні зразки білка в різних об'ємах (попередньо одержаний супернатант). Згодом до стандартів і зразків додається робочий реагент Бредфорда (1 мл), і розчини залишаються протягом певного часу для взаємодії. Після цього зчитують оптичну щільність розчинів за довжиною хвилі 595 нм за допомогою спектрофотометра.

Отримані значення використовують для побудови стандартної кривої, де на осі абсцис будуть значення концентрацій стандарту, а на осі ординат – виміряна оптична гістина. За цією кривою можна визначити концентрацію дріжджового екстракту у дослідних зразках. Важливо дотримуватися протоколу і рекомендацій щодо часу взаємодії, температури та додавання реагентів, щоб забезпечити точність та надійність результатів [89].

7.3. Визначення концентрації біомаси

Концентрацію біомаси визначають за використання вагового методу, що включає в себе такі етапи:

- 1) у духовці висушують порожню чашу для ваг, виготовлену з алюмінієвої фольги/erpendorf. Зважують їх і зберігають в ексікаторі, покритому дрісрітом (безводний CaSO_4).
- 2) пробу культуральної рідини перемішують, щоб рівномірно суспендувати культуру.
- 3) відокремлюють клітини від супернатанту центрифугуванням при 10 000 g протягом 5 хвилин або фільтрацією. У разі центрифугування обережно видаляють прозорий супернатант і зішкрібають клітинну пасту з центрифужної пробірки в чашку для зважування. Промивають центрифужну пробірку кількома мл води. Також наливають воду для полоскання у чашу для ваг. У разі фільтрації культуру виливають у резервуар для зберігання, встановлений на фільтрувальній мембрані.

Для протягування рідини через мембрану застосовується вакуум. Промивають резервуар декількома мл води та видаляють пасту, що прилипла до скляного посуду. Вага сирої культури вимірюється відразу після того, як вся вода витягнута.

- 4) клітинну пасту висушують у духовці, встановленій на 100°C. Періодично вимірюють вагу каструлі/фільтра/еппендорфа плюс клітинної пасти, доки суха вага не зменшиться. Для повного висихання зразка знадобиться 6-24 години, залежно від температури духовки та товщини пасти. Обчислюють різницю у вазі та виражають суху вагу в г/л [90].

7.4. Визначення концентрації оцтової кислоти

Кількісне визначення оцтової кислоти у попередньо одержаному супернатанті проводять методом іонної хроматографії на системі Dionex ICS-2500 (Dionex, Sunnyvale, CA, США), що складається з градієнтного насоса GS50, електрохімічного детектора ED50 та автосамплера AS50, оснащеного ICE-AS6. Хімічне придушення досягається супресором мікромембрани аніон-ICE (AMMS-ICE 300, Dionex) з 5,0 мМ розчином гідроксиду тетрабутиламонію (Sigma) зі швидкістю потоку 5 мл/хв. Зразок супернатанту елюють ізократично 0,4 мМ гептафтормасляної кислоти (Sigma) у деіонізованій воді при швидкості потоку 1 мл/хв протягом 25 хв. Кожен зразок запускають три рази непослідовно. Збір та аналіз даних проводять за допомогою програмного забезпечення Chromeleon (6.80 SR5; Dionex) [91].

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю виробництва оцтової кислоти

Номер контрольної точки і назва стадії	Показник для визначеного об'єкта контролю	Засоби і методики впровадженого контролю	Періодичність відбору та аналізу проби	Нормативні показники
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кх 1.1.1 <i>Приготування робочого розчину «Бланідас-Ц Фоам-МС»</i>	Робочий розчин «Бланідас-Ц Фоам-МС» Концентрація	Методика фізико-хімічного визначення	Після підготовки	C = 3%
Кх 1.1.2 <i>Приготування робочого розчину «Лойран Про СІР»</i>	Робочий розчин «Лойран Про СІР» Концентрація	Методика фізико-хімічного визначення	Після приготування	C = 1%
Км 1.2.1 <i>Прибирання щоденне</i>	Обладнання, підлога Чистота	Огляд візуальним шляхом	На кінцевому етапі прибирання	Відсутність пилу і бруду
Км 1.2.2 <i>Прибирання генеральне</i>	Обладнання, стіни, підлога, вікна, двері Чистота	Огляд візуальним шляхом, контроль мікробіологічний	Після завершення генеральних прибирань	Відсутність пилу і бруду, КУО < 500/см ²
Кт 1.3.1 <i>Здійснення миття обладнання</i>	Обладнання Час і температура, чистота	Годинник, термометр, огляд візуальним шляхом	Температура і час контролюються постійно під час процесу миття, чистота перевіряється після завершення такого процесу	t = 55 °C, τ = 15 – 20 хв, бруд відсутній
Кт 1.3.2 <i>Технічний огляд помитого обладнання</i>	З'єднання апаратурні Міцність	Огляд візуальний	Перед початком проведення перевірки обладнання на герметичність	Відсутність послаблень та ущільнень

Продовження табл. 7.1

Кт 1.3.3 <i>Проведення перевірки обладнання на герметичність</i>	Обладнання технологічне Тиск, час, герметичність обладнання	Манометр, годинник	Час і тиск контролюються постійно протягом проведення перевірки	$P = 0,1 - 0,2$ МПа, $\tau = 30 - 60$ хв
Кт 1.3.4 <i>Здійснення стерилізації</i>	Виробниче обладнання Температура, тиск і час	Термометр, манометр, годинник	Температура, час і тиск контролюються постійно протягом здійснення стерилізації	$t = 110$ °С, $P = 0,2$ МПа, $\tau = 30 - 60$ хв
Кт 2.1 <i>Забір повітря у найвищій точці</i>	Забірник повітря Висота забору	-	Під час здійснення забору	$H = 10$ м
Кт 2.2 <i>Очищення повітря на фільтрі від грубих часток</i>	Повітря очищене Ступінь очищення, перепад тисків	Згідно з паспортом фільтра, манометр	Після закінчення очищення – контроль зазначених показників	$E = 90\%$
Кт 2.3 <i>Компресування повітря</i>	Повітря стиснене	Манометр, термометр	Після завершення компресування повітря	$P = 0,35-0,5$ МПа, $t = 120-250$ °С
Кт 2.4 <i>Охолодження очищеного повітря і позбуття від вологи</i>	Повітря охолоджене Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Наприкінці охолодження повітря і позбуття від зайвої вологи	$t = 25-35$ °С, $W = 60\%$
Кт 2.5 <i>Нагрівання у теплообміннику</i>	Повітря підігріте Температура, вологовміст	Термометр, психрометр	Після підігріву повітря	$t = 40-50$ °С, $W = 50\%$
Кт 2.6 <i>Тонке очищення повітря</i>	Повітря очищене Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, відповідно до інформації у паспорті перевірка ступеня очистки	Після завершення тонкої очистки	$E = 95\%$

Продовження табл. 7.1

<p>Кт 2.7 <i>Очищення в індивідуальних фільтрах</i></p>	<p>Повітря очищене Ступінь очищення, чистота мікробіологічна</p>	<p>За допомогою паспорту фільтра перевірка ступеня очистки, мікробіологічний контроль</p>	<p>Після проходження через індивідуальні фільтри</p>	<p>E = 99,999%, КУО < 1</p>
<p>Кт, Кх, Км 3.1.1 <i>Приготування і стерилізація розчину натрію гідроксиду для вироццвання посівного матеріалу у колбах на качалці та інокуляторах на 6, 60, 630 л</i></p>	<p>Розчин натрію гідроксиду Концентрація, тиск, час, стерильність</p>	<p>Фізико-хімічний метод, манометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Концентрація визначається після приготування розчину і може бути виміряна шляхом фізико-хімічного аналізу. Тривалість стерилізації, тиск та умови під час процесу залежать від методу стерилізації, що використовується. Мікробіологічний контроль після стерилізації включає візуальну оцінку наявності мікроорганізмів або проведення мікробіологічних тестів для визначення стерильності зразків</p>	<p>C = 6%, P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність контамінації</p>
<p>Кт, Кх, Км 3.1.2 <i>Приготування і стерилізація розчину натрію гідроксиду для виробничого біосинтезу у ферментері на 6,3 м³</i></p>	<p>Розчин натрію гідроксиду Концентрація, тиск, час, температура, стерильність</p>	<p>Фізико-хімічний метод, манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Концентрація визначається після приготування розчину і може бути виміряна шляхом фізико-хімічного аналізу. Тривалість стерилізації, температура, тиск контролюються безперервно під час процесу. Мікробіологічний контроль після стерилізації включає візуальну оцінку наявності мікроорганізмів або проведення мікробіологічних тестів для визначення стерильності зразків</p>	<p>C = 6%, P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність контамінації</p>

Кх 3.2.1 <i>Приготування розчину соляної кислоти для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці та інокуляторах на 6, 60, 630 л</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація, тиск, час, стерильність	Фізико-хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину і може бути виміряна шляхом фізико-хімічного аналізу	C = 6%
Кх 3.2.2 <i>Приготування розчину соляної кислоти для виробничого біосинтезу у ферментері на 6,3 м³</i>	Розчин соляної кислоти Концентрація, тиск, час, температура, стерильність	Фізико-хімічний метод	Концентрація визначається після приготування розчину і може бути виміряна шляхом фізико-хімічного аналізу	C = 6%
Кт, Км 4.1.1, 4.2.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці та інокуляторі на 6 л</i> <i>Приготування і стерилізація композиції А</i>	Композиція А Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск під час стерилізації зазвичай визначають безперервно, щоб забезпечити належну якість процесу. Після завершення стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль, що проводиться після завершення стерилізації, щоб переконатися, що продукт є стерильним і відповідає вимогам якості	P = 0,05 МПа, τ = 30 хв, відсутність контамінації
Кт, Км 4.1.2, 4.2.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i>	Композиція Б Тиск, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тривалість і тиск під час стерилізації зазвичай визначають безперервно, щоб забезпечити належну якість процесу. Після завершення стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль, що проводиться після завершення стерилізації, щоб переконатися, що продукт є стерильним і відповідає вимогам якості	P = 0,15 МПа, τ = 40 хв, відсутність контамінації

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 4.3.1, 4.4.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу в інокуляторі на 60 та посівному апараті на 630 л</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, час, температура, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температуру і тиск під час стерилізації зазвичай визначають безперервно, щоб забезпечити належну якість процесу. Після завершення стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль, що проводиться після завершення стерилізації, щоб переконатися, що продукт є стерильним і відповідає вимогам якості</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність контамінації</p>
<p>Кт, Км 4.3.2, 4.4.2 <i>Приготування і стерилізація композиції Б</i></p>	<p>Композиція Б Тиск, час, температура, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температуру і тиск під час стерилізації зазвичай визначають безперервно, щоб забезпечити належну якість процесу. Після завершення стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль, що проводиться після завершення стерилізації, щоб переконатися, що продукт є стерильним і відповідає вимогам якості</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність контамінації</p>
<p>Кт, Км 4.5.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері на 6,3 м³</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Тиск, час, температура, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температуру і тиск під час стерилізації зазвичай визначають безперервно, щоб забезпечити належну якість процесу. Після завершення стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль, що проводиться після завершення стерилізації, щоб переконатися, що продукт є стерильним і відповідає вимогам якості</p>	<p>P = 0,05 МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність контамінації</p>

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 4.5.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері на 6,3 м³ Приготування і стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б Тиск, час, температура, стерильність</p>	<p>Манометр, годинник, датчик температури, мікробіологічний контроль</p>	<p>Тривалість, температуру і тиск під час стерилізації зазвичай визначають безперервно, щоб забезпечити належну якість процесу. Після завершення стерилізації здійснюють мікробіологічний контроль, що проводиться після завершення стерилізації, щоб переконатися, що продукт є стерильним і відповідає вимогам якості</p>	<p>P = 0,15 МПа, t = 131 °С, рН = 4,0 – 4,5, τ = 40 хв, відсутність контамінації</p>
<p>Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури</p>	<p>Колекційна культура Acetobacter pasteurianus СІСІМ В7003-02 температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>Холодильник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура зберігання може бути визначена і підтримуватися безперервно для забезпечення оптимальних умов зберігання продукту. Мікробіологічний контроль зазвичай проводять з меншою частотою, що дозволяє періодично перевіряти наявність мікроорганізмів і забезпечувати відповідність вимогам мікробіологічної чистоти</p>	<p>t = 2 – 4 °С, τ = 3 – 4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури</p>	<p>Робоча культура Acetobacter pasteurianus СІСІМ В7003-02 температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура зберігання може бути визначена і підтримуватися безперервно для забезпечення оптимальних умов зберігання продукту. Мікробіологічний контроль зазвичай проводять з меншою частотою, що дозволяє періодично перевіряти наявність мікроорганізмів і забезпечувати відповідність вимогам мікробіологічної чистоти</p>	<p>t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Продовження табл. 7.1

<p>Кт, Км 5.3 <i>Вирощування інокуляту на щільному середовищі</i></p>	<p>Робоча культура <i>Acetobacter pasteurianus</i> СІСІМ В7003-02 температура, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термостат, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура зберігання може бути визначена і підтримуватися безперервно для забезпечення оптимальних умов зберігання продукту. Мікробіологічний контроль зазвичай проводять з меншою частотою, що дозволяє періодично перевіряти наявність мікроорганізмів і забезпечувати відповідність вимогам мікробіологічної чистоти</p>	<p>t = 30 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.4 <i>Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці</i></p>	<p>Посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, кислотність, концентрація клітин, мікробіологічна чистота</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>При вирощуванні мікроорганізмів під керуванням автоматичної системи контролю, температура, рН і частота обертів мішалки можуть бути регульовані безперервно для забезпечення оптимальних умов росту. Визначення концентрації клітин проводять після вирощування, коли культура досягає необхідної стадії росту. Мікробіологічний контроль також проводять після вирощування для оцінки стерильності і мікробіологічної чистоти культури</p>	<p>t = 30 °С, τ = 24 год, w = 200 об/хв, рН = 6,8 – 7,0, С = 6 x 10⁸ КУО/мл, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Закінчення табл. 7.1

<p>Кт, Км 5.5, 5.6, 5.7 Вирощування посівного матеріалу в інокулятора на 6, 60, та посівному апараті об'ємом 630 л</p>	<p>Посівний матеріал температура, час, швидкість перемішування, кислотність, концентрація розчиненого кисню, концентрація клітин, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО₂, мікробіологічний контроль</p>	<p>При вирощуванні мікроорганізмів під керуванням автоматичної системи контролю, температура, рН і частота обертів мішалки можуть бути регульовані безперервно для забезпечення оптимальних умов росту. Визначення концентрації клітин проводять кожні 4 год та після вирощування, коли культура досягає необхідної стадії росту. Мікробіологічний контроль також проводять кожні 4 год після вирощування для оцінки стерильності і мікробіологічної чистоти культури</p>	<p>t = 30 °С, τ = 24 год, w = 200 об/хв, рН = 6,8 – 7,0, рО₂ = 20 – 30%, С = 6 х 10⁸ КУО/мл, відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 6,3 м³</p>	<p>Культуральна рідина температура, час, частота обертів, кислотність, концентрація розчиненого кисню, концентрація клітин та оцтової кислоти, мікробіологічна чистота</p>	<p>Датчик температури і рН, годинник, тахометр, датчик рО₂, центрифуга, мікробіологічний контроль</p>	<p>При вирощуванні мікроорганізмів під керуванням автоматичної системи контролю, температура, рН і частота обертів мішалки можуть бути регульовані безперервно для забезпечення оптимальних умов росту. Визначення концентрації клітин та оцтової кислоти проводять кожні 4 год і після вирощування, коли культура досягає необхідної стадії росту. Мікробіологічний контроль також проводять кожні 4 год і після вирощування для оцінки стерильності і мікробіологічної чистоти культури</p>	<p>t = 30 °С, τ = 20 год, w = 200 об/хв, рН = 6,8 – 7,0, рО₂ = 20 – 30%, С = 6 х 10⁸ КУО/мл, С_к = 92,04±0,24 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти</p>

РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

8.1. Аналіз місць емісії можливих відходів під час виробництва оцтової кислоти

Біосинтез оцтової кислоти, що продукується *A. pasteurianus* СІСІМ В7003-02, проходить ряд таких послідовних етапів:

1) стадії допоміжних робіт (санітарна підготовка, підготовка аераційного повітря, приготування і стерилізація розчинів титрувальних агентів, підготовка компонентів поживних середовищ);

2) етапи технологічного процесу (одержання посівного матеріалу, виробничий біосинтез у ферментері на 6,3 м³).

Санітарна підготовка виробництва є місцем емісії рідких відходів. У різних типах прибирань приміщень, а саме щоденного та генерального, а також миття обладнання, застосовують робочі розчини таких засобів як «Бланідас-Ц Фоам-МС» та каустичної соди. Відпрацьовані розчини відповідних засобів, промивна вода направляються безпосередньо до каналізації.

Виробництво оцтової кислоти передбачає попередню підготовку титрувальних агентів у вигляді 6%-их розчинів натрію гідроксиду та соляної кислоти. Це зумовлено, зокрема, тим, що у складі середовища наявна оцтова кислота, а також така речовина є цільовим продуктом, а отже поживне середовище безперервно контролюється за значенням рН, оскільки відповідний показник у процесі культивування має бути на рівні 6,8 – 7,0 [4]. Відходи від підготовки титрувальних агентів можливі у випадку їх невідповідності нормативним показникам та рівню стерильності (відбракування), тому у загальному об'ємі вони не враховуються.

					НУХТ БТЕК 05.01.29 КР ПЗ			
Зм	Дпк	№	Піппи	Лат	РОЗДІЛ 8. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літер	Дпкв	Дпквiiiв
<i>Розробн</i>	<i>Цепчелька</i>							
<i>Керівник</i>	<i>Каппаш Ю</i>						<i>81</i>	<i>102</i>
<i>Н контр</i>						Кафедра БТМ		
<i>Кнсьуль</i>								
<i>Зав каф</i>	<i>Стабніков</i>							

Місцем емісії твердих відходів є етапи приготування компонентів поживних середовищ як для вирощування посівного матеріалу, так і виробничого біосинтезу (залишки пакування сировини, а також самих використовуваних компонентів). Пакування також залишається від концентрованих мийно-дезінфікувальних, після їх приготування.

Місцями емісії газоповітряних відходів виступають етапи одержання посівного матеріалу та безпосереднього біосинтезу оцтової кислоти, оскільки відповідні стадії проходять за безперервної подачі розчиненого кисню (продуцент – аеробна бактерія). Тверді відходи (посівний матеріал) не утворюються, оскільки послідовно подаються з однієї стадії до іншої, а також до біосинтезу. Дані стадії не є місцем рідких відходів, оскільки отримана культуральна рідина, до складу якої входить цільовий продукт – оцтова кислота, перекачується відцентровим насосом у збірник.

8.2. Перспективи впровадження систем екологізації виробництва оцтової кислоти

8.2.1. Рідкі відходи. Об'єми та можливі шляхи знешкодження

Заплановане біотехнологічне виробництво оцтової кислоти буде здійснюватися протягом 55 робочих трудоднів. Відповідно до цієї інформації щоденні прибирання будуть проводити 55 разів, а генеральні – близько 2 разів (раз на місяць). Згідно з даними, приведеними у попередньому підрозділі, санітарна підготовка виробництва буде здійснюватися за використання таких засобів як каустична сода (2%) і «Бланідас-Ц Фоам-МС» (3%) об'ємом 80 л кожен. Аналіз складу та вплив на навколишнє середовище таких засобів представлено у табл. 8.1.

**Характеристика утворюваних відходів у процесі виробництва оцтової
кислоти**

Відходи	Склад миючих засобів	Об'єм відходів, що утворюється за 1 цикл, л	Клас небезпеки
2 % розчин каустичної соди	Каустична сода – NaOH	80	II
3 % розчин «Бланідас-Ц Фоам-МС»	Аніонні ПАР 13-30%, ароматизатори	80	II
	Усього:	160	

Стічні води подаються трубопроводом 1 в анаеробний біореактор 10, де вони, проходячи через волокнистий носій 3, взаємодіють з іммобілізованими на ньому мікроорганізмами, що призводить до очищення стічної води. У цьому процесі відбувається виділення газів та розвиток анаеробних бактерій, які утримуються на волокнах носія. Для збільшення поверхні контакту та прискорення масообмінних процесів використовується система рециркуляції 2, що включає в себе насос, рециркуляційний трубопровід та перфорований трубопровід для зрошення волокнистого носія 3 у газовому середовищі 4. Мікроорганізми, які утворюють біообростання, також потрапляють у газове середовище 4 разом із стічною водою і беруть участь у процесі очищення води та газів шляхом окислення забруднюючих речовин.

Після очищення стічна вода подається у наступний аноксидний біореактор 11, де концентрація розчиненого кисню не перевищує 0,2 мг/дм³, і подачу повітря регулюють системою аерації 5, керованою запірними вентилями 6. Далі стічна вода направляється у аеробний біореактор 12 через трубопровід 7, розташований нижче рівня відведення очищеної стічної води з аеробного біореактора. Аерація здійснюється за допомогою аератора та системи аерації 5, що дозволяє ефективно перемішувати стічні води, утримувати у завислому стані вільноплаваючий мул та підтримувати

життєдіяльність мікроорганізмів. Концентрація розчиненого кисню становить 1,5-2 мг/дм³.

У процесі дегазації гази видаляються через повітряне середовище 8. В обох біореакторах (аноксидному та аеробному) використовуються волокнисті носії 3, на яких закріплені мікроорганізми для очищення стічної води. Очищена вода відводиться по трубопроводу 9. У процесі анаеробного очищення стічних вод утворюється ряд газів (CO₂, H₂S, N₂, NH₃), які піддаються видаленню для запобігання корозійним процесам [92].

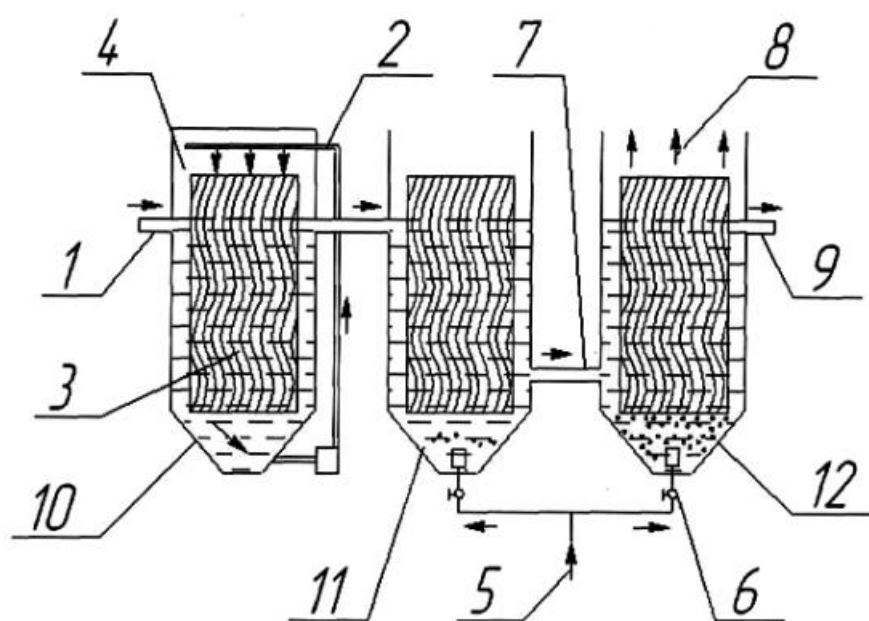


Рис. 8.1. Зображення установки для біологічної очистки стічних вод [92]

8.2.2. Розрахунок об'ємів та утилізація газоповітряних відходів

До газоповітряних відходів даного виробництва відносять відпрацьоване повітря та бактеріальний аерозоль. Процес вирощування посівного матеріалу здійснюється протягом 72 год, тобто 4320 хвилин, а виробничого біосинтезу оцтової кислоти – 24 год (1440 хв). Обов'язкова умова успішного проходження даних процесів – постійна подача кисню до інокуляторів, посівного апарату та ферментеру за швидкості потоку 1 л / (1 л

КР · хв). Зважаючи на наведену інформацію, також необхідно врахувати, що у виробничих зона передбачено розміщення 2 інокуляторів об'ємами 6 і 60 л, посівного апарату на 630 л та ферментеру об'ємом 6,3 м³. Отже, об'єм відпрацьованого повітря після виробництва оцтової кислоти становитиме: $6 \cdot 1440 + 60 \cdot 1440 + 630 \cdot 1440 + 6 \cdot 300 \cdot 1440 = 8640 + 86\,400 + 907\,200 + 9\,072\,000 = 10\,074\,240$ л, тобто 10 074,24 м³.

Такий об'єм відпрацьованого повітря можна утилізувати таким чином. Повітря нагнітається в короткий кінець вертикально розташованої J-подібної повітропровідної труби 1 за допомогою вентилятора 2. Вздовж стінок другої частини J-подібної труби розташовані водяні форсунки 3 із силіконовими соплами, для зручності їх очищення у випадку засмічування. Кожна форсунка створює плоский та широкий водяний струмінь поперек труби. Форсунки вмонтовані у стінки труби в два ряди, один навпроти іншого, зі зміщенням, щоб потік водяного струменя з кожної форсунки був направлений в область між двома іншими форсунками, розташованими навпроти, але таке розташування форсунок не є принциповим, створюючи таким чином щільну водяну завісу.

Проходячи крізь цю завісу, повітря ефективно очищається та зволожується. Далі повітряний потік проходить крізь пластинчасту решітку 4, яка також розташована всередині J-подібної труби, над форсунками. Надлишкова краплеподібна волога затримується на пластинах та стікає вниз. Аналогічним чином і розпилена з форсунок вода стікає в нижню точку J-подібної труби, де розташований зливний патрубок, що веде до водяного бачка 5. Потрапляючи в бачок, вода проходить крізь фільтруючі елементи 6 грубого, середнього та тонкого очищення, очищаючись таким чином, при цьому фільтруючий елемент 60 тонкого очищення повинен завжди бути занурений у воду, щоб під час роботи насоса під ним створювався вакуум. Далі вода забирається насосом 7, який змонтований у нижній частині водяного бачка, і подається через патрубки 8 знову на форсунки 3 [93].

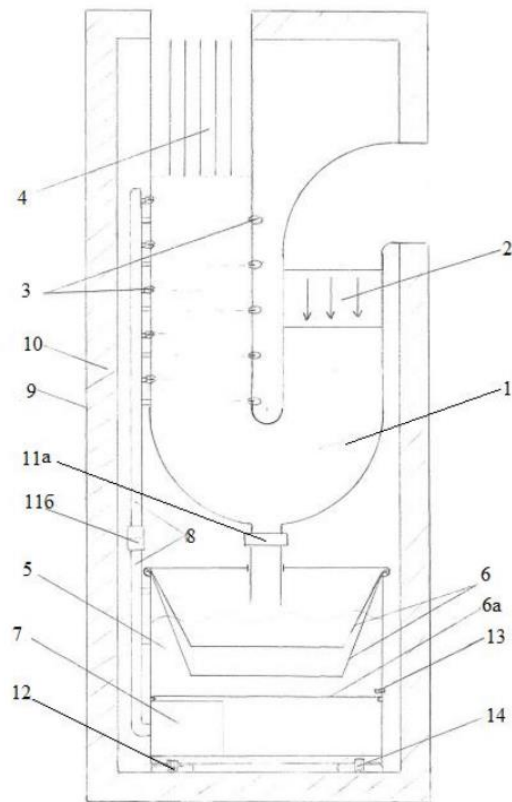


Рис. 8.2. Зображення установки для очищення і зволоження відпрацьованого повітря [93]

Весь пристрій розташований всередині пластмасового корпусу 9, із прошарком зі звукоізолюючого матеріалу 10. Для обслуговування пристрою необхідно витягнути водяний бачок, промити його водою, а також промити водою фільтруючі елементи, які в ньому знаходяться, налити у бачок необхідну кількість води та встановити бачок на місце. Для того, щоб зняти бачок, необхідно від'єднати дві поворотні муфти, муфту зливного патрубку, а також муфту патрубку подачі води на форсунки. Оскільки у водяному бачку вбудовано водяний електронасос, для зручного його відключення та підключення до електроживлення під час зняття бачка було прийнято рішення використовувати "спаровані" електроконтакти 12, які розташовані на бачку і на станині для бачка. Також у водяному бачку вмонтовано датчик рівня води 13, який, у випадку зниження рівня води нижче допустимого, подає сигнал на панель керування пристрою умовно не показана. Для підключення датчика

також використовуються "спаровані" електроконтакти, які розташовані аналогічно 14 [93].

8.2.3. Знешкодження утворених твердих відходів

Як попередньо зазначалося, емісія такого типу відходів притаманна етапам санітарної підготовки виробництва та приготуванню і стерилізації поживних середовищ. Матеріали, що входять до складу пакувань – пропілен, полівінілхлорид і поліетилен, спочатку сортують, а потім передають на утилізацію. Полімерна тара, яка містить сухий луг та каталізатор у кількості 1-5% від ваги тари, подається в куб крекінгу 2. У цьому процесі відбувається каталітичний крекінг при температурі 500-550 °С, що призводить до отримання широкого спектру вуглеводнів з домішками продуктів розкладання залишкових речовин, що були в тарі. Отримана парогазова суміш поступає до ректифікаційної колони 3, де вона розділяється на фракції за температурою кипіння. Залишкові пари рідин конденсуються в холодильнику 4, а отримані вуглеводневі фракції надходять в накопичувальні ємності 5 [94].

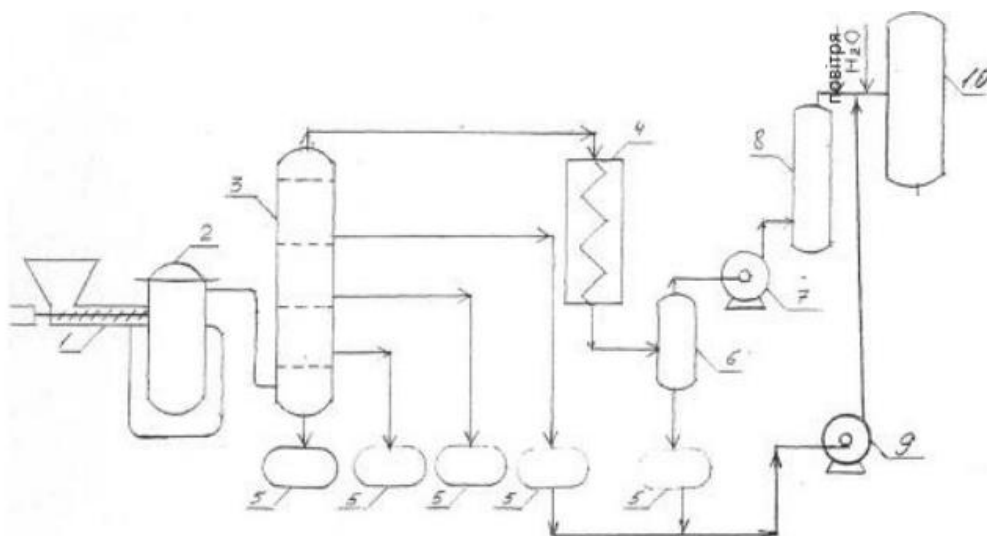


Рис. 8.3. Зображення установки для утилізації полімерних матеріалів [94]

Неконденсовані гази і пари очищаються в газосепараторі низького тиску 6 та подаються на компресор 7. Скомпресований газ потрапляє в газовий ресивер 8 і підвищується до високого тиску в газогенераторі 10. Паралельно з

цим, дистиллят водної фази, отриманий насосом 9 з ємностей 5, подається для утилізації, а також відбувається окислення за допомогою повітря або кисню. Отриманий генераторний газ може використовуватися як паливо або для інших технологічних процесів, таких як отримання водню, відновлення металів, паливні елементи, синтез Фішера-Тропша і інші [94].

9. ACETIC ACID. Электронный ресурс – [Режим доступа]: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/40>.
10. Deshmukh G., Manyar H. Production pathways of acetic acid and its versatile applications in the food industry. *In Biomass. IntechOpen*. 2020. doi: 10.5772/intechopen.92289.
11. Qian Q., Zhang J., Cui M., Han B. Synthesis of acetic acid via methanol hydrocarboxylation with CO₂ and H₂. *Nature Communications*. 2016, 7, 11481. doi: 10.1038/ncomms11481.
12. Ouattara A., Somda K. M., Ouattara A. T. C., Traore S. A., Ouattara S. A. Production of acetic acid by acetic acid bacteria using mango juice in Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2019, 12 (5): 2309. doi: 10.4314/ijbcs.v12i5.30.
13. Gomes R. J., de Fatima Borges M., de Freitas Rosa M., Castro-Gómez R. J. H., Spinosa W. A. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food technology and biotechnology*. 2018, 56 (2): 139 – 151. doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5593.
14. Dahake A. P., Dhoble A. S. Microbial consortium engineering for the improvement of biochemicals production. *In Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. 2022, 201-233. doi: 10.1016/B978-0-323-88504-1.00005-4.
15. Babi D. K., Lutze P., Woodley J. M., Gani, R. A process synthesis-intensification framework for the development of sustainable membrane-based operations. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2014, 86: 173-195. doi: 10.1016/j.cep.2014.07.001.
16. Acetic Acid: Specification and Application. Электронный ресурс – [Режим доступа]: <https://dayaramchem.com/2020/07/14/acetic-acid-specification-and-application/>.
17. de Moraes Motta Machado M. C., Lepaus B. M., Bernardes P. C., de São José, J. F. B. Ultrasound, acetic acid, and peracetic acid as alternatives sanitizers to

- chlorine compounds for fresh-cut kale decontamination. *Molecules*. 2022, 27 (20): 7019. doi: 10.3390/molecules27207019.
18. Acetic acid. Электронный ресурс – [Режим доступа]: <https://list.essentialmeds.org/medicines/270>.
19. Nour S., Reid G., Sathanantham K., Mackie I. Acetic acid dressings used to treat *Pseudomonas* colonised burn wounds: A UK national survey. *Burns*. 2021, 48 (6): 1364-1367. doi: 10.1016/j.burns.2021.07.011.
20. Kavolus J. J., Schwarzkopf R., Rajaei S. S., Chen A. F. Irrigation Fluids Used for the Prevention and Treatment of Orthopaedic Infections. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2020, 102(1): 76-84. doi: 10.2106/JBJS.19.00566.
21. Hashmi Y., Zhou A. K., Jawaid A., Zhou A. Y., Shah V., Thahir A., Krkovic M. The role of acetic acid in orthopaedic surgery. *Journal of perioperative practice*. 2022, 32 (6): 162-166. doi: 10.1177/17504589211015629.
22. Bhattacharyya R., Longcroft-Wheaton G., Bhandari P. The role of acetic acid in the management of Barrett's oesophagus. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2015, 39 (3): 282-291. doi: 10.1016/j.clinre.2014.07.017.
23. Hilal Z., Tempfer C. B., Burgard L., Rehman S., Rezniczek G. A. How long is too long? Application of acetic acid during colposcopy: A prospective study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2020, 223 (1): 101.e1-101.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2020.01.038.
24. De Roos J., De Vuyst L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2018, 49: 115 – 119. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.007.
25. Saichana N., Matsushita K., Adachi O., Frébort I., Frébortova J. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications review. *Biotechnol. Adv*. 2015, 33: 1260 – 1271. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.001.
26. Qiu X., Zhang Y., Hong H. Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. *AMB Express*. 2021, 11 (1). doi: 10.1186/s13568-021-01189-6.

27. Gullo M., Verzelloni E., Canonico M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*. 2014, 49 (10): 1571 – 1579. doi: 10.1016/j.procbio.2014.07.003.
28. Wu X., Yao H., Cao L., Zheng Z., Chen X., Zhang M., Li X. Improving Acetic Acid Production by Over-Expressing PQQ-ADH in *Acetobacter pasteurianus*. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01713.
29. Mounir M., Shafiei R., Zarmehrkorshid R., Hamouda A., Ismaili Alaoui M., Thonart P. Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121 (2): 166 – 171. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.06.005.
30. Nakano S., Fukaya M., Horinouchi S. Enhanced expression of aconitase raises acetic acid resistance in *Acetobacter aceti*. *FEMS microbiology letters*. 2004, 235 (2): 315 – 322. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09605.x.
31. Ndoye B., Lebecque S., Destain J., Guiro A. T., Thonart P. A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. *Process Biochemistry*. 2007, 42 (11): 1561 – 1565. doi: 10.1016/j.procbio.2007.08.002.
32. Xia K., Li Y., Sun J., Liang X. Comparative Genomics of *Acetobacter pasteurianus* Ab3, an acetic acid Producing strain isolated from Chinese traditional rice vinegar meiguichu. *PLoS One*. 2016, 11 (9): e0162172. doi: 10.1371/journal.pone.0162172.
33. *Acetobacter pasteurianus*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://bacdiv.dsmz.de/strain/163302>.
34. Marchetti R., Nieto Fabregat F., Pallach M., Gully D., Giraud E., Molinaro A., Silipo A. The Peculiar Structure of *Acetobacter pasteurianus* CIP103108 LPS Core Oligosaccharide. *ChemBioChem*. 2021, 22 (1): 147-150. doi: 10.1002/cbic.202000597.
35. *Acetobacter pasteurianus*. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/bacteria/acetobacter-pasteurianus>.

36. *Acetobacter pasteurianus*. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcmimg_view?jcm=21166&fid=A.
37. Bellankimath A., Katti A., Hemalata V. B., Meti B. S. Isolation and characterization of the indigenous acetic acid bacteria from western ghats soil samples. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2017, 9: 1255-1265. doi: 10.20546/ijcmas.2017.609.151.
38. Ястремська Л.С. Загальна мікробіологія: навчальний посібник / Л.С. Ястремська, І.М. Малиновська – К.: НАУ, 2017. – 232 с.
39. *Acetobacter pasteurianus*. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=438&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
40. What is Acetic Acid? [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://ingredi.com/blog/what-is-acetic-acid/#:~:text=Acetic%20Acid%20is%20also%20a,as%20a%20chemical%20leavening%20agent>.
41. Шинкарук М., Кірова Я. Застосування нетрадиційної сировини у виробництві консервованих огірків. 2020, 267 – 270.
42. Оцтова кислота – унікальні властивості та застосування. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.products.pcc.eu/uk/blog/%D0%BE%D1%86%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0-%D1%83%D0%BD%D1%96%D0%BA%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%96-%D0%B2%D0%BB%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BE%D1%81/>.
43. Шинкарук М. В., Кірова Я. В. Використання нетрадиційної рослинної сировини функціонального призначення у виробництві консервованих огірків.

Вчені записки ТНУ імені В.І. Вернадського. Серія: технічні науки. 2020, 31 (70): 101 – 106. doi: 10.32838/TNU-2663-5941/2020.6-2/18.

44. Sulimenko L., Viter S. Accounting and analytical support of management of production enterprises of the enterprises of the fruit and vegetable canned industry of Ukraine. *Economics. Management. Innovations*. 2022, 1 (30). doi: 10.35433/ISSN2410-3748-2022-1(30)-13.

45. Одеський консервний завод. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://okz.od.ua/uk/gospodarochka/ovocheva-konservatsiya/>.

46. Плодоовочева консервація. [Електронний ресурс] – режим доступу: http://gamma.vn.ua/tmgospodarochka_ua.htm.

47. Данильчук Г. А., Петрова О. І., Стріха Л. О. (2020). Технологія консервування плодів і овочів. Методичні рекомендації для виконання лабораторних занять здобувачами вищої освіти галузі знань 18 – «Виробництво та технології» 1-го РВО, СВО «Бакалавр» – освітня спеціальність 181 – «Харчові технології», кваліфікація «Інженер-технолог» / уклад.: Г. А. Данильчук, О. І. Петрова, Л. О. Стріха; Миколаївський національний аграрний університет. — М. : МНАУ, 2020. — 86 с.

48. Glycolysis / Gluconeogenesis - *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-01. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?apt00010.

49. Citrate cycle (TCA cycle) - *Acetobacter pasteurianus* IFO 3283-01. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.genome.jp/pathway/apt00020>.

50. Glyoxylate and dicarboxylate metabolism - *Acetobacter pasteurianus* 386B. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?apk00630.

51. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

52. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К. :НУХТ, 2009. – 336 с.
53. Головей О. П. , Гуляєв В. М. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О. П., Гуляєв В. М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с.
54. Очищення і дезінфекція в харчовій промисловості. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.bettaservice.com.ua/novyny-kompanii/item/1172-ochistki-i-dezinfektsiya-v-pishchevoy-promyshlennosti.html>.
55. Очистка та дезінфекція у промисловості. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promoboz.com/ru/journal/2023/2-95-2023/ochyshhennya-i-dezinfektsiya-u-farmatsevtichnij-promyslovosti-zgidno-z-vymogamy-gmp/?login=failed>.
56. Бланідас-Ц Фоам-МС. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://lysoform.ua/products/blanidas-cz-foam-ms/>.
57. Blanidas-C CH-Foam. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://clean-ua.com/content/files/blanidas-c-ch-foam_55757840.pdf.
58. Каустична сода. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://himtrast.com.ua/ua-uk/kausticheskaya-soda>.
59. Saraclean C – дезінфікуючий засіб для поверхонь, 1 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://saraya-shop.com.ua/product/saraclean-c-dezinfikujuchij-zasib-dlja-poverhon-1-l/>.
60. Засіб дезінфекційний CLEAN PRO SURFACE (для поверхонь) 1 л. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://kyiv.prom.ua/p1718122587-zasib-dezinfektsijnij-clean.html>.
61. Reactor 100L. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://bm-chemistry.com.pl/product/reactor-100l/>.

62. Поверхневий самовсмоктуючий вихровий насос Speroni KPM 50. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://teploradost.com.ua/ua/poverhnostnyj-samovsasyvayushij-vihrevoj-nasos-speroni-kpm-50>.
63. Труба для забору повітря ззовні Bosch AZ 413. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.magmaenergy.com.ua/shop/bosch-az-413/>.
64. Фільтр попередньої очистки серії Flowmatik. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pneumatyka.com.ua/product-groups/filtry-wstepne-flowmatik-new/>.
65. Компресор поршневий ВКП W2200 10-500. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://xn--80addceesnhi0axzh6mb.com.ua/ua/products/pnevmo_products/101/555/.
66. Кожухотрубні конденсатори. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://opeks.ua/ua/kozhuxotrubni-kondensatori/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cp c&utm_campaign=SPM_1&gclid=Cj0KCQiA67CrBhC1ARIsACKAa8TxdcZe28qn_3jGCGnqbmJ-_sSOk8XLJUq6p_EcoViOEPYYhVoiSA4aAqWdEALw_wcB.
67. Ресивер газоповітряний 14,98 м³ (РГ 14,98 м³). . [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://rezervuary.com.ua/p791149280-resiver-gazovozdushnyj-1498.html>.
68. Кожухотрубні підігрівачі. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://opeks.ua/ru/kozhuxotrubnye-podogrevateli/?utm_source=google&utm_content=&utm_term=&utm_medium=cp c&utm_campaign=SPM_1&gclid=Cj0KCQiA67CrBhC1ARIsACKAa8S1RD2MiaMS0dTsiHrwpXM0q8siZqmrnga7_wx41IvIHOPX6KucbSIaArmqEALw_wcB.
69. Фільтр тонкої очистки серії Futura, 0,3 мкм, розміри різьби від 1/4 до 1 дюйма. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pneumatyka.com.ua/product-groups/pre-filtry-serii-futura/>.

70. ВФ серія, фільтри у сталевому сварному корпусі, 16 бар. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://compressory.org.ua/catalog_2/sistemy-podgotovki-szhatogo-vozduha/filtry/seriia-bf/.
71. Minifors 2 Benchtop Bioreactor. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://bio.pnpi.nrcki.ru/wp-content/uploads/2020/01/Infors_Minifors-2.pdf.
72. РЕАКТОР 25Л З ПРОПЕЛЕРНИМ МІКСЕРОМ. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://khimmix.ua/ua/himicheskie-reaktory/reaktor-25l-s-propellernym-mikserom>.
73. 10L Chemical Lab Jacketed Glass Reactor Vessel with Digital Display for Laboratory Reaction. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://eshop.lab1st.com/products/10l-chemical-lab-jacketed-glass-reactor-vessel-with-digital-display-for-laboratory-reaction?gclid=Cj0KCQiA35urBhDCARIsAOU7QwkWfo7LBLsFHAPNUATMexIH4kk9Q64zCLQu7Mh_L9gR4erDokROIBkaAlqwEALw_wcB&utm_campaign=sag_organic&utm_content=sag_organic&utm_medium=product_sync&utm_source=google&variant=44940092047655.
74. Реактор ферментер РФ-60. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-fermenter-rf-60/>.
75. Шнековий дозатор. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://sweda.com.ua/produksiya/shnekovyi-dozator/>.
76. Хімічний реактор REACTOR 250 LITROS ACERO INOXIDABLE CON CAMISA Y AGITACION. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://machineryline.ua/-/prodazh/himichni-reaktori/REACTOR-250-LITROS-ACERO-INOXIDABLE-CON-CAMISA-Y-AGITACION--23040417463726603200>.
77. Реактори гомогенізатори для харчової і хімічної промисловості. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://suntehno.com.ua/ua/g83747859-reaktory-gomogenizatory-dlya>.

78. NOVAX G 20 HP 0.6 шестеренчатий насос. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/gear-pumps/novax-g-20-hp-06-shesterenchatiy-nasos/>.
79. Pfaudler DIN AE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/A_Pfaudler-DIN-AE-Reactors-622-4E.pdf.
80. Насос поверхневий Speroni CAM 200. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://teploradost.com.ua/ua/nasos-poverhnostnyj-speroni-cam-200>.
81. Насос NOVAX G 20 HP 0.8 шестеренчатий. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/gear-pumps/novax-g-20-hp-08-shesterenchatiy-nasos/>.
82. 10L Process reactor, cylindrical, jacketed. [Електронний ресурс] – режим доступу: <http://www.wiggens.com/show-88-978-1.html>.
83. Pfaudler DIN BE Reactors. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.gmmpfaudler.com/uploads/files/pfaudler-din-be-reactors-1.pdf>.
84. BZ 40-125/2.2 - відцентровий моноблочний насос з нержавіючої сталі [Електронний ресурс] – режим доступу: https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console_pumps/bz-40-125-22-v-dcentroviy-monoblochniy-nasos-z-nerzhav-yucho-stal-/.
85. 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.
86. Zhang Y., Tan C., Fei R., Liu X., Zhou Y., Chen J., Hu Y. Sensitive Chemiluminescence Immunoassay for E. coli O157:H7 Detection with Signal Dual-Amplification Using Glucose Oxidase and Laccase. *Analytical Chemistry*. 2014, 86 (2): 1115–1122. doi: 10.1021/ac4028774.

87. Gonchar M. V. Sensitive method for quantitative determination of hydrogen peroxide and oxidase substrates in biological samples. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. 1998, 70: 157 – 163.
88. Kielkopf C. L., Bauer W., Urbatsch I. L. Methods for Measuring the Concentrations of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020 (4): pdb.top102277. doi: 10.1101/pdb.top102277.
89. Kielkopf C. L., Bauer W., Urbatsch I. L. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020, (4): pdb.prot102269. doi: 10.1101/pdb.prot102269.
90. Determination of Biomass Concentration by Dry Weight Method. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.iitg.ac.in/biotech/BTechProtocols/BCEnggExpt1.pdf>.
91. Jin Y. H., Hong J. H., Lee J.-H., Yoon H., Pawluk A. M., Yun S. J., Mah J.-H. Lactic Acid Fermented Green Tea with *Levilactobacillus brevis* Capable of Producing γ -Aminobutyric Acid. *Fermentation*. 2021, 7 (3): 110. doi: 10.3390/fermentation7030110.
92. Патент України на корисну модель № 81251. Спосіб біологічного очищення стічних вод / Гвоздяк П. І., Кузьмінський Є. В., Саблій Л. А., Жукова В. С. Опубл. 25.06.2013, Бюл. № 12.
93. Патент України на корисну модель № 111587. Очищувач-зволожувач повітря / Сапуга Р. О. Опубл. 10.11.2016, Бюл. № 21.
94. Патент України на корисну модель № 114160. Спосіб утилізації порожньої пластикової тари від засобів захисту рослин, лакофарбових матеріалів, лікарських засобів та побутової хімії / Бабич С. А. Опубл. 27.02.2017, Бюл. № 4.

