

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту (декан факультету)
Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » червень 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

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

на тему: Біосинтез полігідроксibuтирату *Azotobacter chroococcum*

Виконав: здобувач 4 курсу, групи 1

Сарницька Аріна Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Стабніков Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти Клименко О.М.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2021 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 «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Сарницької Аріни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біосинтез полігідроксибутирату *Azotobacter chroococcum*»

керівник роботи Стабніков Віктор Петрович, д.т.н, проф.,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 04.06.2021

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Azotobacter chroococcum*;
цільовий продукт: полігідроксибутират

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту біосинтезу. РОЗДІЛ 2.
Обґрунтування вибору біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне
обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту. РОЗДІЛ 5.
Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 6. Специфікація
обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 8. Контроль
виробництва. РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва. РОЗДІЛ 10.
Охорона довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва полігідроксибутирату – 2 аркуші формату
A2. Апаратурна схема виробництва полігідроксибутирату – 3 аркуші
формату A2. Схема автоматизації ділянки екстракції полігідроксибутирату
– 1 аркуш формату A4.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 9. Автоматизація ділянки виробництва	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	<i>Характеристика полігідроксибутирату</i>	01.04.2021- 03.04.2021	
2.	<i>Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	04.04.2021- 14.04.2021	
3.	<i>Техніко-економічне обґрунтування</i>	09.04.2021- 24.04.2021	
4.	<i>Біосинтез полігідроксибутирату</i>	14.04.2021- 24.04.2021	
5.	<i>Обґрунтування вибору технологічної схеми</i>	24.04.2021- 05.05.2021	
6.	<i>Специфікація обладнання</i>	24.04.2021- 05.05.2021	
7.	<i>Опис технологічної схеми</i>	03.05.2021- 10.05.2021	
8.	<i>Контроль виробництва</i>	05.05.2021- 15.05.2121	
9.	<i>Автоматизація ділянки виробництва</i>	15.05.2021- 25.05.2021	
10.	<i>Охорона довкілля</i>	15.05.2021- 25.05.2021	
11.	<i>Оформлення пояснювальної записки</i>	23.05.2021- 28.05.2021	
12.	<i>Виконання графічної частини проекту</i>	05.05.2021- 28.05.2021	

Здобувач _____
(підпис)

Сарницька А.О.
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Стабніков В.П.
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено проект, що присвячений виробництву субстанції полігідроксибутирату з використанням азотфіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* 7В. Полігідроксибутират – біодеградуємий полімер, що має високі перспективи у заміні традиційних пластиків, адже за фізичними властивостями не поступається їм, маючи значну перевагу у екологічності. Розрахована потужність виробництва становить 531,3 м³ культуральної рідини або 1800 кг полігідроксибутирату на рік.

Технологічна схема виробництва полігідроксибутирату включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка повітря для сушіння, приготування та стерилізація титрувальних агентів і розчинів мікроелементів, приготування та стерилізація поживних середовищ для вирощування інокуляту та виробничого біосинтезу) та технологічний процес (чотири стадії вирощування посівного матеріалу, виробничий біосинтез у ферментері, центрифугування культуральної рідини, сушіння біомаси, екстракція полігідроксибутирату хлороформом, ультрафільтрація екстракту, осадження полігідроксибутирату ізопропіловим спиртом, видалення розчинників центрифугуванням та сушіння полігідроксибутирату), що наведені в апаратурній та технологічній схемах.

Дипломний проект складається з вступу, десяти розділів, списку використаних джерел, технологічної схеми (2 креслення, формат А2) та апаратурної схеми (3 креслення, формат А1, А3). Загальний обсяг роботи – 105 сторінок, 16 таблиць, 7 рисунків.

Ключові слова: полігідроксибутират, упаковка для їжі, *Azotobacter chroococcum* 7В, біополімери, біосинтез, виділення.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ	10
1.1 Загальні відомості	10
1.2 Практичне використання.....	12
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	14
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	14
2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування <i>Azotobacter chroococcum</i> 7В	21
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	23
2.3.1. Морфолого-культуральні ознаки.....	23
2.3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки	23
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	25
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	26
3.1. Потреба у цільовому продукті	26
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	27
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів	27
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	28
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	32
4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	32
4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	34
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	35
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	35
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	35
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	36
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	37
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища.....	43

5.1.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.....	43
5.1.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах.....	44
5.1.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	44
5.1.4.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника.....	45
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту.....	45
5.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання.....	46
5.2.2. Обґрунтування вибору способу сушіння.....	47
5.2.3. Обґрунтування вибору способу руйнування клітин та екстракції.....	49
5.2.4. Вибір способу виділення цільового продукту з екстракту.....	50
5.2.5. Вибір способу сушіння та сушарки.....	51
5.2.6. Обґрунтування вибору упаковки та об'єму упаковки.....	51
5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту.....	52
5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	52
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	57
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	64
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	78
8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів.....	78
8.2. Мікробіологічний контроль.....	82
8.2.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ.....	82
8.2.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури.....	83
8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	84
8.3.2. Концентрація цільового продукту.....	84
8.3.3. Концентрація джерела вуглецю.....	85
8.4. Показники якості готового продукту.....	85
8.4.1. Контроль чистоти продукту.....	86

8.4.2. Контроль вологості продукту	86
8.4.3. Ідентифікація полігідроксибутирату.....	87
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА.....	88
9.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки	88
9.2. Опис схеми автоматизації зі специфікацією засобів автоматизації	90
РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....	93
10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	93
10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва.....	96
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	96
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів.....	100
10.2.3. Система знешкодження газоповітряних викидів.....	101
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛИТЕРАТУРИ.....	102
ДОДАТКИ.....	108

ВСТУП

На сьогоднішній день в Україні і у всьому світі різко постає проблема забруднень навколишнього середовища відходами, які не мають властивостей швидко розкладатися, і, по мірі їх накопичення на планеті, можна сказати, що така кількість нерозкладаємих матеріалів загрожує появою екологічної катастрофи світового масштабу. Станом на 2019 р. в Україні щорічно утворюється 14 млн. т. побутових відходів, близько 40% з них – це пластикові упаковки, посуд, пляшки, целофанові пакети, потужності для переробки яких у країні відсутні [1]. Вирішенням проблеми забруднення навколишнього середовища може стати заміна традиційних нерозкладаємих пластиків на біодеградуємий полігидроксibuтират [2].

Полігидроксibuтират за своїми властивостями схожий на поліпропілен і характеризується високою біосумісністю і біодеградацією, що робить його дуже перспективним у використанні для медичної та продовольчої галузей. Асортимент виробів із такого матеріалу охоплює значну частину продовольчої галузі, оскільки із її розвитком популяризується течія замовлення їжі «на виніс», що також потребує належного забезпечення якості та безпечності продуктів харчування, які у значній мірі забезпечуються зберіганням продукції. Заміна упаковки для їжі з традиційних пластиків на пакування з екологічних матеріалів може значно вплинути на екологічну ситуацію із викидами твердих відходів у країні [1, 3].

Полігидроксibuтират можна синтезувати хімічно, але у промислових масштабах його виробництво здійснюється біотехнологічними методами за допомогою мікробного синтезу [2, 4]. В Україні виробництво полігидроксibuтирату не реалізовано, на відміну від екологічних проблем, тому пропонується запровадити пілотне виробництво для поступового переходу з нерозкладного пластику на розкладаємий полімер.

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Сарницька А.О.</i>						8	107
<i>Перевір.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							8
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог Т.П.</i>							

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва (апаратурна та технологічна схеми) субстанції полігідроксибутирату бактеріями *Azotobacter chroococcum* 7В у вигляді сухих гранул для подальшого очищення та упаковки в паперові мішки.

Актуальністю теми є екологічна проблема великих сміттєзвалищ, основною масою яких є пластикове сміття, що не має здатності до біодеградації. Більшість використаного пластику складає упаковка для їжі та напоїв, тому пропонується замінити більшу частину подібного пакування на безпечніший матеріал, яким є полігідроксибутират.

Новизна. Штам *A. chroococcum* 7В синтезує 4,84 г/л полігідроксибутирату на середовищі, в якому ростовим субстратом є сахароза. Така концентрація є однією з найвищих серед усіх продуцентів полігідроксиалканоатів, тому перспективи використання саме цього штаму у біотехнологічному виробництві субстанції для упаковки їжі дуже великі.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ БІОСИНТЕЗУ

1.1 Загальні відомості

Полігідроксибутират (ПГБ) належить до великої родини біодеградуємих аліфатичних полієфірів – полігідроксиалканоатів (ПГА). Оскільки їх фізичні характеристики схожі з характеристиками нафтохімічних полієфірів, таких як поліпропілен, ПГА інтенсивно вивчаються науковими спільнотами та промисловістю, тому що вважаються хорошими кандидатами на біологічно розкладні пластмаси та еластомери [5, 6].

Полігідроксиалканоати – це група біорозкладаємих полімерів біологічного походження. ПГА є привабливими заміниками звичайних нафтохімічних пластмас, за допомогою яких можна уникнути проблеми забруднення, а також вони мають подібні фізичні властивості різних термопластиків [1].

Полігідроксибутират $(C_4H_6O_2)_n$ є однією з форм ПГА та найбільш поширеним видом полігідроксиалканоатів. Це гомополімер D(-)- β -гідроксимасляної кислоти, його формула наведена на *рисунок 1*:

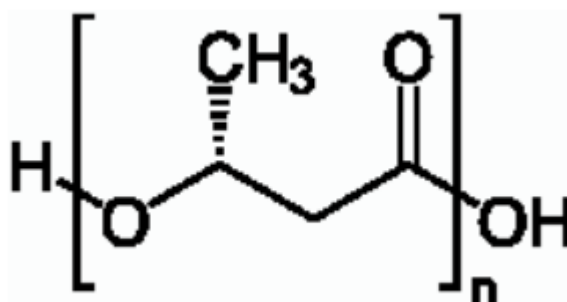


Рис. 1. Структурна формула полі- β -гідроксибутирату [3]

Величина n визначається умовами синтезу полімеру мікробними клітинами, а також методами його екстракції. Наприклад, при екстракції

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сарницька А.О.			РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту біосинтезу	Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					10	107
Реценз.						10		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.						

полімеру із клітин нейтральними розчинниками число мономерних ланок в молекулі коливається від 600 до 2500, а молекулярна вага – від 60000 до 250000 г/моль [3].

ПГБ як гомополімер має абсолютно лінійну ізотактичну структуру, демонструючи кристалічність 60 – 70%, і високу температуру плавлення завдяки міцній міжмолекулярній взаємодії [6]. Температура плавлення полігідроксибутирату, який синтезують мікроорганізми, коливається: мінімальне значення становить 157°C, максимальне – близько 188°C; питома вага полімеру від – 1,23 до 1,25 г/см³.

Полігідроксибутират розчиняється в хлороформі, трихлоретилені, етилацетаті, диметилформальдегіді, фенолі, тіамінгідразині, льодяній оцтовій кислоті, камфорі і NaOH; не розчиняється в метанолі, етанолі, ацетоні, гексані, воді, розведених мінеральних кислотах.

За своїми термопластичними властивостями мікробний полігідроксибутират близький до класичних хімічних полімерів (поліетилену та поліпропілену), піддається пресуванню в різні форми, і в зв'язку з цим має широкі перспективи використання [3]. Однак чистий ПГБ характеризується дуже низьким розтягуванням на розрив, а також більш високою температурою склування, ніж поліпропілен. Як і всі полігідроксіалканоати він стійкий до впливу УФ випромінювання, але нестійкий до розчинників, кислот і лугів [4].

Здатність до біологічного руйнування під дією позаклітинних мікробних деполімераз до CO₂ і H₂O робить полігідроксибутират надзвичайно перспективним для практики у порівнянні з хімічними полімерами, які не розкладаються і тому накопичуються в навколишньому середовищі [3].

У таблиці 1.1 наведено порівняльну характеристику полігідроксибутирату та поліпропілену для оцінки переваг біополімеру над звичайним хімічним полімером.

Найбільш вивченими організмами-накопичувачами ПГБ є роди *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Rhodospirillum* і *Pseudomonas* [6]. В клітинах ПГБ накопичується у вигляді гранул, які утворені щільно

упакованими тяжами, обмеженими фосфоліпідними оболонками з включеними в них білками. Субстратом для синтезу ПГБ можуть служити цукри, спирти, ацетат, водень, органічні кислоти. В даний час, з розвитком технологій і збільшенням обсягу наших знань, з'явилася можливість отримувати полігідроксибутират і його сополімери, використовуючи широкий спектр вихідних речовин, в тому числі з промислових відходів [4].

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика полігідроксибутирату та поліпропілену [3]

Властивості	Полігідроксибутират	Поліпропілен
Температура плавлення (°C)	180	176
Температура склування (°C)	15	- 20
Прозорість (%)	80	70
Молекулярна маса (г/моль)	$5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
Модуль згинання (ГПа)	4,0	1,7
Густина (г/см ³)	1,250	0,925
Подовження при розриві (%)	5	150
Границя міцності на розрив (МПа)	40	38
Стійкість до ультрафіолету	висока	низька
Стійкість до органічних розчинників	низька	висока

1.2 Практичне використання

В промисловому масштабі полігідроксиалканоати виробляють близько 8% компаній, які спеціалізуються на виробництві біопластиків. Основними факторами, що стримують великотоннажне виробництво ПГА, є висока вартість продукту, низька термічна стабільність і повільна кристалізація [7].

Перше промислове виробництво сополімерів ПГБ-ПГВ організувала в 1980 році англійська фірма ICA, який випускається і по сьогодні. Полімер отримав назву «Віорол». Він характеризується відносною термостабільністю, пропускає кисень, стійкий до агресивних хімікатів і має міцність, яку можна порівняти з поліпропіленом [8].

«Віорол» формується литтям під тиском або вакуумом. Продукт має широкий спектр застосувань, таких як упаковка, пляшки для шампуню, одноразові бритви, одноразові стаканчики, хірургічні нитки, хірургічні

шпильки, одноразові ножі та виделки, тканини, медичні пластирі та підкладки для пелюшок [9].

Завдяки своїм унікальним властивостям мікробіологічний полігідроксибутират знайшов застосування в багатьох областях медицини і фармакології, таких як системи спрямованого і пролонгованого вивільнення біологічно активних сполук (БАС). Подібні системи актуальні для застосування щодо лікарських препаратів, лікувальна ефективність яких знаходиться в прямій залежності від тривалого впливу на тканини і органи. Яскравим прикладом таких БАС є протиракові, психотропні, протитромбозні та багато інших препаратів [8].

ПГБ представляє безперечний інтерес для ортопедії. Можливості його використання для відновлювальної хірургії кісткових тканин досліджуються як з застосуванням власне ПГБ, так і на прикладі його композицій з гідроксиапатитом [10].

Однак гомополімер ПГБ може мати певні недоліки, такі як: висока гідрофобність та кристалічність, тривала біодеградація та низька пластичність, що у деяких випадках суттєво обмежує його використання як біоінженерних матеріалів у медицині, наприклад для виготовлення трансплантатів судин [5]. Подолати ці недоліки можливо шляхом отримання на основі ПГБ сополімерів, полімерних сумішей і композитів [11]. Тому розвиток нових біотехнологічних методів отримання нового сополімера ПГБ для біомедичних застосувань з оптимальним поєднанням фізико-хімічних та біологічних властивостей біоматеріалів, що виробляються з них, вважається найбільш перспективною тенденцією в сучасній біоінженерії [5].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Існує велика кількість мікроорганізмів, що можуть синтезувати полігидроксибутират – полімер класу поліестерів. Переважно полімер синтезують прокаріоти – серед них зустрічаються актиноміцети і ціанобактерії. В залежності від їх ізоляції з різних природних джерел, можна зробити висновок, що кожен мікроорганізм має особливі умови існування, такі як, наприклад, висока концентрація солей або жорсткі температурні умови. Для вибору найкращого біологічного агента серед мікроорганізмів родів *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Azotobacter* та *Streptomyces*, що здатні синтезувати полігидроксибутират, складемо порівняльну характеристику умов їх культивування та кількості виходу цільового продукту.

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

Такий продуцент як *Alcaligenes latus* ATCC 29714 у статті [12] був описаний як продуцент, що синтезує ПГБ на середовищі з сахарозою як джерелом вуглецю. Авторами статті було визначено, що джерело азоту як лімітуючий фактор підвищує накопичення ПГБ з 50 до 80% від маси сухих клітин, що значно полегшує подальшу обробку продукту.

Серед бактерій роду *Bacillus* у статті [6] найпотужнішими продуцентами ПГБ серед ізолятів з органічних відходів і зразків осадів морів вказано штами *Bacillus cereus* SE-1 та *Bacillus* sp. CS-605. Найбільший синтез полігидроксибутирату спостерігався при вирощуванні бактерій на середовищі з мальтозою, тоді як при вирощуванні на фруктозі, галактозі і декстрозі результати були значно меншими. Серед двох штамів кращим продуцентом виявився штам *B. cereus* SE-1, оскільки він синтезує більше цільового продукту.

Авторами статті [13] у якості сировини для синтезу ПГБ штамами

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору біологічного агента	Літера	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Сарницька А.О.						14	107
Перевір.	Стабніков В.П.							14
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог							

Streptomyces sp. запропонувано використовувати макуху через низьку вартість та доступність сировини.

Авторами статті [5] зазначено, що штам *Azotobacter chroococcum* 7В здатний синтезувати сополімер ПГБ – полі-3-гідроксибутират-3-гідроксивалерат, який має такі унікальні властивості, такі як висока біосумісність з органами та тканинами організму і здатність до біодеградації з виділенням нетоксичних продуктів, через що доцільно отримувати в масштабах промисловості саме його. Для синтезу ПГБ даним штамом використовується більш дорожча сировина, ніж відходи промисловості, однак саме цей показник зумовлює високий вихід цільового продукту і невеликі затрати в часі.

Ознайомившись із найвідомішими продуцентами полігідроксибутирату, можна підбити підсумки щодо умов їх культивування і виходу цільового продукту у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів полігидроксибутирату

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація продукту, г/л	Умови культивування	Література
<i>Alcaligenes latus</i> ATCC 29714	Середовище №1: сахароза – 20; Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O – 9; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 2; KH ₂ PO ₄ – 1,5; MgSO ₄ × 7H ₂ O – 0,2; FeCl ₂ × H ₂ O – 0,06; CaCl ₂ × 2H ₂ O – 0,01; TES* – 1 мл. Середовище №2 аналогічне середовищу №1, проте вміст (NH ₄) ₂ SO ₄ становить 0,2	3,96	Двостадійне культивування Стадія I: середовище №1, 16 год, 33°C, 200 об/хв Стадія II: середовище №1 + середовище №2, 28 год, 33°C, 200 об/хв	[12]
<i>Bacillus cereus</i> SE-1	Мальтоза – 10; Minimal Davis broth («HiMedia», India)** – 10 мл	5,63	pH 7,4 ± 0,2, 72 год, 37°C, 180 об/хв	[6]
<i>Streptomyces</i> sp. MAPPL 011	розчинний крохмаль – 10; KNO ₃ – 2; K ₂ HPO ₄ – 2; NaCl – 2; казеїн – 0,3 MgSO ₄ × 7H ₂ O – 0,05; CaCO ₃ – 0,02; FeSO ₄ × 7H ₂ O – 0,01.	4,26	20°C, 12 діб, 130 об/хв	[13]

<i>Azotobacter chroococcum</i> 7В	сахароза – 20; K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O – 1,05; цитрат натрію – 0,5; MgSO ₄ × 7H ₂ O – 0,4; KH ₂ PO ₄ – 0,2; CaCl ₂ – 0,1; FeSO ₄ × 7H ₂ O – 0,01; Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O – 0,006.	4,84	pH 7,0, 72 год, 30°C, 180 об/хв	[5]
--------------------------------------	---	------	------------------------------------	-----

Примітки:

* – 1 літр TES містить, г: H₃BO₃ – 0,3; CoCl₂ × 6H₂O – 0,2; ZnSO₄ × 7H₂O – 0,1; MnCl₂ × 4H₂O – 0,03; Na₂MoO₄ × 2H₂O – 0,03; NiSO₄ × 7H₂O – 0,028; CuSO₄ × 5H₂O – 0,001 [12].

** – 1 літр «Minimal Davis broth» містить, г: (NH₄)₂SO₄ – 1; KH₂PO₄ – 7; KH₂PO₄ – 2; цитрат натрію – 0,5; MgSO₄ × 7H₂O – 0,1 [14].

Порівняльна характеристика технологічного процесу, наведена у таблиці 2.1, якою мірою дозволяє скласти уявлення про переваги того чи іншого продуцента, однак її недостатньо, щоб чітко сформулювати свій вибір, тому у таблицях 2.2 і 2.3 наведено порівняльну характеристику економічної сторони культивування.

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>Alcaligenes latus</i> ATCC 29714	Середовище №1			
	Сахароза, 20	13	0,26	1
	Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O, 9	43	0,387	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 2	20	0,04	2
	KH ₂ PO ₄ , 1,5	65	0,0975	2
	MgSO ₄ × 7H ₂ O, 0,2	14	0,0028	2
	FeCl ₂ × H ₂ O, 0,06	90	0,0054	2
	CaCl ₂ × 2H ₂ O, 0,01	30	0,0003	2
	Розчин TES, 1 мл:			
	H ₃ BO ₃ , 0,3	75	0,0225	3
	CoCl ₂ × 6H ₂ O, 0,2	1020	0,26	1
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O, 0,1	24	0,0024	2
	MnCl ₂ × 4H ₂ O, 0,03	170	0,0051	2
	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O, 0,03	310	0,0093	4
	NiSO ₄ × 7H ₂ O, 0,028	270	0,00756	2
	CuSO ₄ × 5H ₂ O, 0,001	62	0,000062	2
	Вартість 1 л середовища – 1,1 грн			
	Середовище №2			
	Аналогічне середовищу №1, проте вміст (NH ₄) ₂ SO ₄ становить 0,2	20	0,004	1, 2, 3, 4
	Вартість 1 л середовища – 1,1 грн			
<i>Bacillus cereus</i> SE-1	Мальтоза, 10	225	2,25	2
	Мінімальний бульйон Девіса			
	K ₂ HPO ₄ , 7	60	0,42	2
	KH ₂ PO ₄ , 2	65	0,13	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1	20	0,02	2
Цитрат натрію, 0,5	40	0,02	2	

	MgSO ₄ , 0,1	93	0,0093	2
	Вартість 1 л середовища – 2,85 грн			
<i>Streptomyces</i> sp. MAPPL 011	Розчинний крохмаль, 10	30	0,3	2
	KNO ₃ , 2	70	0,14	2
	K ₂ HPO ₄ , 2	60	0,12	2
	NaCl, 2	60	0,12	2
	Казеїн, 0,3	430	0,129	2
	MgSO ₄ × 7H ₂ O, 0,05	14	0,0007	2
	CaCO ₃ , 0,02	13	0,00026	2
	FeSO ₄ × 7H ₂ O, 0,01	4,8	0,000048	2
	Вартість 1 л середовища – 0,81 грн			
	<i>Azotobacter chroococcum</i> 7В	Сахароза, 17	13	0,221
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O, 1,05		60	0,063	2
Цитрат натрію, 0,5		40	0,02	2
MgSO ₄ × 7H ₂ O, 0,4		14	0,0056	2
KH ₂ PO ₄ , 0,2		65	0,013	2
CaCl ₂ , 0,1		30	0,003	2
FeSO ₄ × 7H ₂ O, 0,01		4,8	0,000048	5
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O, 0,006		310	0,00186	1
Вартість 1 л середовища – 0,33 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на березень 2020 р. 1 – <https://flagma.ua/>, 2 – <https://prom.ua/>, 3 – <https://klebrig.com.ua/>, 4 – <https://systopt.prom.ua/>, 5 – <https://www.systopt.com.ua/ru>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту (полігідроксибутирату) при культивуванні різними продуцентами

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація продукту, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного продукту за годину, г/год
<i>Alcaligenes latus</i> ATCC 29714	1) 1,1 2) 1,1 Разом: 2,2	3,96	0,55	44	0,09
<i>Bacillus cereus</i> SE-1	2,85	5,63	0,506	72	0,078
<i>Streptomyces</i> sp. MAPPL 011	0,81	4,26	0,19	288	0,0148
<i>Azotobacter chroococcum</i> 7B	0,33	4,84	0,068	72	0,06

Ознайомившись із новими даними для порівняння продуцентів, можна зробити наступні висновки.

Середовище для вирощування *Streptomyces* sp. MAPPL 011 хоч і є відносно дешевим (0,81 грн), однак цей штам продукує значно меншу кількість цільового продукту за одиницю часу (0,0148 г/год) у порівнянні з іншими продуцентами, тому використовувати його не рентабельно.

Для культивування *Alcaligenes latus* ATCC 29714 використовується середовище, вартість якого є однією з найвищих із запропонованих варіантів (2,2 грн), хоча цей продуцент має найвищу продуктивність (0,09 г/год) серед усіх представлених. Оскільки різниця між найвищими кількостями утвореного продукту за годину не дуже велика, то недоліком культивування саме цього мікроорганізму є дороговартісне поживне середовище.

Як видно із таблиці, такі продуценти як *Bacillus cereus* SE-1 і *Azotobacter chroococcum* 7B дуже схожі за перерахованими критеріями для вибору біологічного агента. Єдиний показник, який суттєво відрізняє обидва мікроорганізми, це ціна поживного середовища для культивування. Середовище для *Azotobacter chroococcum* 7B коштує найдешевше із усіх зазначених (0,33 грн), а середовище для *Bacillus cereus* SE-1 є найдорожчим з усіх (2,85 грн), тому культивування азотобактеру є економічно вигіднішим.

Слід відзначити, що штам *Bacillus cereus* SE-1 є патогенним, тому використовувати його як продуцента небезпечно.

Таким чином, серед усіх запропонованих штамів можна виділити *Azotobacter chroococcum* 7B як найбільш вигідний продуцент із достатньо високою продуктивністю (0,06 г/год).

2.2. Перевірочний розрахунок складу поживного середовища для вирощування *Azotobacter chroococcum* 7B

Тривалість культивування 72 год, концентрація полігідроксибутирату в культуральній рідині становить 4,84 г/л, а концентрація біомаси – 5,8 г/л.

Потреби для синтезу полігідроксибутирату. Як джерело вуглецю для одержання полігідроксибутирату використовується сахароза.

Розрахуємо, скільки вуглецю міститься в 4,84 г полігидроксибутирату. Молекулярна маса полімеру складає 1710 кДа. 1 кДа = 10 г/моль, отже молекулярна маса полігидроксибутирату становить 17100 г/моль. Оскільки полігидроксибутират є полімером, кількість вуглецю з його брутто-формули визначити не можливо. Однак ми можемо підрахувати кількість атомів вуглецю у його мономері, і, поділивши молекулярну масу всього полімера на молекулярну масу одного мономера, дізнатися приблизну кількість мономерів у полімері. Помноживши кількість мономерів на кількість атомів вуглецю можна отримати кількість атомів вуглецю у всьому полімері, а отже і молярну масу вуглецю у полімері. Вона складатиме 9552 г/моль. Отже, у 17100 г полігидроксибутирату міститься 9552 г вуглецю, а в 4,84 г полігидроксибутирату $(4,84 \times 9552)/17100 = 2,96$ г вуглецю.

Далі розрахуємо, у скількох грамах сахарози міститься 2,96 г вуглецю, враховуючи, що вміст вуглецю у сахарозі становить 144 г/моль. Отже, у 342 г сахарози міститься 144 г вуглецю, а 2,96 г вуглецю міститься у $(2,96 \times 342)/144 = 7,03$ г сахарози.

Враховуючи, що при вирощуванні мікроорганізмів на сахарозі близько 40% субстрату окиснюється до CO_2 для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, вміст сахарози у середовищі становитиме $(7,03 \times 0,4) + 7,03 = 9,84$ г/л.

Потреби для синтезу біомаси. У біомасі міститься 50% вуглецю, отже вміст вуглецю у 5,8 г біомаси становить $5,8 \times 0,5 = 2,9$ г. Ця кількість вуглецю міститься у $(2,9 \times 342)/144 = 6,9$ г сахарози.

Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 5,8 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(6,9 \times 0,4) + 6,9 = 9,66$ г/л сахарози.

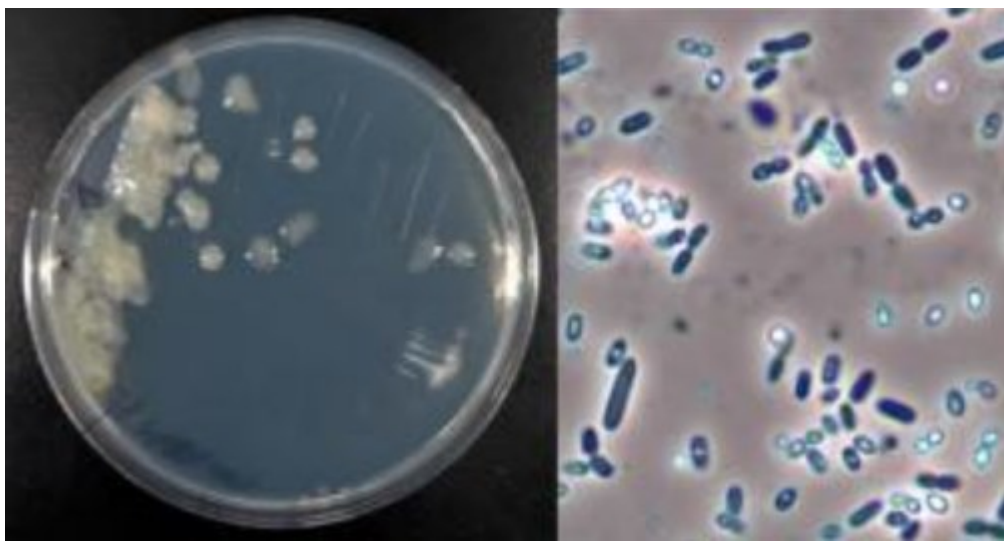
Отже, загальний вміст сахарози у середовищі, необхідний для синтезу біомаси (5,8 г/л) та полігидроксибутирату (4,84 г/л), становить $9,84 + 9,66 = 19,5$ г/л.

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

Azotobacter chroococcum – аеробні грамнегативні бактерії-азотфіксатори, що існують у мікробних спільнотах ризосфери рослин. Вони були відкриті М. В. Беєрінком у 1901 році як перші аеробні вільно існуючі бактерії, що здатні фіксувати азот з атмосфери.

2.3.1. Морфолого-культуральні ознаки

Великі клітини овальної форми діаметром 1,5 – 2,0 мкм, плеоморфні, паличкоподібні або кокоподібні. Розміщуються поодинокі, парами або групами неправильної форми, іноді у вигляді ланцюжків різної довжини [15]. Переважний характер зростання його колоній округлий, випуклий, блискучий, непрозорий, слизистої консистенції [16]. Ендоспор не утворюють, але утворюють цисти. Грамнегативні. Рухомі за рахунок перитрихіальних



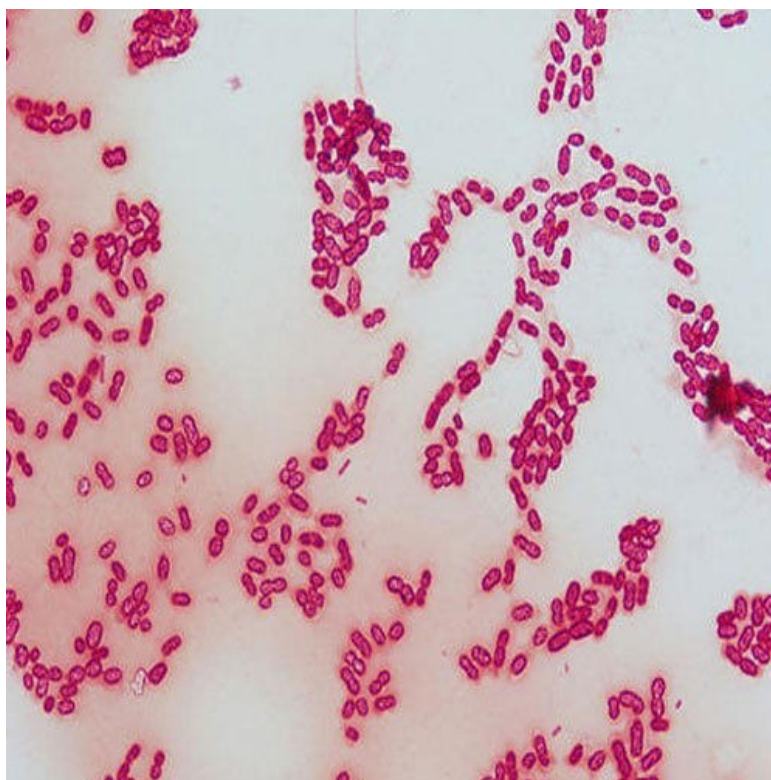
джгутиків або нерухомі [15].

Рис. 2.3.1. Колонії *A. chroococcum* та клітини під мікроскопом при збільшенні ($\times 40$)

2.3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки

Аероби, але можуть також рости при пониженому парціальному тиску кисню. Хемоорганогетеротрофи; азотфіксатори: зазвичай у несимбіотичному стані фіксують не менше 10 мг N_2 в розрахунку на 1 г спожитого субстрату. Для азотфіксації потребують молібден, який може бути частково замінений

ванадієм. Білки не гідролізують. У якості джерела азоту використовують нітрат і солі амонію, а також деякі амінокислоти. Каталазапозитивні. Діапазон рН для росту у присутності джерел зв'язаного азоту 4,8 – 8,5; оптимальний рН



для росту і азотфіксації 7,0 – 7,5. Зустрічаються у ґрунті і воді [15].

Рис. 2.3.2. *A. chroococcum* при збільшенні (×40)

Бактерії-азотфіксатори грають одну з основних ролей в кругообігу азоту в природі, вони здатні переводити молекулярний азот, що міститься в атмосфері, в розчинну, доступну для рослин форму. Також даний вид бактерій практично не проявляє антагоністичні властивості по відношенню до інших ґрунтових мікроорганізмів і фіксує азот в кількості, що не приводить до його надмірного накопичення в ґрунті.

Бактерії роду *Azotobacter* здатні сприймати широке коло органічних сполук – моносахариди, дисахариди, крохмаль, різні спирти і органічні кислоти. Для синтетичного обміну азотобактера велике значення мають джерела мінерального живлення, в першу чергу, фосфор і кальцій. Для повноцінного здійснення процесу фіксації азоту даному мікроорганізму

необхідні мікроелементи, найбільше значення має молібден, що є складовою частиною ферментів, які беруть участь в процесах засвоєння азоту [16].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

Класифікація для *A. chroococcum* наведена згідно електронної бази даних BacDive [17].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Gamma proteobacteria*

Порядок – *Pseudomonadales*

Родина – *Pseudomonadaceae*

Рід – *Azotobacter*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Компанія «МакДональдз Юкрейн Лтд» є однією з найпопулярніших ресторанних мереж в Україні і станом на 2019 рік в 20 містах та трьох селах України діють 93 ресторани. Масштабність і популярність такого бізнесу зростає з кожним роком, а разом з цим росте і об'єм відходів, який представлений в основному пакувальними матеріалами для готової їжі і сировини для її приготування.

Наприкінці 2020 року компанія запустила тестовий проект сортування й перероблення відходів із залів ресторанів, щоб покращити екологічну ситуацію у країні. Також у планах компанії є співробітництво із виробниками пакувальної тари, виробленої з переробленої сировини. Окрім цього, МакДональдз в Україні вже зробив кілька важливих кроків на шляху до виконання взятого на себе глобального зобов'язання відповідального використання ресурсів – одним з них є вторинна переробка використаних матеріалів. Пакування продуктів з кухні представлено понад 120 тоннами паперу, більш ніж 10 тоннами пластику й 3,5 тоннами пакувань Tetra Pak щомісячно [18].

Перехід на інші матеріали для упаковки може передбачати не тільки використання продукції вторинної переробки, а й використання біодеградабельних матеріалів, які не потребують переробки, а можуть безпечно розкладатися самостійно протягом кількох тижнів. Перехід доцільніше проводити поступово, тому для початку пропонується замінити лише 1,5% від числа загального обсягу пластикових відходів.

Якщо за місяць компанія утворює близько 10 тонн пластикових відходів, то річна кількість становитиме 120 тонн. 1,5% від 120 тонн становитиме 1800 кг.

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. Техніко- економічне обґрунтування</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Сарницька А.О.</i>					26	107 26
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог Т.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Продуцент полігідроксибутирату *Azotobacter chroococcum* 7В синтезує 4,84 г/л полігідроксибутирату [5]. Тоді для отримання 1800 кг полігідроксибутирату потрібно:

$$4,84 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$1800000 \text{ г} - X \text{ л}$$

$$X = 371900,83 \text{ л культуральної рідини.}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (30%), кількість культуральної рідини становитиме:

$$V_{\text{кр}} = 371900,83 / (1 - 0,3) = 531286,9 \text{ л.}$$

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Для забезпечення мережі ресторанів «МакДональдз» частиною річної кількості пакувальних матеріалів потрібно отримати 531,3 м³ культуральної рідини з урахуванням втрат при виділенні.

Розрахунок кількості стадій приготування посівного матеріалу можна отримати, розрахувавши кількість культуральної рідини, яку потрібно одержати за один цикл.

Кількість робочих трудоднів (Трд) становить 330 днів, тоді кількість культуральної рідини на добу буде:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / \text{Трд} = 531,3 / 330 = 1,61 \text{ м}^3.$$

Кількість культуральної рідини за цикл $V_{\text{цк}}$ буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 1,61 \times 82) / 24 = 6,05 \text{ м}^3,$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (72 год) та час підготовки ферментера (10 год), K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

6,05 м³ культуральної рідини можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{ЦК}}/K_{\text{зап}} = 6,05/0,5 = 12,1 \text{ м}^3,$$

де $K_{\text{зап}} = 0,5$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_{\Phi} = 12,5 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зФ}} = V_{\text{ЦК}}/ V_{\Phi} = 6,05/12,5 = 0,484,$$

що не задовольняє задане значення.

Виходячи з невідповідності коефіцієнта заповнення обираємо ферментер з геометричним об'ємом $V_{\Phi} = 12 \text{ м}^3$, що задовольнить задане значення.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зФ}} = V_{\text{ЦК}}/ V_{\Phi} = 6,05/12 = 0,5,$$

що не перевищує задане значення.

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{КР}} = 6,05 \text{ м}^3$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%, отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб1}} = V_{\text{КР}}/(1 - E_{\Phi}) = 6,05/(1 - 0,1) = 6,7 \text{ м}^3,$$

де E_{Φ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,5 - 0,6$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера (V_{Φ}), що становить:

$$V_{\Phi} = V_{\text{роб1}}/K_{\text{зап}} = 6,7/0,5 = 13,4 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{СФ}} = 12,5 \text{ м}^3$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб1}}/V_{\text{СФ}} = 6,7/12,5 = 0,54.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданого значення, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

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

$$V_{\text{ПС1}} = V_{\text{роб1}} / (1 + X_{\text{Ф}}) = 6,7 / (1 + 0,1) = 6,1 \text{ м}^3,$$

де $X_{\text{Ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{\text{ПМ1}} = V_{\text{роб1}} - V_{\text{ПС1}} = 6,7 - 6,1 = 0,6 \text{ м}^3.$$

Для одержання $0,6 \text{ м}^3$ інокуляту в посівному апараті враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб2}} = V_{\text{ПМ1}} / (1 - E_{\text{ПА}}) = 0,6 / (1 - 0,1) = 0,67 \text{ м}^3 = 670 \text{ л.}$$

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

$$V_{\text{ПС2}} = V_{\text{роб2}} / (1 + X_{\text{ПА}}) = 670 / (1 + 0,1) = 609,1 \text{ л.}$$

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

Кількість посівного матеріалу для посівного апарату становить:

$$V_{\text{ПМ2}} = V_{\text{роб2}} - V_{\text{ПС2}} = 670 - 609,1 = 60,9 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб2}} = 0,609 \text{ м}^3$ можна одержати під час культивування біологічного агенту у посівному апараті з геометричним об'ємом:

$$V_{\text{ПА2}} = V_{\text{роб2}} / K_{\text{зап}} = 670 / 0,6 = 1,12 \text{ м}^3.$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{СФ}} = 1,25 \text{ м}^3$, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап2}} = V_{\text{роб2}} / V_{\text{СФ}} = 0,67 / 1,25 = 0,54.$$

Для одержання $60,9 \text{ л}$ посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які

становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб3}} = V_{\text{ПМ2}} / (1 - E_{\text{ІН}}) = 60,9 / (1 - 0,1) = 67,7 \text{ л.}$$

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

$$V_{\text{ПС3}} = V_{\text{роб3}} / (1 + X_{\text{ІН}}) = 67,7 / (1 + 0,1) = 61,5 \text{ л,}$$

де $X_{\text{ІН}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{ПМ3}} = V_{\text{роб3}} - V_{\text{ПС3}} = 67,7 - 61,5 = 6,2 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб3}} = 67,7$ л можна одержати під час культивування біологічного агента в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{\text{ІН3}} = V_{\text{роб3}} / K_{\text{зап}} = 67,7 / 0,6 = 112,83 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий до $V_{\text{ІН3}}$ за об'ємом ферментер $V_{\text{Ф}} = 160$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап3}} = V_{\text{роб3}} / V_{\text{СФ}} = 67,7 / 160 = 0,42.$$

Для одержання 6,2 л посівного матеріалу в інокуляторі враховуємо втрати в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Тоді кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{роб4}} = V_{\text{ПМ3}} / (1 - E_{\text{ІН}}) = 6,2 / (1 - 0,1) = 6,9 \text{ л.}$$

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

$$V_{\text{ПС4}} = V_{\text{роб4}} / (1 + X_{\text{ІН}}) = 6,9 / (1 + 0,1) = 6,3 \text{ л,}$$

де $X_{\text{ІН}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для інокулятора.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{ПМ4}} = V_{\text{роб4}} - V_{\text{ПС4}} = 6,9 - 6,3 = 0,6 \text{ л} = 600 \text{ мл.}$$

Кількість інокуляту $V_{\text{роб4}} = 6,9$ л можна одержати під час культивування біологічного агента в інокуляторі геометричним об'ємом:

$$V_{\text{IH4}} = V_{\text{роб4}}/K_{\text{зап}} = 6,9/0,6 = 11,5 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий до V_{IH4} за об'ємом ферментер $V_{\text{Ф}} = 20$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап4}} = V_{\text{роб4}}/V_{\text{СФ}} = 6,9/20 = 0,35.$$

Кількість інокуляту для засіву малого інокулятора $V_{\text{ПМ4}} = 0,6$ л можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{ЗК}} = 0,2$.

Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{ПМ4}}/(V_{\text{колб}} \times K_{\text{ЗК}}) = 600/(750 \times 0,2) = 4.$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 качалочні колби.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу полігидроксibuтирату у ферментері об'ємом $12,5 \text{ м}^3$ з коефіцієнтом заповнення $0,51$ буде проходити у чотири етапи.

Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу полігидроксibuтирату бактеріями *Azotobacter chroococcum* 7В приймаємо до встановлення один ферментер об'ємом $12,5 \text{ м}^3$, один інокулятор об'ємом $1,25 \text{ м}^3$, один інокулятор об'ємом $0,16 \text{ м}^3$ та один інокулятор об'ємом 20 л.

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ростовим субстратом для вирощування *Azotobacter chroococcum* 7В є сахароза [5]. Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [19] наводимо схему перетворення вуглеводу, відмінного від глюкози, за шляхом Ембдена-Меєргофа-Парнаса (додаток 1, 2).

Сахароза під дією ферменту β -фруктофуранозидози (КФ 3.2.1.26) перетворюється на сахарозо-6-фосфат. Остання за дії β -фруктофуранозидози (КФ 3.2.1.26) розкладається на глюкозо-6-фосфат і D-фруктозу, яка за допомогою фруктокінази (КФ 2.7.1.4) стає фруктозо-6-фосфатом. Глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9) перетворює фруктозо-6-фосфат на глюкозо-6-фосфат, а фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2) – глюкозо-6-фосфат на глюкозо-1-фосфат, після чого останній залучається до гліколізу.

Утворений раніше глюкозо-1-фосфат під дією фосфоглюкомутази (КФ 5.4.2.2) стає глюкозо-6-фосфатом. Далі глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9) перетворює його на фруктозо-6-фосфат, який під дією 6-фосфотриозофруктокінази II (КФ 2.7.1.11) перетворюється на фруктозо-1,6-дифосфат. Ферментативна дія фруктозо-1,6-дифосфатальдолази (КФ 4.1.2.13) на фруктозо-1,6-фосфат зумовлює перетворення її на гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетонфосфат, який під дією триозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат. Під дією гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази I (КФ 1.2.1.12) гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється на 1,3-дифосфогліцерат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у 3-фосфогліцерат. Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на 3-фосфогліцерат перетворює його на 2-фосфогліцерат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) 2-фосфогліцерат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	Літера	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Сарницька А.О.					32	107
Перевір.		Стабніков В.П.						32
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

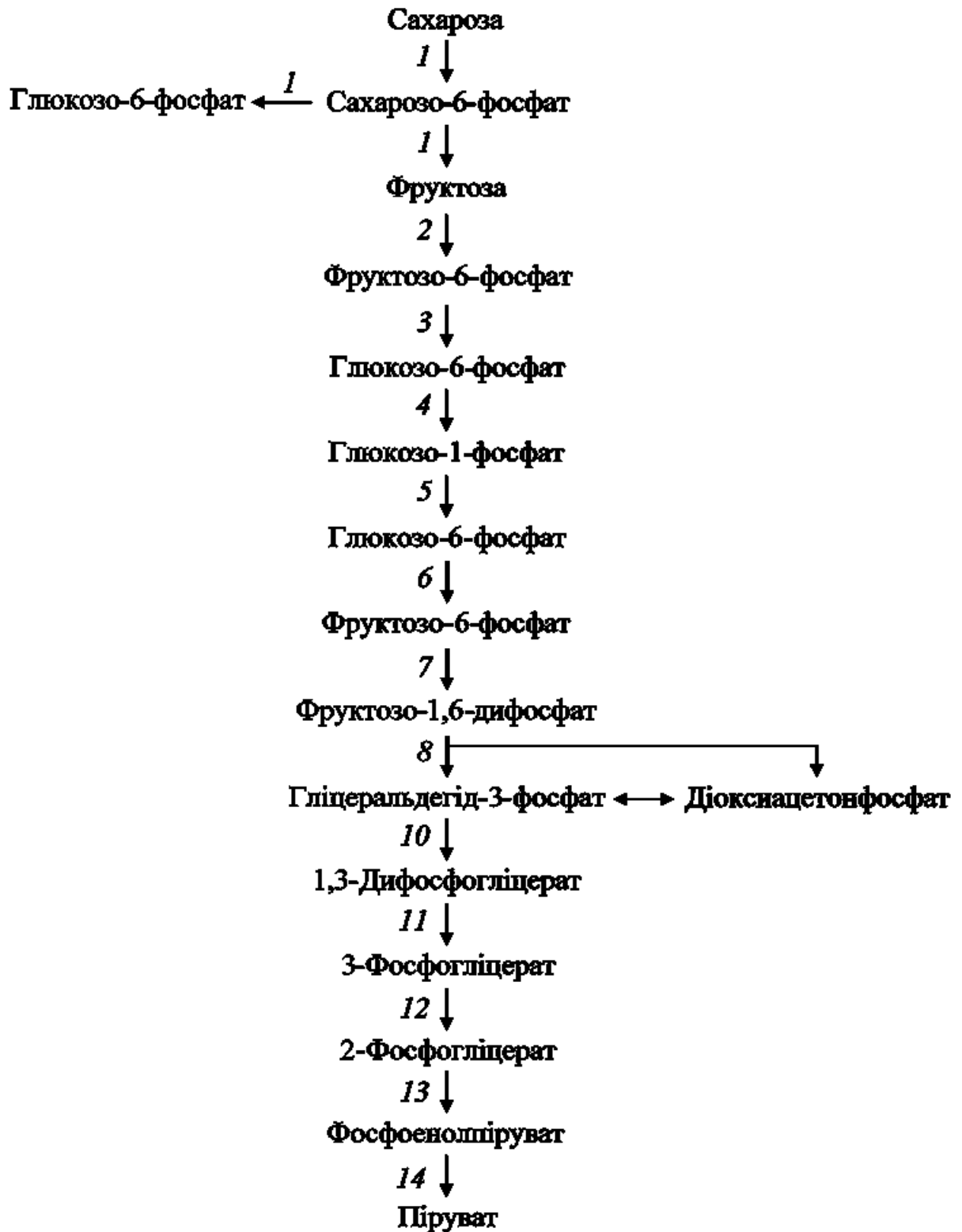


Рис. 4.1.1. Шлях катаболізму сахарози у *Azotobacter chroococcum* 7В

Ферменти: 1 – β -фруктофуранозідаза (КФ 3.2.1.26); 2 – фруктокіназа (КФ 2.7.1.4); 3 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 4 –

фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 5 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 6 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ 5.3.1.9); 7 – 6-фосфатфруктокіназа II (КФ 2.7.1.11); 8 – фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза (КФ 4.1.2.13); 9 – тріозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 10 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа I (КФ 5.4.2.12); 11 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 12 – 2,3-дифосфогліцерат залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.12); 13 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 14 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.40).

4.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Оскільки сахароза є вуглеводом, то у *A. chroococcum* ТВ буде функціонувати цикл трикарбонових кислот для анаплеротичних реакцій та для подальшого утворення цільового продукту. Робота ЦТК починається із ацетил-КоА, який утворюється із пірувату. Піруват, в свою чергу, одержується із гліколітичного шляху, який починається із перетворення кінцевого продукту катаболізму сахарози – глюкозо-1-фосфату – на глюкозо-6-фосфат. Із ацетил-КоА починається утворення цільового продукту біосинтезу: ацетил-КоА ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.9) перетворює ацетил-КоА на ацетоацетил-КоА. Далі останній під дією ацетоацетил-КоА редуктази (КФ 1.1.1.36) перетворюється на 3-гідроксибутират-КоА, а полігідроксиалканоатсинтаза (КФ 2.3.1.-) перетворює 3-гідроксибутират-КоА на полі-3-гідроксибутират.

Схему перетворення ростового субстрату сахарози на кінцевий продукт полігідроксибутират наведено у *додатках 3, 4*.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Azotobacter chroococcum 7В – аеробний штам, оптимальний ріст якого забезпечується температурою 30°C і нейтральним значенням рН [5, 15]. При таких умовах культивування з'являється ризик контамінації сторонніми мікроорганізмами, тому процес необхідно проводити у асептичних умовах. Забезпечення асептичних умов під час біосинтезу неможливо при поверхневому культивуванні, тому доцільніше буде обрати глибинний спосіб, який забезпечить максимальну ефективність процесу біосинтезу.

Оскільки цільовий продукт біосинтезу є вторинним метаболітом, то його синтез відбуватиметься у стаціонарній фазі росту продуцента. Так як необхідності у підтримці експоненційної фази росту мікроорганізму немає, культивування буде здійснюватись періодичним способом.

Отже, виходячи із фізіологічних особливостей продуцента та особливостей біосинтезу цільового продукту, культивування буде здійснюватись періодично глибинним способом у аеробних умовах із забезпеченням асептики проведення процесу.

Із зазначених даних про фізіолого-біохімічні особливості продуцента обираємо оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення необхідних умов.

Для забезпечення аерації у апараті повинні бути встановлені барботер та мішалка. Серед найпоширеніших типів мішалок (турбінна, лопатева, аерліфтна, пропелерна) обираємо найпростішу, оскільки продуцент не має особливих потреб у забезпеченні киснем. Такою мішалкою є лопатева, перевагою якої є простота конструкції. Пристрої для подачі повітря

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	Літера	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Сарницька А.О.					35	107
Перевір.		Стабніков В.П.						55
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

поділяються на три типи: прямокутний, кільцевий, та променевий. Серед них обираємо променевий, оскільки він більш зручніший в експлуатації, так як «промені» легко знімаються і очищуються.

Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою та датчиком температури.

Для запобігання можливого утворення піни можна використовувати механічний спосіб піногасіння, оскільки очікуваний об'єм піни в залежності від компонентів середовища має бути невеликим. Такий спосіб піногасіння передбачає встановлення мішалки у верхній частині апарата і належного датчика утворення піни.

Значення рН та розчинності кисню повинні контролюватися спеціальними датчиками.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Штам продуцента полігидроксibuтирату *Azotobacter chroococcum* 7В є аеробом, що споживає азот, необхідний для росту, з повітря. Ці фактори роблять підготовку стерильного аераційного повітря дуже важливою задачею.

Для стерилізації повітря в боксах та лабораторіях, де працюють з посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи (опромінення ультрафіолетовими променями).

Забір атмосферного повітря буде здійснюватися за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у точці, яка знаходиться вище будівлі на 3 – 5 м, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

Далі здійснюється очищення повітря від пилу на плоских тканинних фільтрах грубого очищення та стиснення повітря в компресорах або турбоповітрядувках. Для охолодження стисненого повітря до температури «точки роси» використовують водяні теплообмінники. Потім повітря подається у ресивер для видалення конденсованої вологи.

Подальше очищення повітря у головних ємністних набивних фільтрах здійснюється до ступеня очищення $E = 95\%$. Головні фільтри встановлюються поблизу ферментаційного відділення. Потім повітря від головних фільтрів

через трубопроводи подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері, які дають змогу отримати повітря із ступенем очищення $E = 99,99\%$.

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

У виборі засобів для миття необхідно керуватися не тільки основними вимогами до миючих засобів, а і їх складом, вартістю та витратами на площу поверхні об'єкта. З цього слідує, що засоби мають бути безпечними, активними, недорогими і універсальними щодо взаємодії з поверхнями оброблювальних об'єктів.

Одним із таких засобів є каустична сода або гідроксид натрію, який характеризується ефективним видаленням органічних забруднень. Варто відмітити, що ціна на даний засіб відрізняється в залежності від форми випуску засобу (твердий або рідкий). Оскільки концентрація робочого розчину має становити не більше 2%, буде доцільніше обрати сухий сипкий засіб, який можна приготувати на виробництві [20].

Ще одним засобом, який задовольняє потреби щодо миючих засобів, є «Сурфаніос Преміум НПК UA», який поєднує у собі як миючі, так і антимікробні властивості із широким спектром дії. Засіб є універсальним щодо застосування для різних типів поверхонь, містить детергенти, не відноситься до категорії вогне- та вибухонебезпечних і має здатність біологічно розкладатись [21].

Миття емнісного обладнання (ферментер для виробничого біосинтезу об'ємом 12,5 м³, посівний апарат об'ємом 1,25 м³, інокулятори об'ємами 160 та 20 л, реактори змішувачі різних об'ємів) доцільно здійснювати циркуляційним способом, оскільки для якісної очистки та дезінфекції такого обладнання слід застосовувати максимальну концентрацію дезінфікуючих засобів. Максимальна концентрація у розчинах передбачає виключно автоматичну подачу засобів у оброблювальні об'єкти, оскільки такі умови є небезпечними для ручного миття.

Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва для обладнання, інвентарю та комунікацій становить 110 разів, оскільки виробничий біосинтез здійснюється 3 доби протягом 330 робочих днів.

Для миття стін, підлоги, вікон та дверей можна застосувати такі засоби як «Хлормісепт Люкс» та «Фамідез Екстра», які також мають властивості як миючих, так і дезінфікуючих засобів, що дає змогу зберегти кошти [22, 23].

Додатково слід застосовувати окремий дезінфікуючий засіб, оскільки у мікроорганізмів може з'явитися резистентність до засобів, якими поверхні будуть оброблюватися протягом усього періоду виробництва. Таким засобом може бути дезінфектор «Мікробак» [24].

Серед запропонованих засобів наявні класи хімікатів, що значно між собою різняться. Це обумовлено тим, що різні активні речовини мають різний характер впливу на шкідливу мікрофлору, а охопити великий спектр збудників небезпечних захворювань – це дуже важливе завдання. Не менш важливими є показники витрат засобів, а також їх ціна.

Розглянемо класи, до яких відносяться запропоновані засоби, за допомогою яких буде здійснюватися хімічна дезінфекція.

Гідроксид натрію відноситься до класу лугів. Це добре розчинні основи, що у водному розчині утворюють високу концентрацію гідроксильних іонів. Бактерицидна здатність лугу прямо пропорційна ступеню його дисоціації на іони. Механізм дії залежить від об'єкта та середовища. При контакті з білками вони спричинюють їхню денатурацію з утворенням альбумінів. Омилюють жири, руйнують вуглеводи. Такі ж зміни луги викликають і в цитоплазмі мікробної клітини при їхньому проникненні через клітинну оболонку. Дія на спору проявляється колоїдним набряканням білків оболонки, омиленням жирів, що призводить до ерозії оболонки, проникнення дезінфікуючої речовини в середину і руйнуванням компонентів спори. Клітини мікроорганізмів також руйнуються внаслідок зміни рН, відщеплення вологи і взаємодії лугів з білками.

Кислоти як дезінфектори виявляють схожу дію, що і луги. Їх бактерицидна здатність також пропорційна ступеню дисоціації їх на іони. Кислоти застосовуються рідше за луги через високу токсичність деяких представників, що ускладнює їх практичне застосування.

«Хлормісепт Люкс» відноситься до хлорактивних препаратів, що мають високу ефективність щодо більшості мікроорганізмів, за винятком спорових форм бацил, вірусів, синегнійної палички, цист найпростіших. Хлорактивні препарати 3-го покоління, до яких і відноситься даний засіб, виробляють як правило комбінованими, тобто вони містять у своєму складі миючі компоненти, інгібітори корозії. При тривалому використанні хлорактивних препаратів є ймовірність адаптації мікроорганізмів і виникнення дезрезистентних форм.

До альдегідних сполук з обраних засобів відноситься «Фамідез Екстра», який містить як активну діючу речовину гліоксаль, що впливає на мікробну клітину, не дисоціюючи на іони, а добре розчиняючись у ліпідах, нагромаджуючись у бактеріальній клітині, викликаючи її загибель. Препарати цієї групи мають широкий спектр антимікробної дії, вони знищують бактерії, у тому числі збудника туберкульозу, віруси, гриби. Сучасні альдегідовмісні препарати комплексні і, як правило, містять миючі добавки. Багато з них універсальні, оскільки призначені для дезінфекції інструментів та різних поверхонь. Однією з позитивних властивостей слід вважати тривалість зберігання активності робочих розчинів (до 14 діб) і можливість неодноразового використання робочих розчинів, що не тільки зручно у роботі з ними, але й підвищує економічну доцільність їх використання. Недоліком є підвищена леткість та подразнююча дія на слизові оболонки, а також потенційні канцерогенні властивості.

Засіб з назвою «Мікробак Форте» відноситься до четвертинних амонієвих сполук (ЧАС). Вони більш стабільні в порівнянні з іншими класами, мало агресивні щодо багатьох матеріалів і безпечніші для людини й навколишнього середовища, однак вони поступаються за біоцидними

властивостями хлоровмісним сполукам, сильним окисникам. Даний препарат характеризується активною бактерицидною, фунгіцидною (в тому числі і по відношенню до грибів роду *Candida*, пліснявих грибів) та віруліцидною дією. Крім природної стійкості до ЧАС в деяких мікроорганізмів спостерігається швидке звикання до дії цих препаратів.

Сильні окисники, наприклад, перекис водню, з широким спектром антимікробної дії, будучи екологічно безпечними, характеризуються низькою ефективністю щодо більшості мікроорганізмів. Вони знебарвлюють і руйнують оброблювані матеріали, викликають корозію металевих деталей устаткування, що робить їх не прийнятними для використання на багатьох об'єктах.

Спиртовмісні сполуки мають відносно швидку дію і високу активність серед багатьох видів мікроорганізмів та вірусів. Їх недоліком є відсутність впливу на спори та небезпечність у використанні.

Засіб під назвою «Сурфаніос Преміум НПК UA» містить як активну діючу речовину N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін. Це третинний амін. Спектр високої біоцидної активності цієї сполуки може зрівнятися тільки з активністю альдегіду і охоплює всі мікроорганізми, включаючи віруси, мікобактерії туберкульозу та спори. Характеризується високою мікробіологічною надійністю, малотоксичний, стабільний при зберіганні, добре розчинний у воді, не пошкоджує оброблювані об'єкти. Володіє хорошими миючими властивостями, а завдяки наявності вільних аміногруп і атома третинного азоту формує лужне середовище, що сприяє підвищенню антимікробної активності, особливо в комбінації з іншими речовинами [1].

Виходячи із характеристики препаратів, що пропонується застосовувати, можна сказати, що усі вони задовольняють основні вимоги до миючих та дезінфікуючих засобів, мають широкий спектр впливу на різні групи мікроорганізмів та вірусів, а також містять речовини-детергенти та ПАВ, що дає змогу застосовувати їх і як дезінфектори, і як миючі засоби.

Орієнтовний розрахунок потреби в дезінфекційних засобах для дезінфекції поверхонь у приміщеннях, обладнання тощо на 2020 рік

Таблиця 4.1.

№ з/п	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа, що підлягає дезінфекції, м ² (л)		Дезінфікуючий засіб			Кратність обробок			Потреби в деззасобах, л (кг)			
		При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні	Назва	Концентрація робочого розчину, %	Норма витрати робочого розчину на 1 м ² , л (кг)	На добу	На місяць	На рік	На одну обробку		На місяць	На рік
										При поточному прибиранні	При генеральному прибиранні		
1	Обладнання, інвентар, комунікації	23150 л	23150 л	Каустична сода	1 – 2%	0,1	–	10	110	2,315	2,315	69,45	763,95
2	Обладнання, інвентар, комунікації	23150 л	23150 л	Сурфаніос Преміум НПК UA	0,1 – 0,5%	0,1	–	10	110	2,315	2,315	69,45	763,95
3	Стіни, підлога, двері, вікна	240,75	240,75	Хлормісепт Люкс	До 0,1%	0,1	1	30	330	24,075	24,075	722,25	7944,75
4	Стіни, підлога, двері, вікна	240,75	240,75	Фамідез Екстра	До 5%	0,1	1	30	330	24,075	24,075	722,25	7944,75

5	Стіни, підлога, двері, вікна	240,75	240,75	Мікро бак Форте	2%	0,1	1	30	330	24,075	24,075	722,25	7944, 75
---	------------------------------------	--------	--------	-----------------------	----	-----	---	----	-----	--------	--------	--------	-------------

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого біосинтезу полігидроксибутирату *A. chroococcum* 7В використовується поживне середовище із таким складом (г/л):

- сахароза – 19,5;
- $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 1,05;
- KH_2PO_4 – 0,2;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,4;
- $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01;
- $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 0,006;
- цитрат натрію – 0,5;
- $CaCl_2$ – 0,1;
- рН – 7,0.

Згідно розрахунків, наведених у розділі 3, виробничий біосинтез полігидроксибутирату здійснюється у ферментері об'ємом 12,5 м³, що містить 6,05 м³ середовища. Одержання інокуляту відбувається у чотири етапи (у колбах на качалці, інокуляторах та посівному апараті об'ємами 20, 160 і 1250 л відповідно).

Стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках буде здійснюватися у автоклаві через невеликі об'єми середовища. Стерилізація поживного середовища для інокуляторів об'ємом 20 та 160 л буде здійснюватися у збірниках та в автоклаві. Для стерилізації поживного середовища для посівного апарату об'ємом 1250 л будуть застосовані збірники. Для стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу буде застосовуватися установка безперервної стерилізації.

5.1.4.1. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках

Сахароза є термолабільним компонентом, тому потребує м'якого режиму стерилізації. Щоб уникнути випадання осадів солей, деякі з них

стерилізують окремо:

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

Композиція Б: $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Композиція В: $MgSO_4 \times 7H_2O$, цитрат натрію, $CaCl_2$, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Стерилізацію усіх композицій здійснюють у автоклаві.

5.1.4.2. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівних апаратах

Для стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту у посівних апаратах потрібно поділити компоненти на такі композиції.

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

Композиція Б: $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, KH_2PO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Композиція В: $MgSO_4 \times 7H_2O$, цитрат натрію, $CaCl_2$, $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$ (режим стерилізації: 131°C, 40 хв).

Для стерилізації середовища для інокуляторів об'ємом 20 і 160 л потрібно використовувати збірники для композиції А; композиції Б і В стерилізуються в автоклаві через їх невеликі об'єми. Для посівного апарату об'ємом 1250 л потрібно використовувати збірники для кожної композиції окремо.

Через невеликі кількості солей $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ та $FeSO_4 \times 7H_2O$ необхідно передбачити приготування їх розчину для підживлення. Для кожного етапу вирощування інокуляту в посівних апаратах необхідно приготувати по 1 л розчину, стерилізація буде відбуватися в автоклаві при 131°C протягом 40 хв.

5.1.4.3. Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу

Стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу буде відбуватися в установці безперервної стерилізації потужністю 6 м³/год. Для

цього усі компоненти необхідно змішати у одному реакторі-змішувачі.

5.1.4.4. Обґрунтування вибору розчинів для регуляції рН та піногасника

Оскільки у поживному середовищі для культивування наявні компоненти, що здатні утворювати нерозчинні осади, потрібно вжити заходів щодо попередження їх утворення. Таким заходом є додавання у середовище 6%-го розчину соляної кислоти для зниження рН із наступною підтитрівкою 6%-вим розчином NaOH для приведення його до оптимального значення (рН 7,0). Отже, у технологічній схемі необхідно передбачити приготування цих розчинів для посівних апаратів 160 і 1250 л.

Розчин кислоти, на відміну від розчину лугу, попередньої стерилізації не потребує, оскільки він подається у нестерильне середовище. Режим стерилізації лугу: 131°C, 40 хв.

Так як у поживному середовищі наявні компоненти, які при перемішуванні здатні утворювати піну, необхідно обрати оптимальний спосіб піногасіння. Серед фізичних, механічних та хімічних способів найефективнішими є останні, оскільки інші методи характеризуються складністю у виконанні та обслуговуванні порівняно з хімічними. Однак, виходячи з властивостей компонентів поживного середовища, очікуваний об'єм піни має бути невеликим, тому оптимальним варіантом також буде використання механічного піногасника. Такий спосіб піногасіння передбачає встановлення мішалки у верхній частині апарата і належного датчика утворення піни.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Цільовим продуктом біосинтезу є полігідроксibuтират, який є перспективним заміником пластмас, що не здатні до біодеградації. Із отриманого продукту передбачається виготовлення одноразового пакування для їжі, отже матеріал має бути безпечним для контакту із продуктами харчування.

Найпоширенішим методом виділення полігідроксibuтирату є наступні процеси у такій послідовності [25]:

- 1) відділення біомаси;
- 2) сушіння біомаси;
- 3) екстракція клітин хлороформом;
- 4) фільтрування від клітинних залишків;
- 5) осадження полігідроксибутирату ізопропіловим спиртом;
- 6) висушування.

Для забезпечення більш якісного очищення пропонується провести центрифугування суспензії після осадження в ізопропіловому спирті.

Полігідроксибутират є внутрішньоклітинним метаболітом бактерій *Azotobacter chroococcum* 7B, що накопичується у вигляді гранул [4]. Полігідроксибутират розчиняється в хлороформі, трихлоретилені, етилацетаті, диметилформальдегіді, фенолі, тіамінгідразині, льодяній оцтовій кислоті, камфорі і NaOH; не розчиняється в метанолі, етанолі, ацетоні, гексані, воді, розведених мінеральних кислотах [3]. Чистий полігідроксибутират характеризується дуже низьким розтягуванням на розрив, а також високою температурою склування. Як і всі полігідроксіалканоати він стійкий до впливу УФ випромінювання, але нестійкий до розчинників, кислот і лугів [2].

5.2.1. Вибір способу відокремлення біомаси та відповідного обладнання

Для виділення біомаси існує ряд ефективних способів: фільтрування, сепарування, центрифугування тощо. Розглянемо переваги і недоліки кожного з основних методів.

Фільтрування бактеріальних суспензій характеризується низькою продуктивністю, оскільки бактеріальна біомаса здатна забивати пори мембрани, що унеможливорює прохід рідкої фази. Через цей недолік фільтрувальна перегородка потребує заміни та регенерації, що суттєво ускладнює процес і приводить до втрат.

Процес сепарування ефективний тоді, коли відбувається розділення мікроорганізмів, що мають розміри більше 5 мкм. Оскільки розміри продуцента полігідроксибутирату *A. chroococcum* 7B, значно менші (1,5 – 2

мкм), використання такого процесу може призвести до суттєвих втрат, що є недоліком [15].

На відміну від вище наведених процесів, спосіб центрифугування характеризується більш високим фактором розділення, що дозволяє зменшити втрати біомаси при відділенні. Це робить його найоптимальнішим варіантом для вибору методу виділення біомаси, отже, саме у такий спосіб буде здійснюватись перший етап виділення цільового продукту.

Вибір апарату для проведення центрифугування ґрунтується на в'язкості рідкої фази, різниці густин твердої та рідкої фаз та концентрації твердої фази у суспензії.

Фільтруючі центрифуги застосовують для розділення суспензій, що містять більше 10% дрібнозернистої, розчинної твердої фази. Осаджувальні ж центрифуги використовують для розділення малоконцентрованих суспензій з нерозчинною твердою фазою, розміром часток 5 – 40 мкм і концентрацією від 5%.

Зважаючи на низьку концентрацію твердої фази у суспензії доцільно буде використовувати шнекову центрифугу, яка дозволяє обробляти суспензії із концентрацією твердої фази 1 – 40%. Враховуючи розміри продуцента, необхідно підібрати обладнання із високим фактором розділення G (10000).

5.2.2. Обґрунтування вибору способу сушіння

Повнота виділення полігідроксibuтирату з біомаси бактерій значно залежить від способу обробки біомаси та способу екстракції. Пряма екстракція з сирової біомаси хлорорганічними розчинниками супроводжується рядом труднощів: вода, що міститься у клітинах, перешкоджає проникненню розчинника та утворює емульсії, а ліпіди, що переходять разом із полімером у екстракт, знижують асоціативні властивості розчинника. Все це призводить до зниження ефективності процесу екстракції, тому перед цим необхідно видалити зайву вологу.

Метод використання водних розчинів детергентів дозволяє успішно виділяти полімер з сирової біомаси, однак він не дає можливості отримати

продукт високої чистоти. У такому випадку необхідно застосовувати додаткову очистку продукту за допомогою органічних розчинників, але такий спосіб пов'язаний із залученням великих кількостей води та утворенням великих об'ємів стічних вод, забрудненими детергентами та клітинними структурами.

Ще одним методом видалення вологи з біомаси є сушіння. Під час сушіння, в результаті дії протеолітичних ферментів, відбувається денатурація білків. Температура суттєво впливає на інактивацію ферментів, а також під час сушіння біомаси клітинні ліпіди у присутності кисню окиснюються. Таким чином, сушіння дозволяє видалити клітинну вологу, що необхідно для наступних етапів виділення полігідроксибутирату [26].

Найпоширенішими методами сушіння біомаси перед екстракцією є високотемпературне сухоповітряне сушіння та сублімаційне.

З літератури [26] відомо, що сушіння у сухожарових шафах при високих температурах не дають високого виходу продукту. Це пов'язано з тим, що при денатурації білків утворюються вільні радикали, що деструктивно впливають на продукт, а також збільшується окиснення киснем. Крім цього, сушіння при високих температурах може вплинути на молекулярно-масові характеристики полімеру, суттєво їх знижуючи.

Сублімаційне висушування дозволяє отримати висушену біомасу з кінцевою її вологістю 0,5%. При цьому вихід полімеру складає 95% від початкової кількості в біомасі, а його чистота складає 99%.

Так як високотемпературне сушіння негативно впливає на повноті екстракції і характеристиках полімеру, доцільніше буде обрати саме сублімаційний спосіб сушіння, який мінімізує негативний вплив на якісні характеристики полімеру і забезпечує повну екстракцію. Пропонується використовувати терморадіаційний тип сублімаційної сушарки, оскільки вона дозволяє знизити енерговитрати.

Перед наступною технологічною операцією висушену біомасу у вигляді брикетів необхідно подрібнити. Для цього пропонується застосовувати

шокову дробарку, що дозволяє безперервно подрібнювати тверді та абразивні матеріали, на відміну від молоткових дробарок, які більше підходять для волокнистих та малоабразивних матеріалів, а також для виробництва пробіотиків через можливість зберігати життєдіяльність клітин.

5.2.3. Обґрунтування вибору способу руйнування клітин та екстракції

Вивчивши літературу [25, 27, 28] по темі було зроблено висновок, що найоптимальнішим способом руйнування клітин виробничого штаму *A. chroococcum* 7В буде метод, який дозволить разом із руйнуванням додатково обробити полігідроксибутират перед наступною стадією виділення.

Таким методом є екстракція, під час якої є і можливість руйнування висушених клітин при підвищеній температурі, і можливість розчинити накопичені в клітинах гранули полігідроксибутирату, щоб на наступній стадії осадити його із вихідного розчину.

У патенті [25] описано багато методів, де у якості екстрагентів застосовуються такі речовини як хлороформ, 1,2-дихлоретан, 1,1,2-трихлоретан, 1,1,2,2-тетрахлоретан, оцтова кислота та оцтовий ангідрид. У випадку останніх при підвищенні до 70°C відбувається гелеутворення і змішування із побічними компонентами біомаси. При цьому частина розчинника зберігається у полігідроксибутираті, надаючи продукту специфічний запах, що є суттєвим недоліком. Не виключається також гідроліз полігідроксибутирату із зменшенням молекулярної маси.

При використанні 1,2-дихлоретану тощо є можливість отримати чистий полігідроксибутират, однак при охолодженні такі суміші схильні до гелеутворення. Використання хлороформу дає більший його вихід, чому і надамо перевагу, оскільки чистий полігідроксибутират доцільніше використовувати у медичній галузі. Варто відмітити, що 1,2-дихлоретан, 1,1,2-трихлоретан, 1,1,2,2-тетрахлоретан є значно токсичнішими за інші розчинники.

5.2.4. Вибір способу виділення цільового продукту з екстракту

У якості екстрагенту пропонується використовувати хлороформ, оскільки він дає більший вихід полігидроксibuтирату та не утворює побічних продуктів реакцій. Для зруйнування клітин необхідно передбачити нагрів екстрагенту до 40°C. При такій температурі не відбуватиметься випаровування екстрагента ($t_{\text{кип}} = 61,2^\circ\text{C}$), і процес екстракції відбуватиметься повніше [25, 29].

Після процесу екстракції необхідно відділити залишки зруйнованих клітин, оскільки вони більш не представляють ніякої цінності. Так як уламки клітин після руйнування будуть представлені структурними залишками клітин і матимуть досить малий розмір, пропонується використати метод ультрафільтрування, так як він дозволяє використовувати мембрани з діаметром пор від 0,01 до 0,1 мкм. Потрібний діаметр пор складатиме від 0,02 до 0,05 мкм, враховуючи те, що фільтрат складатимуть клітинні структури. Оскільки суміш, що піддається ультрафільтрації, має великий вміст хлороформу, матеріал мембрани має бути стійким до хлорвмісних сполук. Таким матеріалом є поліефірсульфат, що також легко очищається від органічного осаду зворотною промивкою при рН 12 та вище [30].

Розчинений у хлороформі полігидроксibuтират зазвичай осаджують різними спиртами, іноді сульфатною кислотою [12, 13, 29, 31]. У деяких випадках для якіснішого очищення застосовують метиловий спирт, але, зважаючи на його високу токсичність, використовувати його небезпечно, так само, як і сульфатну кислоту. Найпоширенішим і не менш ефективним нерозчинником є ізопропіловий спирт, який відноситься до класу помірно небезпечних речовин.

Для зниження витрат розчинників при сушінні, що потім направляються на регенерацію, і для безпечнішого перетікання процесу залишкову вологу необхідно видалити. Це можна зробити за допомогою методів фільтрування або центрифугування.

Суттєвим недоліком фільтрування є необхідність частої заміни фільтруючої перегородки, оскільки гранули полігидроксibuтирату забиватимуть пори, через що видалення непотрібної рідини унеможливиться.

Центрифугування ж використовувати більш доцільно, оскільки процес володіє такою перевагою як високий фактор розділення.

Оскільки концентрація твердої фази у суспензії не буде сильно високою, пропонується застосувати той самий тип обладнання, що і для відділення біомаси від культуральної рідини.

5.2.5. Вибір способу сушіння та сушарки

Залишкова волога у відцентрифугованій масі полігидроксibuтирату представлена ізопропіловим спиртом та хлороформом. Оптимальною температурою для випаровування залишку розчинників буде 60°C, до того ж такий параметр не пошкодить полігидроксibuтират згідно літератури [25].

Розпилювальна сушарка характеризується складністю своєї установки, що знижує її рентабельність. Ліофільне ж висушування може значно зашкодити цільовому продукту, оскільки передбачає зниження температури до 0°C, а температура склування полігидроксibuтирату, тобто температура, за якої матеріал втрачає свою пружність і стає крихким, становить 15°C.

Для забезпечення висушування без локального перегріву або охолодження матеріалу доцільно використовувати сушарки з «киплячим шаром», які також дозволяють легко регулювати кінцеву вологість матеріалу і дозволяють отримувати готовий продукт у формі гранул.

5.2.6. Обґрунтування вибору упаковки та об'єму упаковки

Відомо, що пакування з такого матеріалу як поліетилен – це дешевий та надійний спосіб захистити продукцію від впливів зовнішнього середовища. Така упаковка унеможлиблює контакт продукції із небажаною вологою, а також значна товщина шару упаковки може захистити продукцію від механічних ушкоджень. Однак реалізація такого пакування у виробництві полігидроксibuтирату буде недоречною, оскільки поліетилен не є екологічно

безпечним матеріалом, а цільовий продукт біосинтезу – полігідроксибутират – є і сам заміною таких матеріалів через свою здатність до біодеградації [32].

Альтернативою може стати паперове пакування. В якості матеріалу можна використовувати вже перероблений папір, що надалі також можна буде переробити. Оскільки полігідроксибутират за своїми хіміко-фізичними показниками не дуже вибагливий до умов зберігання, ліпшим захистом від впливів зовнішнього середовища, який демонструє упаковка з поліетилену, можна знехтувати [33].

Оскільки передбачається, що полігідроксибутират стане матеріалом для виробництва упаковки для їжі, то обирати малі об'єми пакування недоцільно. Крім цього, за один цикл виробництва отримується 20,7 кг продукту, що не є дуже великим об'ємом, який необхідно фасувати у окремі мішки. Отже, після стадії сушіння полігідроксибутират можна упакувати в 1 мішок з паперу.

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту

Так як сушіння полігідроксибутирату проводитиметься у сушарці з «киплячим шаром», для цього необхідно передбачити підготовку повітря, оскільки для апаратів такого типу потрібне очищене та нагріте повітря.

Забір атмосферного повітря буде здійснюватися за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у точці, яка знаходиться вище будівлі на 3 – 5 м. Після забору повітря піддається очищенню від пилу та інших механічних часточок у фільтрі грубої очистки, а далі направляється у калорифер для нагріву.

5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

Вихідні дані:

- об'єм культуральної рідини за один цикл – $V_{\text{КР}} = 6,05 \text{ м}^3$;
- концентрація цільового продукту у КР $C_{\text{ПГБ}} = 4,84 \text{ г/л}$;
- концентрація біомаси у КР $C_{\text{БМ}} = 5,8 \text{ г/л}$;

- втрати на стадіях виділення полігідроксибутирату складають 30%.

Початкова кількість полігідроксибутирату, яка поступає з КР складає $6,05 \text{ м}^3 \times 4,84 \text{ г/л} = 29,3 \text{ кг}$. Кінцева кількість (з урахуванням 30% втрат) має становити 20,5 кг.

Таблиця 5.4.1.

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 30%)	Вийшло	
ТП 8. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 8.1. Зберігання культуральної рідини	КР	6,05 м ³ (6050 л)	-	6,05 м ³ (5800 л)	Збірник КР 7 м ³
ТП 9. Відділення біомаси						
2	ТП 9.1. Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	33,64 кг (5,8 × 5,8) – АСБ, з урахуванням 90% вологості – 336,4 кг	6,7 кг (2%)	329,6 кг	Центрифуга продуктивністю 5 м ³ /год. Пересувна ємність для біомаси об'ємом 400 л
		Фугат	5713 л (6050 – 337)	-	5713 л	Збірник для фугату об'ємом 6 м ³
ТП 10. Сушіння біомаси						
3	ТП 10.1. Сушіння біомаси	Сира біомаса	329,6 кг (вологість 90%)	-	-	Сублімаційна сушарка продуктивністю 300 кг/партія
		Суха біомаса	36,26 кг (вологість 1%)	0,72 кг (2%)	35,54 кг	Пересувна ємність для висушеної біомаси об'ємом 40 л
ТП 11. Подрібнення біомаси						
4	ТП 11.1. Подрібнення біомаси	Суха біомаса	35,54 кг	-	-	
		Суха подрібнена біомаса	35,54 кг	0,35 кг (1%)	35,2 кг	Дробарка продуктивністю 100 кг/год

ТП 12. Руйнування клітин і розчинення полігідроксибутирату екстракцією						
5	ТП 12.1. Екстракція	Суха подрібнена біомаса	35,2 кг	-	-	Збірник об'ємом 300 л
		Хлороформ (1:8)	281,3 л	-	-	(подається з ємності до збірника об'ємом 300 л)
		Екстракт	-	47,5 л (15%)	269 л (35,2 + 281,3 – 15%)	
ТП 13. Виділення цільового продукту						
6	ТП 13.1. Ультрафільтрація від клітинних залишків	Екстракт	269 л	-	-	
		Ультрафільтрат	89,7 л (269 : 3)	-	-	Установка ультрафільтрації з продуктивністю 300 л/год Збірник фільтрату об'ємом 100 л (фільтрат – на ЗВ)
		Пермеат	179,3 л	3,6 л (2%)	175,7 л	(подається у збірник об'ємом 1 м ³)
7	ТП 13.2. Осадження	Пермеат	175,7 л	-	-	
		Ізопропіловий спирт (1:3 до кількості хлороформу)	843,9 л	-	-	(подається з ємності до збірника об'ємом 1 м ³)
		Суміш розчинників з продуктом	1019,6 л	40,8 л (4%)	978,8 л	Збірник об'ємом 1 м ³
ТП 14. Видалення розчинників						

8	ТП 14.1. Центрифугування суміші	Суміш розчинників з продуктом	978,8 л	-	-	
		Фугат	-	-	893,5 л	Збірник фугату об'ємом 1 м ³ (фугат – на регенерацію)
		Вологий осад	85,3 кг	(2%)	83,6 кг	Пересувна ємність об'ємом 100 л
ТП 15. Сушіння цільового продукту						
9	ТП 15.1. Сушіння у «киплячому шарі»	Вологий осад (вологість 80%)	83,6 кг	-	-	Сушарка з «киплячим шаром» продуктивністю 50 кг/партія
		Висушені гранули (вологість 5%)	20,9 кг	(1%)	20,7 кг	Пересувна ємність об'ємом 25 л
ПМВ 16. Пакування, маркування, відвантаження						
10	ПМВ 16.1. Пакування, маркування, відвантаження продукту	Висушені гранули	20,7 кг	-	-	Фасувально-пакувальна лінія з потужністю 1 уп/хв
		Упакований у кількості 20,5 кг у один мішок продукт	-	(1%)	20,5 кг	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт, виробничого біосинтезу та етапу виділення полігідроксibuтирату

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр фірми "Селтон" (Україна). Фільтруючий матеріал – поліестер/сітка оцинкована, E = 90% [http://selton.com.ua/ru/filtry-vozdushnye/cilindricheskie.html]
К-3	Компресор	1	Гвинтовий компресор KSD-10A (Швейцарія), потужність 1,2 м ³ /хв, робочий тиск до 1,2 МПа, габаритні розміри (мм): 1000 × 700 × 830 [https://compressor.dp.ua/vintovye-kompressory-keshidi]
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач Friulair AFR 11 фірми «Friulair» (Італія), продуктивність 1,1 м ³ /хв, робочий тиск 1,5 МПа, габаритні розміри (мм): 595 × 300 × 850, матеріал труб теплообмінника – мідь, алюміній [https://friulair.org/catalog/aftercoolers/afr/afr_11]
Р-5	Ресивер	1	Вертикальний ресивер РВ 500.15.00 фірми «Летісс Компресор Україна», об'єм 500 л, робочий тиск до 1,5 МПа, габаритні розміри (мм): 700 × 700 × 1800 [https://letiss.com.ua/aircast-remeza-resiveri/vozdushniy-vertikalniy-resiver-rv-5001500]
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Корпус теплообмінника Вентс НКВ 100-2 фірми «Вентс» (Україна) виготовлений із оцинкованої сталі, робочий тиск до 1,6 МПа [https://vents.ua/product/nkv-1002#description]
Ф-7	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтри фірми "New Filter" (Україна). Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно, E = 99,995 % [https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.htm]
ПЗ-8	Повітрязабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень

НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Сарницька А.О.		
Перевір.		Стабніков В.П.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Пирог Т.П.		
РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання				
		Літера	Аркуш	Аркушів
			57	107 57
Кафедра БТМ				

Ф-9	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр фірми “Селтон” (Україна). Фільтруючий матеріал – поліестер/сітка оцинкована, Е = 95% [http://selton.com.ua/ru/filtry-vozdushnye/cilindricheskie.html]
КР-10	Калорифер	1	Калорифер КПСК 4-6 фірми «SPE» (Україна) складається з тепловіддаючих елементів, трубних решіток, колекторів, знімних бічних щитів. Теплоносій – гаряча (перегріта) пара. Параметри теплоносія повинні бути не більш: робочий тиск 1,2 МПа; температура – 190(-50 + 10)°С [https://kaloriferu.com.ua/ua/p61480859-kalorifer-kpsk.html]
Р-11	Ресивер	1	Вертикальний ресивер РВ 500.15.00 фірми «Летісс Компресор Україна», об’єм 500 л, робочий тиск до 1,5 МПа, габаритні розміри (мм): 700 × 700 × 1800 [https://letiss.com.ua/aircast-remeza-resiveri/vozdushniy-vertikalniy-resiver-rv-5001500]
РЗ-12	Реактор-змішувач для приготування розчину кислоти хлоридної	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений перемішуючим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об’єм 15 л, швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє реактор необхідного об’єму на замовлення [34]
Н-13	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505А фірми “Насоси+” (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobezchnyj-poverhnostnyj-nasos.html]
РЗ-14	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації розчину гідроксиду натрію	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об’єм 20 л, швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє реактор необхідного об’єму на замовлення [34]
Н-15	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505А фірми “Насоси+” (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobezchnyj-poverhnostnyj-nasos.html]
РЗ-16	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішуючим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об’єм 10 л, швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє збірник необхідного об’єму на замовлення [34]
Н-17	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505А фірми “Насоси+” (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobezchnyj-poverhnostnyj-nasos.html]

Ф-18	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри фірми "New Filter" (Україна). Фільтруючий матеріал – міроскловолокно, E = 99,995 % [https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.html]
ФР-19	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер FMT серії PI фірми «Fermentec» (Південна Корея). Геометричний об'єм 20 л, діаметр апарата – 300 мм, корпус – нержавіюча сталь. Апарат обладнаний датчиками для контролю температури, рівня рН, рівня піни, концентрації розчиненого кисню, лопатевою мішалкою (180 об/хв) [http://fermentec.co.kr/eng/product/pilot-scale-fermenter/]
РЗ-20	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 100 л, швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
Н-21	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505A фірми "Насоси+" (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobezshnyj-poverhnostnyj-nasos.html]
РЗ-22	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 10 л, швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
Н-23	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505A фірми "Насоси+" (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobezshnyj-poverhnostnyj-nasos.html]
Ф-24	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри фірми "New Filter" (Україна). Фільтруючий матеріал – міроскловолокно, E = 99,995 % [https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.html]
ФР-25	Ферментер (інокулятор)	1	Ферментер FMT серії PI фірми «Fermentec» (Південна Корея). Геометричний об'єм 160 л, діаметр апарата – 600 мм, корпус – нержавіюча сталь STS316L, сорочка - нержавіюча сталь STS304. Апарат обладнаний датчиками для контролю температури, рівня рН, рівня піни, концентрації розчиненого кисню, лопатевою мішалкою (180 об/хв) [http://fermentec.co.kr/eng/product/pilot-scale-fermenter/]
РЗ-26	Реактор-змішувач для приготування	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішувачим

	та стерилізації композиції А		пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 1 м ³ л, швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
Н-27	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос фірми “Rudes” (Китай). Габаритні розміри (мм): 365 × 195 × 200. Продуктивність 3,2 м ³ /год [https://trudovik.com.ua/ua/shop/product/nasos-centrobezchnyj-nasosy-plus-js-110]
РЗ-28	Реактор-змішувач для приготування та стерилізації композиції Б	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішувачим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 100 л, швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
Н-29	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505A фірми “Насоси+” (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobezchnyj-poverhnostnyj-nasos.html]
Ф-30	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри фірми “New Filter” (Україна). Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно, Е = 99,995 % [https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.html]
ФР-31	Ферментер (посівний апарат)	1	Ферментер FMT серії PL фірми «Fermentec» (Південна Корея). Геометричний об'єм 1,25 м ³ , діаметр апарата – 1000 мм, корпус – нержавіюча сталь STS316L, сорочка - нержавіюча сталь STS304. Апарат обладнаний датчиками для контролю температури, рівня рН, рівня піни, концентрації розчиненого кисню, лопатевою мішалкою (180 об/хв) [http://fermentec.co.kr/eng/product/plant-fermenter/]
РЗ-33	Реактор-змішувач для змішування компонентів середовища для стерилізації в УБС	1	Реактор-змішувач фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений перемішувачим пристроєм, матеріал-нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 8 м ³ , швидкість перемішування 100 об/хв. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
Н-34	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос MRS-S 5 фірми “Sprut”. Габаритні розміри Продуктивність 6 м ³ /год [https://trudovik.com.ua/ua/shop/product/nasos-centrobezchnyj-sprut-mrs-s-5]
УБС-35	Установка безперервної стерилізації	1	Установка безперервної стерилізації SteriTherm™ VLA фірми «Alfa Laval» (Швеція). Продуктивність 6000 кг/год, габаритні розміри (мм): 7500 × 4000 × 3500. Установка складається з насоса, нагрівача-стерилізатора, теплообмінника-рекуператора, теплообмінника-охолоджувача та блока управління

			для автоматизації процесу. Матеріал корпусу – нержавіюча сталь AISI-304 [https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/process-solutions/thermal-solutions/steritherm-vla.pdf]
Ф-36	Фільтри індивідуальної очистки	1	Фільтри фірми “New Filter” (Україна). Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно, E = 99,995 % [https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/hepa_filtr.html]
ФР-37	Ферментер виробничий	1	Ферментер FMT серії PL фірми «Fermentec» (Південна Корея). Геометричний об’єм 12,5 м ³ , діаметр апарата – 1800 мм, корпус – нержавіюча сталь STS316L, сорочка - нержавіюча сталь STS304. Апарат обладнаний датчиками для контролю температури, рівня рН, рівня піни, концентрації розчиненого кисню, лопатевою мішалкою (180 об/хв) [http://fermentec.co.kr/eng/product/plant-fermenter/]
Н-38	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос MRS-S 5 фірми “Sprut”. Габаритні розміри Продуктивність 6 м ³ /год [https://trudovik.com.ua/ua/shop/product/nasos-centrobezhnyj-sprut-mrs-s-5]
З-39	Збірник культуральної рідини	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна), матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об’єм 7 м ³ . Виробник виготовляє збірник необхідного об’єму на замовлення [34]
Н-40	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос MRS-S 5 фірми “Sprut”. Габаритні розміри Продуктивність 6 м ³ /год [https://trudovik.com.ua/ua/shop/product/nasos-centrobezhnyj-sprut-mrs-s-5]
Ц-41	Центрифуга	1	Декантерна центрифуга «FLOTTWEG SEDICANTER» фірми «Flottweg» (Німеччина). Усі елементи з нержавіючої сталі 1.4571, проток – 1 т/год, швидкість – до 7750 об/хв [https://www.flottweg.com/ru/product-lines/decanter/]
Є-42	Пересувна ємність для біомаси	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений пересувними елементами, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об’єм 400 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об’єму на замовлення [34]
З-43	Збірник для фугату	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна), матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об’єм 6 м ³ . Виробник виготовляє збірник необхідного об’єму на замовлення [34]
С-44	Сушарка сублімаційна	1	Сублімаційна сушарка FD-300 фірми «KEMOLO» (Китай) продуктивністю 300 кг/партія. Оснащена вакуум-насосом та швидкозаморозильною камерою. Холодоагент – фреон R404A, температура конденсатора: -45°C; температура полиць: від -35°C до +60°C. Габаритні розміри: 4500 × 2000 ×

			2550 мм [https://www.liofilizador.com/products/91-ru.html]
Є-45	Пересувна ємність для висушеної біомаси	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений пересувними елементами, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 40 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
ДЩ-46	Дробарка щокова	1	Щокова дробарка фірми «FRITSCHE» (Німеччина) продуктивністю до 250 кг/год і з тонкістю помелу 0,3-15 мм [https://www.fritsch.com.ru/podgotovka-prob/izmelchenie/shchekovye-drobilki/detali/produkty/pulverisette-1-premium-line/].
Є-47	Пересувна ємність для висушеної біомаси	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений пересувними елементами, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 40 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
З-48	Збірник для екстракції	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішувачем, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 300 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
Є-49	Ємність для зберігання хлороформу	1	Ємність для зберігання хлороформу фірми «БВБ Альянс» (Росія) являє собою горизонтальний суцільнозварний металевий резервуар з двома конічними днищами, двома технологічними колодязями. Об'єм – 300 л [https://bvb-alyans.ru/product/emkosti_dlja_hranenija_hloroforma_lvzh_emkosti_gostemkosti_2_0/]
Д-50	Об'ємно-ваговий дозатор		Ваговий дискретний дозатор-витратомір для рідин фірми «Техноаги» (Україна). Складається з бункера, який закріплений на невеликому каркасі і комплектується впускним і випускним кранами з пневмоприводами і датчиками. Продуктивність 3 т/год [https://www.vostok.dp.ua/catalog/scale/doza/product.html?id=4115]
Н-51	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505A фірми «Насоси+» (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobeznyj-poverhnostnyj-nasos.html]
УФ-52	Ультрафільтраційна установка	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений паровою сорочкою та перемішувачем, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 300 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]. Установка ультрафільтрації УФ-401/402 (Росія) швидкістю подачі 144/284 л/хв. Габаритні розміри (мм) – 1400 × 1100 × 1900. Матеріал мембрани – поліетилсульфон, діаметр пор – 0,02 мкм [https://biotechno.ru/catalog/vydelenie-i-ochistka-

			produkta l/pilotnaya-ustanovka-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-401-402/]
З-53	Збірник для осадження	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений перемішуючим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 1 м ³ . Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
Є-54	Ємність для зберігання ізопропілового спирту	1	Горизонтальний сталевий двостінний резервуар фірми «Нефтепрактика» (Росія). Об'єм – 1 м ³ , діаметр резервуара – 1400 мм [https://barrel-rezervuar.ru/rezervuar-emkost-rgd-3-m3]
Д-55	Об'ємно-ваговий дозатор		Ваговий дискретний дозатор-витратомір для рідин фірми «Техноваги» (Україна). Складається з бункера, який закріплений на невеликому каркасі і комплектується впускним і випускним кранами з пневмоприводами і датчиками. Продуктивність 3 т/год [https://www.vostok.dp.ua/catalog/scale/doza/product.html?id=4115]
Н-56	Насос відцентровий	1	Поверхневий відцентровий насос DDPm 505A фірми “Насоси+” (Китай). Продуктивність 2,1 м ³ /год [https://aquavital.com.ua/ua/p76569597-tsentrobezhnyj-poverhnostnyj-nasos.html]
Ц-57	Центрифуга	1	Декантерна центрифуга «FLOTTWEG SEDICANTER» фірми «Flottweg» (Німеччина). Усі елементи з нержавіючої сталі 1.4571, потужність – 1 т/год, швидкість – до 7750 об/хв [https://www.flottweg.com/ru/product-lines/decanter/]
Є-58	Пересувна ємність для осаду	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений пересувними елементами, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 100 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
С-59	Сушарка з «киплячим шаром»	1	Сушарка з «киплячим шаром» GFG-30 фірми «KODI Machinery» (Китай) з нержавіючої та вуглецевої сталі. Продуктивність: 30 кг/партия, об'єм ємності для сировини – 330 л [http://sbn-impex.ru/magazin/product/sushilki-v-psevdoszhizhennom-sloe-serii-gfg]
Є-60	Пересувна ємність для висушеного продукту	1	Збірник фірми «Dushka-UA» (Україна) оснащений пересувними елементами, матеріал – нержавіюча сталь AISI-304. Загальний об'єм 25 л. Виробник виготовляє збірник необхідного об'єму на замовлення [34]
ФМ-61	Фасувальна машина	1	Фасувальна машина фірми “Техноваги” (Україна) з нержавіючої сталі. Маса дози – від 10 до 50 кг. Точність дозування: 0,5 – 1%. Дозування – вагове. Продуктивність – до 4-6 уп/хв [https://technowagy.com.ua/products/fasovochnaya-mashina-dlya-sypuchih-produktov-v-otkrytye-meshkido-50-kg/]

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

Технологічна схема біосинтезу полігідроксибутирату включає допоміжні роботи (підготовку аераційного повітря, підготовку піногасника, підготовку титрувальних агентів, підготовку розчину солей для підживлення, підготовку та стерилізацію поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і виробничий біосинтез полігідроксибутирату).

Технологічну схему наведено у графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником **ПЗ-1** у найвищій точці (Н ~ 10 м) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 1.2. Очищення повітря від пилу і механічних часточок

Очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) відбувається на плоских фільтрах грубого очищення **Ф-2**.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Повітря стискається в компресорі **К-3** (при цьому повітря нагрівається до температури 120–200 °С).

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується, відбувається у теплообміннику-охолоджувачі **Т-4**. Видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, здійснюється у ресивері **Р-5**.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Підігрівання повітря до температури парою здійснюється у теплообміннику-нагрівачі **Т-6** для стабілізації показників ($W = 60\%$, $t = 30^\circ\text{C}$).

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	Літера	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Сарницька А.О.					64	107
Перевір.		Стабніков В.П.						04
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Очищення повітря відбувається у головних ємнісному набивному фільтрі **Ф-7** до ступеня очищення $E = 95\%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Очищення повітря здійснюється в індивідуальних фільтрах з мікроскловолоконном. Повітря від головного фільтра через трубопроводи подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на інокуляторах, посівному апараті і ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,995\%$.

ДР 2. Підготовка повітря для сушіння

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником **ПЗ-8** у найвищій точці (Н~10 м) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часточок

Очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) відбувається на плоских фільтрах грубого очищення **Ф-9**.

ДР 2.3. Нагрівання повітря

Повітря нагрівається у калорифері **КР-10** до температури 60°C . Видалення зайвої вологи здійснюється у ресивері **Р-11**.

ДР 3. Підготовка титрувальних агентів

ДР 3.1. Приготування розчину хлоридної кислоти для титрування середовищ для посівних апаратів

Для приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти необхідно до 195 мл 36%-ї кислоти додати 1,15 л води дистильованої у колбу об'ємом 3 л. Розчин стерилізується разом із розчином солей, до якого додається, у посівному апараті.

ДР 3.2. Приготування розчину хлоридної кислоти для титрування середовища для виробничого культивування

Для приготування 6%-го розчину хлоридної кислоти необхідно до 1,75 л 36%-ї кислоти додати 10,35 л води дистильованої у реактор-змішувач **РЗ-12** об'ємом 15 л. Розчин подається насосом **Н-13** у реактор-змішувач **РЗ-33** та стерилізується разом із розчином солей, до якого додається, в установці безперервної стерилізації **УБС-35**.

ДР 3.3. Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію для титрування середовищ для посівних апаратів

На технічних терезах зважують 173,8 г NaOH. Наважку поміщають в колбу об'ємом 3 л, додають 1,186 л води дистильованої, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 3.4. Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію для титрування середовища для виробничого культивування

На технічних терезах зважують 1,55 кг NaOH. Наважку поміщають в реактор-змішувач **РЗ-14** об'ємом 20 л, додають 10,55 л води дистильованої, вмикають перемішуючий пристрій і стерилізують при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 4. Підготовка розчину мікроелементів

Для ТП 6.4, 6.5, 6.6, 6.7 готується концентрований розчин солей $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, який додається у середовище у кількості 1 мл на 1 л середовища.

ДР 4.1. Приготування та стерилізація розчину мікроелементів для вирощування інокуляту у колбах на качалках та у посівних апаратах

На технічних терезах зважують 10 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та 6 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, доводять до об'єму 1 л водою питною, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 540 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Сахароза	19,5	10,63	А	485
Вода		474,4 мл		
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,05	0,57	Б	30
KH_2PO_4	0,2	0,11		
Вода		29,3 мл		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	0,22	В	25
Цитрат натрію	0,5	0,27		
$CaCl_2$	0,1	0,054		
Вода		24,5 мл		

*Примітка – $FeSO_4 \times 7H_2O$ і $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ додаються у вигляді концентрованого розчину у кількості 1 мл на 1 л середовища (0,54 мл) від ДР 4.1.

ДР 5.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 10,63 г сахарози. Наважку поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають 474,4 мл води дистильованої, перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при $t = 112^\circ C$ (30 хв).

ДР 5.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 0,57 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 0,11 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 29,3 мл води дистильованої, перемішують, закривають ватно-марлевим корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^\circ C$ (40 хв).

ДР 5.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 0,22 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,27 г цитрату натрію, 0,054 г CaCl_2 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 100 мл, додають 24,5 мл води дистильованої, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^\circ\text{C}$ (40 хв).

ДР 5.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування культури у інокуляторі об'ємом 20 л

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 20 л наведений у табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 20 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,3 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	19,5	122,85	А	5,64
Вода		4,97 л		
Конденсат		0,55 л		
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	1,05	6,62	Б	0,37
KH_2PO_4	0,2	1,26		
Вода		0,36		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	2,5	В	0,29
Цитрат натрію	0,5	3,1		
CaCl_2	0,1	0,63		
Вода		0,285 л		

*Примітка – $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ додаються у вигляді концентрованого розчину у кількості 1 мл на 1 л середовища (6,3 мл) від ДР 4.1.

ДР 5.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 122,85 г сахарози. Наважку переносять у реактор-змішувач **РЗ-16** об'ємом 10 л, додають 4,97 л води питної,

(враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), перемішують до повного розчинення компоненту. Стерилізують у ньому при $t = 112^{\circ}\text{C}$ (30 хв).

ДР 5.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 6,62 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ та 1,26 г KH_2PO_4 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають 360 мл води, дистильованої, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 5.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 2,5 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3,1 г цитрату натрію, 0,63 г CaCl_2 . Наважки поміщають у колбу об'ємом 750 мл, додають 285 мл води питної, перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при $t = 131^{\circ}\text{C}$ (40 хв).

ДР 5.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування культури у інокуляторі об'ємом 160 л

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 160 л наведений у *табл. 7.3*.

Таблиця 7.3

Склад композицій для стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 160 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 61,5 л середовища, г (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	19,5	1200	А	56,2
Вода		50 л		
Конденсат		5 л		
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	1,05	65	Б	5,64
KH_2PO_4	0,2	12		
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	25		
Цитрат натрію	0,5	31		
CaCl_2	0,1	6		
Вода		5 л		

Конденсат		0,5 л		
-----------	--	-------	--	--

*Примітка – $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ додаються у вигляді концентрованого розчину у кількості 1 мл на 1 л середовища (61,5 мл) від ДР 4.1.

ДР 5.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 1,2 кг сахарози. Наважку переносять у реактор-змішувач **РЗ-20** об'ємом 100 л, додають 50 л води питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), перемішують до повного розчинення компоненту. Стерилізують у ньому при $t = 112^\circ\text{C}$ (30 хв).

ДР 5.3.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 65 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 12 г KH_2PO_4 , 25 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 31 г цитрату натрію, 6 г CaCl_2 . Наважки переносять у реактор-змішувач **РЗ-22** об'ємом 10 л, додають 5 л води питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації) і 123 мл 6% розчину HCl (від ДР 3.1), перемішують до повного розчинення компонентів. Стерилізують у ньому при $t = 131^\circ\text{C}$ (30 хв).

ДР 5.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування культури у інокуляторі об'ємом 1,25 м³

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 1,25 м³ наведений у табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу у посівному апараті об'ємом 1,25 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 609,1 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	19,5	11,9	А	561,9
Вода		500 л		
Конденсат		50 л		

$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,05	0,64	Б	47,6
KH_2PO_4	0,2	0,122		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	0,244		
Цитрат натрію	0,5	0,305		
$CaCl_2$	0,1	0,061		
Вода		42 л		
Конденсат		4,2 л		

*Примітка – $FeSO_4 \times 7H_2O$ і $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ додаються у вигляді концентрованого розчину у кількості 1 мл на 1 л середовища (609,1 мл) від ДР 4.2.

ДР 5.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 11,9 кг сахарози. Наважку переносять у реактор-змішувач **РЗ-26** об'ємом 1 м³, додають 500 л води питної (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації), перемішують до повного розчинення компоненту. Стерилізують у ньому при $t = 112^\circ C$ (30 хв).

ДР 5.4.2. Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 640 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 122 г KH_2PO_4 , 244 г $MgSO_4 \times 7H_2O$, 305 г цитрату натрію, 61 г $CaCl_2$. Наважки переносять у реактор-змішувач **РЗ-28** об'ємом 100 л, додають 42 л води дистильованої (враховуючи 10% конденсату при подальшій стерилізації) і 1,22 л 6% розчину HCl (від ДР 3.1), перемішують до повного розчинення компонентів. Стерилізують у ньому при $t = 131^\circ C$ (30 хв).

ДР 5.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 12,5 м³ наведений у табл. 7.5.

Композиції стерилізації компонентів для виробничого культивування у ферментері об'ємом 12,5 м³

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6,05 м³ середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Сахароза	19,5	118	А	4640
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O	1,05	6,35		
KH ₂ PO ₄	0,2	1,21		
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,4	2,42		
Цитрат натрію	0,5	3,025		
CaCl ₂	0,1	0,6		
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,01	0,058		
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,006	0,035		
Вода		4708,3		
Конденсат		1210		1210

ДР 5.5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища

На технічних терезах зважують 113,1 кг сахарози, 6,09 кг K₂HPO₄ × 3H₂O, 1,16 г KH₂PO₄, 2,32 кг MgSO₄ × 7H₂O, 58 г FeSO₄ × 7H₂O, 35 г Na₂MoO₄ × 2H₂O, 2,9 кг цитрату натрію, 580 г CaCl₂. Наважки переносять у реактор-змішувач **РЗ-33** об'ємом 8 м³, додають 4708,3 л води питної, насосом **Н-13** подають 12,1 л 6% розчину HCl (від ДР 3.2) і перемішують до повного розчинення компонентів.

Середовище під тиском подається в стерильний реактор УБС (**УБС-35**), звідки надходить на колонку швидкісного нагріву, де відбувається нагрів вихідного нестерильного середовища. Далі середовище проходить через теплообмінник-витримувач. З теплообмінника-витримувача стерильне середовище відходить з температурою 90°C і, після охолодження на теплообміннику, надходить у ферментер.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1. Підготовка робочої культури з колекції

Отриману колекційну культуру *Azotobacter chroococcum* 7В зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі Ешбі. Всі роботи з колекційною культурою проводять в асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованому середовищі

Колекційну культуру методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з агаризованим середовищем Ешбі для одержання ізольованих колоній. Культивують в термостаті 72 години при $t = 30^{\circ}\text{C}$.

ТП 6.3. Вирощування культури на агаризованому середовищі

Отримані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 6.2) пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем Ешбі (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Культивують в термостаті 72 години при $t = 30^{\circ}\text{C}$.

ТП 6.4. Вирощування культури в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 750 мл зливають простерилізовані композиції А, Б, В (від ДР 5.1.1, 5.1.2 і 5.1.3) і вносять 1 мл розчину мікроелементів (від ДР 4.1).

У пробірку з робочою культурою *Azotobacter chroococcum* 7В (від ТП 6.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочну колбу з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (180 об/хв) 48 годин при $t = 30^{\circ}\text{C}$.

ТП 6.5. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 20 л

В боксі в асептичних умовах у спеціальний балон для асептичної передачі зливають розчин сахарози (від ДР 5.2.1), розчини солей (від ДР 5.2.2 і ДР 5.2.3), додають 6,3 мл розчину мікроелементів (від ДР 4.1), перемішують і отриманий розчин асептично через конектор передають у інокулятор **ФР-19**. Через засівну колбу вносять 600 мл посівного матеріалу від ТП 6.4.

Культивують 48 годин при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 180 об/хв і постійною аерацією.

ТП 6.6. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 160 л

В асептичних умовах розчин сахарози (від ДР 5.3.1), розчин солей (від ДР 5.3.2) та додають 61,5 мл розчину мікроелементів (від ДР 4.1), через конектор передають у охолоджений інокулятор **ФР-25**, додають 123 мл 6%-го розчину NaOH (від ДР 3.3) і вмикають перемішуючий пристрій. Через трубу перетискання з інокулятора **ФР-19** перекачують 6,2 л посівного матеріалу (від ТП 6.5). Культивують 48 годин при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 180 об/хв і постійною аерацією.

ТП 6.7. Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 1,25 м³

В асептичних умовах розчин сахарози (від ДР 5.4.1) через конектор передають у охолоджений інокулятор **ФР-31** з розчином солей (від ДР 5.4.2), додають додають 610 мл розчину мікроелементів (від ДР 4.1) та 1,22 л 6% розчин NaOH (від ДР 3.3) для оптимізації рН і вмикають перемішуючий пристрій. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора **ФР-25** 60,9 л інокуляту від ТП 6.6. Культивують 48 годин при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 180 об/хв і постійною аерацією.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 12,5 м³

Простерилізоване в **УБС-35** середовище (від ДР 5.5.1) подається у простерилізований ферментер **ФР-37**, потім до нього насосом **Н-15** перекачують 12,1 л 6% розчину NaOH (від ДР 3.4) для нормалізації рН. Через трубу перетискування перекачують з інокулятора **ФР-31** 670 л інокуляту (від ТП 6.7). Культивують 72 години при $t = 30^{\circ}\text{C}$ з частотою обертів перемішуючого пристрою 180 об/хв і постійною аерацією до концентрації цільового продукту 4,84 г/л.

ТП 8. Зберігання культуральної рідини

ТП 8.1. Зберігання

Після виробничого біосинтезу культуральна рідина насосом **Н-38** від виробничого ферментера подається у збірник **З-39** об'ємом 7 м³.

ТП 9. Відділення біомаси

ТП 9.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина від збірника **З-39** (від *ТП 10.1*) насосом **Н-40** подається до центрифуги **Ц-41**. Кількість обертів – 7750 об/хв. Тривалість роботи центрифуги – 1 год. Вивантаження біомаси з центрифуги здійснюється у пересувну ємність **Є-42**. Фугат подається у збірник для фугату **З-43**.

ТП 10. Сушіння біомаси

ТП 10.1. Сушіння біомаси у сублімаційній сушарці

Біомаса у кількості 329,6 кг (від *ТП 9.1*) з пересувної ємності **Є-42** подається у кювети сублімаційної сушарки **С-44**. Холодоагентом фреоном R404A біомаса заморожується при температурі -40°C. Сушіння відбувається при температурі 20°C, тривалість – 24 год. Висушену біомасу вивантажують у пересувну ємність **Є-45** і передають на наступну технологічну операцію.

ТП 11. Подрібнення біомаси

ТП 11.1. Подрібнення біомаси

Висушена біомаса (від *ТП 10.1*) через пересувну ємність **Є-45** завантажується у приймальний бункер дробарки **ДЩ-46** і подрібнюється до розміру часточок 0,3 мм. Час дробіння – 10 хв. По закінченню процесу порошок надходить на наступну технологічну операцію за допомогою ємності **Є-47**.

ТП 12. Руйнування клітин і розчинення полігідроксибутирату екстракцією

ТП 12.1. Екстракція

Суха біомаса у кількості 35,2 кг від пересувної ємності **Є-47** (від *ТП 11.1*) вивантажується у збірник для екстракції **З-48**, куди потім додають 281,3 л 98% хлороформу з ємності для зберігання **Є-49** (у співвідношенні 1:8 до біомаси) через об'ємно-ваговий дозатор **Д-50**. Температура екстракції 40°C, перемішування при 200 об/хв, час екстракції – 2 год.

ТП 13. Виділення цільового продукту

ТП 13.1. Ультрафільтрація від клітинних залишків

Екстракт у об'ємі 269 л від збірника **З-48** (від *ТП 12.1*) за допомогою насоса **Н-51** перекачують на ультрафільтраційну установку **УФ-52**. Пермеат у кількості 175,7 л з розчиненим цільовим продуктом насосом у складі **УФ-52** перекачують у збірник **З-53**, а осад у кількості 89,7 л, представлений залишками клітин, направляється на знищення відходів. Швидкість подачі – 144 л/хв, час ультрафільтрації – 10 хв, діаметр пор мембрани – 0,02 мкм.

ТП 13.2. Осадження

У збірник **З-53** через об'ємно-ваговий дозатор **Д-55** подають 843,9 л ізопропілового спирту від ємності для зберігання **Є-53**. У збірнику **З-53** вмикають перемішуючий пристрій і насосом у складі **УФ-52** подають пермеат у кількості 175,7 л (від *ТП 13.1*) із швидкістю подачі 1,3 л/год. Кількість обертів при перемішуванні – 200 об/хв. Після закінчення подачі пермеату у збірник суміш при кімнатній температурі залишають на 1 год.

ТП 14. Видалення розчинників

ТП 14.1. Центрифугування суміші

Суміш полігідроксибутирату з розчинниками у кількості 978,8 л від збірника **З-53** (від *ТП 13.2*) насосом **Н-56** подається до центрифуги **Ц-57**. Кількість обертів – 7750 об/хв. Фугат направляється на регенерацію розчинників. Тривалість центрифугування – 1 год.

ТП 15. Сушіння цільового продукту

ТП 15.1. Сушіння у «киплячому шарі»

Отриманий осад у кількості 83,6 кг з центрифуги **Ц-57** (від *ТП 14.1*) через пересувну ємність **Є-58** подається до сушарки з «киплячим шаром» **С-59**, куди вентилятором подається очищене повітря від *ДР 2.3*. Температура при висушуванні – 60°C. Час роботи сушарки – 45 хв. Кінцева вологість продукту – 5%. Після сушіння гранули полігідроксибутирату у кількості 20,7 кг з бункера сушарки вивантажують у пересувну ємність **Є-60** об'ємом 25 л.

ПМВ 16. Пакування, маркування, відвантаження продукту

ПМВ 16.1. Пакування, маркування, відвантаження продукту

Отриманий полігідроксibuтират з ємності **Є-60** завантажується у приймальний ківш фасувальної машини **ФМ-61** та фасується у паперовий мішок у кількості 20,5 кг. Після фасування наноситься маркування і мішки надходять на склад для зберігання.

ЗВ 17. Знешкодження та утилізація відходів

ЗВ 17.1. Знешкодження та утилізація рідких відходів

Суміш хлороформу та ізопропилового спирту від *ТП 14.1* направляються на розділення та регенерацію. Стічні води з усього виробництва направляються в каталітичний мембранний реактор для очищення.

ЗВ 17.2. Знешкодження та утилізація твердих відходів

Тверді відходи з усього виробництва, що представлені пакувальною тарою для сипучих та рідких матеріалів, направляється на станцію вторинної переробки.

ЗВ 17.3. Знешкодження та утилізація газоподібних відходів

Відпрацьоване після культивування та після сушіння повітря направляється на очистку.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Під час промислового виробництва полігидроксibuтирату здійснюють періодичні відбори проб для мікробіологічного контролю поживних середовищ, посівного матеріалу, культуральної рідини під час біосинтезу, а також для контролю біосинтезу: концентрації полігидроксibuтирату та вмісту джерела вуглецю. Визначення вмісту загального азоту у культуральній рідині не є доцільним, оскільки продуцент споживає азот із повітря. Для проведення контролю необхідно забезпечити асептичні умови відбору проб з апаратів для попередження ризиків контамінації культуральної рідини сторонньою мікрофлорою.

8.1. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 8.1.1

Карта постадійного контролю доферментаційних процесів виробництва полігидроксibuтирату

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кт 1.2 <i>Грубе очищення повітря</i>	Повітря на виході з фільтра грубого очищення Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 95%, тиск згідно паспорту
Кт 1.2 <i>Грубе очищення повітря</i>	Повітря на виході з фільтра Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 95%, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 <i>Компресування повітря</i>	Стиснене повітря Температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35 – 0,5 МПа, t = 100 – 2010°C

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ					
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва					
Розроб.		<i>Сарницька А.О.</i>						Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.		<i>Стабніков В.П.</i>							78	107 78
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		<i>Пирог Т.П.</i>								

Кт 1.4 <i>Охолодження повітря</i>	Охоложене повітря Температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25 – 30°C
Кт 1.4 <i>Видалення зайвої вологи</i>	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W = 60%
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 30°C
Кт 1.1.6 <i>Тонке очищення повітря</i>	Очищене повітря Ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	E = 99,995%
Кт 1.1.7 <i>Очищення повітря на індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,995%
Кт 3.2, 3.4 <i>Приготування та стерилізація розчину гідроксиду натрію</i>	Розчин гідроксиду натрію Тиск, температура, час, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131°C, τ = 40 хв, відсутність мікробіот
К 4.1 <i>Приготування та стерилізація розчину мікроелементів</i>	Розчин мікроелементів Тиск, температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,15 МПа, t = 131°C, τ = 40 хв, відсутність мікробіот
Кт, Км 5.1.1, 5.2.1, 5.3.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту</i> Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05 МПа, t = 112°C, τ = 30 хв, відсутність мікробіот
Кт, Км 5.1.2, 5.2.2, 5.3.2	Композиція Б	Манометр, термометр,	Температура визначається	P = 0,15 МПа,

<p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту</i></p> <p>Приготування і стерилізація композиції Б</p>	<p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіот</p>
<p>Кт, Км 5.1.3, 5.2.3</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування інокуляту</i></p> <p>Приготування і стерилізація композиції В</p>	<p>Композиція В Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіот</p>
<p>Кт, Км 5.4.1</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу</i></p> <p>Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,05$ МПа, $t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіот</p>
<p>Кт, Км 5.4.2</p> <p><i>Приготування і стерилізація поживного середовища для вирошування посівного матеріалу</i></p> <p>Приготування і стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність, рН</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль, рН-метр</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$P = 0,15$ МПа, $t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіот и, рН 4,5</p>

<p>Кт, Км 5.5.1 <i>Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого культивування</i></p> <p><i>Приготування і стерилізація композиції А</i></p>	<p>Композиція А Температура, час, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>$t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 60$ хв, відсутність мікробіот и</p>
<p>Кт, Км 6.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Azotobacter chroococcum</i> 7В Морфологічна однорідність, відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 6 год</p>	<p>$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, відсутність сторонньої мікробіот и</p>
<p>Кт, Км 6.3 <i>Вирощування культури на агаризованому середовищі</i></p>	<p>Колекційна культура <i>Azotobacter chroococcum</i> 7В Температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Мікробіологічний контроль проводять кожні 6 год</p>	<p>$t = 30^{\circ}\text{C}$, $\tau = 72$ год, відсутність сторонньої мікробіот и</p>
<p>Кт, Км 6.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалках</i></p>	<p>Посівний матеріал Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Термометр технічний, рН-метр, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 6 годин</p>	<p>$t = 30^{\circ}\text{C}$, рН 7,0, $\tau = 48$ год, $\omega = 180$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіот и</p>
<p>Кт, Км 6.5 <i>Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 20 л</i></p>	<p>Посівний матеріал Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки,</p>	<p>Термометр технічний, датчик рН, годинник, технічний тахометр,</p>	<p>Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично</p>	<p>$t = 30^{\circ}\text{C}$, рН 7,0, $\tau = 48$ год, $\omega = 180$ об/хв, відсутність</p>

	мікробіологічна чистота культури	мікробіологічний контроль	протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 6 годин	ь сторонньо і мікробіоти
Кт, Км 6.6 <i>Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 160 л</i>	Посівний матеріал Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 6 годин	t = 30°C, рН 7,0, τ = 48 год, ω = 180 об/хв, відсутність сторонньо і мікробіоти
Кт, Км 6.7 <i>Вирощування культури у інокуляторі об'ємом 1,25 м³</i>	Посівний матеріал Температура, рН, тривалість вирощування, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання – кожні 6 годин	t = 30°C, рН 7,0, τ = 48 год, ω = 180 об/хв, відсутність сторонньо і мікробіоти
Кт, Км, Кх 7.1 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 12,5 м³</i>	Культуральна рідина Температура, рН, тривалість культивування, частота обертів мішалки, рівень піни, мікробіологічна чистота культури, концентрація полігідроксибутирату	Термометр технічний, датчик рН, годинник, технічний тахометр, датчик рН, датчик піноутворення мікроскоп	Температура, швидкість обертання мішалки, рівень рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично весь час культивування, мікроскопіювання – кожні 6 годин	t = 30°C, рН 7,0, τ = 72 год, ω = 180 об/хв, відсутність сторонньо і мікробіоти, С = 4,84 г/л

8.2. Мікробіологічний контроль

8.2.1. Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ

Мікробіологічний контроль стерильності поживних середовищ здійснюють шляхом розсівання проби простерилізованого поживного

середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій.

Посіви здійснюють шляхом відбору стерильною піпеткою 0,1 мл з об'єму проби простерилізованого поживного середовища і нанесення її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами завертають у папір і поміщають у термостат для інкубації при температурі 32 – 34°C протягом 1 – 2 діб для МПА та при температурі 24 – 26°C протягом 3 – 5 діб для СА.

На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів.

8.2.2. Мікробіологічний контроль чистоти культури

Здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Прямий висів здійснюється посівом готового посівного матеріалу і культуральної рідини до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо-картопляним агаром (ГКА) або сусло-агаром (СА) – грибів та дріжджів.

Контроль здійснюють шляхом розсівання проби готового посівного матеріалу на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем до ізольованих колоній (метод виснажувального штриха) і подальшим мікроскопіюванням мікроорганізмів з окремих колоній, які вирости на середовищі після інкубування.

На чашках з посівами інокуляту і культуральної рідини повинні бути виявлені лише колонії виробничого штаму *A. chroococcum* 7В і повна відсутність сторонньої мікробіоти. Характер колоній *Azotobacter chroococcum* округлий, випуклий, блискучий, непрозорий, слизистої консистенції [16].

Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в

асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1 – 2 краплини імерсійного масла.

За відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Azotobacter chroococcum* 7В. Клітини великі, овальної форми діаметром 1,5 – 2,0 мкм, плеоморфні, паличкоподібні або кокоподібні. Розміщуються поодинокі, парами або групами неправильної форми, іноді у вигляді ланцюжків різної довжини. Ендоспор і капсул не утворюють, але утворюють цисти [15].

8.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

Важливою умовою проведення контролю синтезу цільового продукту є забезпечення правильного відбору проб. Для цього у стерильні пробірки для центрифугування відбирають по 5 мл культуральної рідини кожні 4 години для визначення концентрації джерела вуглецю і кожні 8 годин починаючи з 40 години культивування для визначення концентрації цільового продукту. Проби рідини центрифугують при 8000 обертах/хв протягом 20 хв. Надосадову рідину використовують для визначення вмісту джерела вуглецю.

8.3.2. Концентрація цільового продукту

Полігідроксibuтират – біополімер із класу полігідроксиалканоатів, який накопичується у клітинах у виді гранул. Зазвичай наявність полімеру у клітинах перевіряють мікроскопіюванням [5].

Одним із способів визначення концентрації полігідроксibuтирату у біомасі є метод газової хроматографії [35], суть якої полягає у різній спорідненості речовин до рідини у колонці, рухомою фазою слугує газ, а нерухомою – рідка фаза [36].

Висушену до постійної маси біомасу (105°C) піддають клітинному лізису, гідролізу полімеру та метанолізу в 1 мл хлороформу, 0,85 мл метанолу

та 0,15 мл сірчаної кислоти при 100°C протягом 1 год. Сформовані групи метилових ефірів були проаналізовані на газовому хроматографі Shimadzu GC-2014, оснащеному капілярною силікатною колоною Restek Rtx-5 (30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм) та полум'яно-іонізаційним детектором (FID). Умови експлуатації для інжектора та детектора склали 250°C. Калібрувальна крива була побудована з використанням полі-3-гідроксибутират-ко-3-гідроксивалеріанової кислоти як стандарту.

8.3.3. Концентрація джерела вуглецю

Для промислового культивування штаму *Azotobacter chroococcum* 7В використовують середовище Бурка, у якому джерелом вуглецю є сахароза. Джерела азоту у середовищі немає, оскільки мікроорганізм є азотфіксатором і отримує азот із повітря [5].

Авторами патенту [37] для визначення сахарози запропоновано використовувати метод Бертрана, принцип якого заснований на здатності окису міді в лужному середовищі окиснювати альдегідні сполуки з утворенням червоного осаду закису міді. При перерахунку міді на цукор користуються емпіричними таблицями, які складені при строго певних умовах протікання реакції [38].

Для визначення сахарози досліджувані водні розчини попередньо обробляють соляною кислотою – проводять інверсію, в результаті чого утворюються рівні кількості глюкози і фруктози, що відновлюють лужні розчини міді.

8.4. Показники якості готового продукту

На виробництві контролюється чистота отриманого продукту методом ІЧ-Фур'є-спектроскопії та кінцева вологість висушеного полігідроксибутирату, яка має становити 5%.

Мікробіологічний контроль продукції робити не доречно, оскільки субстанція полігідроксибутирату при формуванні в упаковки буде піддаватися тепловій обробці при високих температурах.

У якості проб для контролю чистоти продукту готують плівки з полігидроксибутирату, а визначення вологості проводять при відборі 20 г сухого продукту. Плівки можна виготовити розчинивши наважку полігидроксибутирату хімічно чистим хлороформом при $t = 60^{\circ}\text{C}$ і постійному перемішуванні. Отриману суміш необхідно вилити у чашку Петрі, накривши кришкою, і дочекатися повного випарювання розчинника при кімнатній температурі протягом 48 год. Утворені плівки дістають з чашок та аналізують [39].

8.4.1. Контроль чистоти продукту

Одним з найпоширеніших методів контролю чистоти полігидроксибутирату є ІЧ-Фур'є-спектроскопія, де основним елементом інфрачервоного спектрометра з перетворенням Фур'є є інтерферометр Майкельсона. Автори статті [40] у своїх дослідженнях виготовляли з полігидроксибутирату плівки і реєстрували на ІЧ-спектрометрі з Фур'є-перетворювачем Bruker IFS-48 при розширенні 2 см^{-1} і числі сканувань 15.

Вміст полігидроксибутирату має становити 90 – 99%.

8.4.2. Контроль вологості продукту

Дві наважки порошку масою 3 г поміщають у заздалегідь висушені і зважені разом бюкси з кришками. Кожну наважку порошку сушать в сушильній шафі при температурі 105°C до постійної маси.

Якщо різниця між двома подальшими зважуваннями після 30 хв висушування і 30 хв охолодження в ексікаторі не перевищує 0,01 г, вважається, що наважки досягли постійної маси.

Вологість сировини X обчислюють за формулою:

$$X = ((m - m_1) \times 100) / m, \%$$

де m – маса порошку до висушування, г; m_1 – маса порошку після висушування, г.

За остаточний результат визначення беруть середнє арифметичне двох паралельних визначень. Допустима розбіжність між результатами двох паралельних визначень не повинна перевищувати 0,5 % [41].

Вологість полігидроксибутирату повинна становити 5%.

8.4.3. Ідентифікація полігидроксибутирату

Згідно статті [28] аналіз хімічної структури полігидроксибутирату виконують на хромато-мас-спектрометрі. Ідентифікацію мономерів полімеру проводять по часу витримки та їх мас-спектрам.

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Аналіз технологічного процесу виробничої ділянки

Технологічний процес представляє собою екстракцію клітин продуцента полігідроксibuтирату *Azotobacter chroococcum* 7В у хлороформі.

У збірнику для екстракції має контролюватись та піддаватися управлінню температура рідини (40°C) в апараті подачею пари у сорочку збірника. Датчик температури повинен бути встановлений на сорочці апарату.

Також необхідно контролювати, управляти і регулювати рівень рідини в апараті (269 л) та інтенсивність перемішування суміші (200 об/хв). Для визначення цих параметрів необхідно встановити відповідні датчики в середині апарату.

Насосом рідина з апарату подається на наступну технологічну операцію. Управління насосом має здійснюватися за допомогою двох функцій – ввімкнення та вимкнення.

У відповідності з отриманим завданням у роботі пропонується розробити систему автоматизації для технологічної ділянки, зображеної на *рис.1*.

В результаті аналізу технологічного процесу зроблені висновки, що автоматизація цього технологічного процесу повинна забезпечувати:

1. Контроль і регулювання температури у збірнику шляхом зміни подачі пари від ТЕЦ.
2. Контроль та управління рівня рідини в збірнику шляхом зміни витрати хлороформу від станції підготовки.
3. Контроль та регулювання швидкості обертів перемішуючого пристрою встановленням мотору у верхній частині апарату.
4. Управління насосом перекачки рідини (ввімкнення, вимкнення) із

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ					
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Автоматизація ділянки виробництва					
Розроб.		Сарницька А.О.						Літера	Аркуш	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.							88	107
Реценз.								88		
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.		Пирог Т.П.								

збірника на наступну технологічну операцію.

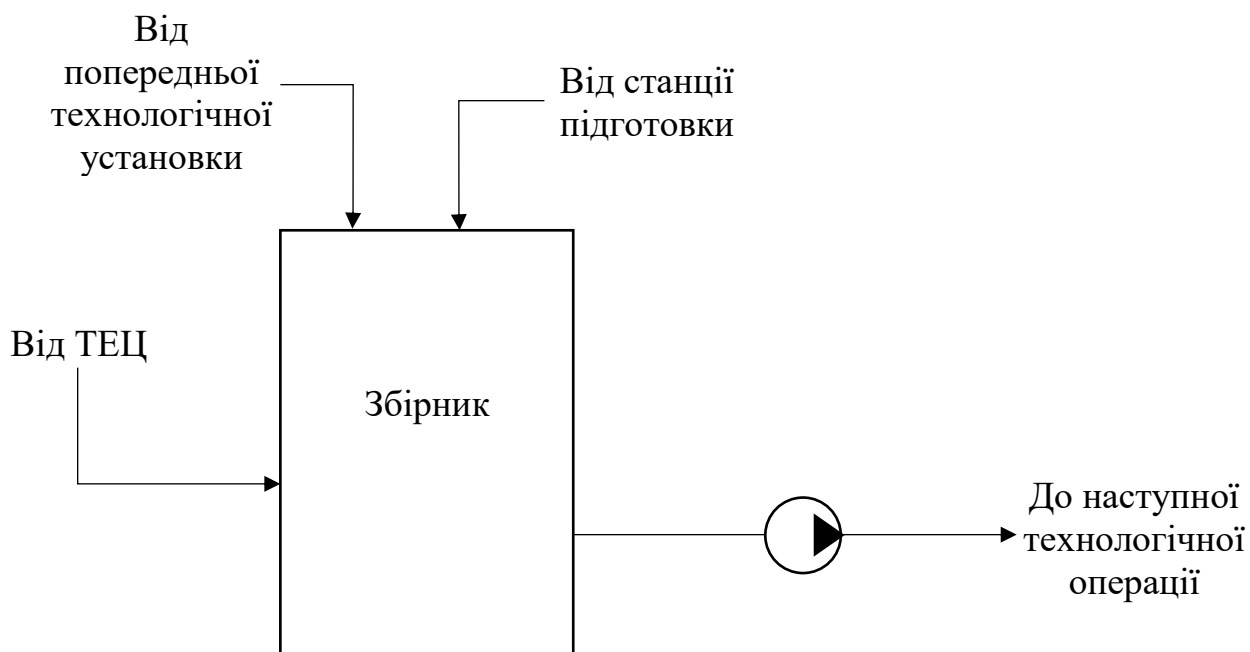


Рис. 9.1.1. Машинно-апаратна схема технологічного процесу

Відповідно до переліку розглянутих задач системи керування заповнена *таблиця 9.1.1*. При цьому будемо притримуватись рішення, що у роботі буде розглянута система автоматизація у якій центральним управляючим пристроєм є мікропроцесорний контролер, а спостереження за ходом виконання технологічним процесом і у разі необхідності втручання в управління ним буде відбуватись за допомогою автоматизованого робочого місця (АРМ) оператора технолога з використанням спеціально розробленого людино-машинного інтерфейсу.

Таблиця 9.1.1

Завдання на розробку системи автоматизації процесу екстракції

№ з/п	Машина, агрегат, установка	Параметр, місце відбору сигналу	Припустиме значення параметра	Вид автоматизації	Характер контролю чи управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Збірник		40±2°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора

		Температура рідини в апараті		Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату пари
		Рівень рідини в апараті	269 л	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Управління	Захист від переповнення апарата	Вплив на подачу рідини
		Інтенсивність перемішування	200 об/хв	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на кількість обертів
2	Насос	Стан насосу відкачки рідини з екстрактора	Ввімкнено/ вимкнено	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю

9.2. Опис схеми автоматизації зі специфікацією засобів автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю та управління в таблиці записано, що в збірнику необхідно контролювати і регулювати температуру, яка має регламентоване значення 40°C і має припустимі межі $\pm 2^\circ\text{C}$. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора-технолога зі збереженням (реєстрацією) цих змін в його архіві. Для управління температурою передбачається стабілізація температури на заданому значенні за рахунок зміни витрати пари.

Заповнення таблиці для третього контуру виконується за аналогічних міркувань.

У другому контурі передбачено сигналізацію про аварійне підвищення рівня у збірнику і захист від його переповнення. Тому у таблиці для цього параметра показані дві функції: «контролю» у вигляді сигналізації оператору на АРМі оператора-технолога виникнення аварійної ситуації і управління її ліквідацією шляхом припинення подачі рідини у збірник у разі перевищення рівня рідини.

У четвертому контурі передбачено завдання для управління насосом. Для нього у таблиці передбачена функція управління, яка забезпечує «Включення» і «Зупинку» насосу з АРМа оператора-технолога. Крім того для захисту персоналу і самого обладнання повинно бути передбачене аварійне відключення насосу з кнопкою «Стоп», яка повинна бути розташована безпосередньо біля насосів по місцю.

У таблиці 9.2.1 наведено специфікацію засобів автоматизації.

Таблиця 9.2.1

Специфікація засобів автоматизації

№ приладу	№ позиції за схемою	Найменування і технічна характеристика виробу	Тип, модель	Виробник
1	1a	Біметалевий термометр, діапазон вимірювань: 0...+250°C, максимальний допустимий тиск 25 бар, під'єднання G1/2, довжина штуцера 100 мм, клас точності 1,0	ТБ	ПАО «Склоприбор», Україна
2	2a	Ємнісний датчик рівня, матеріал: нержавіюча сталь; діапазон вимірювань 265-4000 мм, максимальна допустима температура +125°C, максимальний допустимий тиск 10 бар, під'єднання G5/4, аналоговий вихід, точність 2 мм	NMC	Kobold
3	3a	Механізм електричний однообертовий, 1600 Нм, потужність 490 Вт, напруга живлення 220 В, управління імпульсне	МЭО 1600/25-0,25-92К	Промприлад
4	4a	Поверхневий відцентровий насос з максимальною продуктивністю до 2,1 м ³ /год (35 л/хв), напір – до 85 м, споживана потужність – 1,65 кВт. Температура рідини – до +40°C Максимальна температура навколишнього середовища: до + 40 °С. Максимальний робочий тиск – 1 мПа.	DDPm 505A	«Насосы +»

		Напруга і частота мережі 220 В/50 Гц. Корпус насосної камери з чавуну, колесо робоче – відцентрове, закритого типу, виконано з латуні, вал з нержавіючої сталі AISI 304 ущільнення торцеве – графіт/кераміка/NBR/AISI 304		
--	--	---	--	--

РОЗДІЛ 10. ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1. Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія одержання полігидроксibuтирату включає доферментаційні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, приготування і стерилізація розчинів для титрування, приготування і стерилізація розчину мікроелементів, приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу полігидроксibuтирату), ферментаційні технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, біосинтез полігидроксibuтирату) та післяферментаційні технологічні процеси (виділення біомаси, сушіння біомаси, екстракція, фільтрування, осадження, центрифугування, сушіння).

1. Санітарна підготовка виробництва. Даний етап включає щоденне і генеральне прибирання приміщення із застосуванням миючих засобів «Хлормісепт Люкс» та «Фамідез Екстра». Після обробки відпрацьований мийний розчин надходить до каналізації. Миття резервуарів обладнання здійснюють за допомогою СІР-мийки із застосуванням засобу «Сурфаніос Преміум НПК UA». Після обробки промивна вода надходить до каналізації, а відпрацьований розчин «Сурфаніос Преміум НПК UA» повторно використовується для обробки у СІР-мийці. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії невеликих об'ємів рідких відходів.*

2. Приготування і стерилізація розчинів для титрування. Етап передбачає підготовку 6% розчину гідроксиду натрію і 6% розчину хлоридної кислоти. Розчин хлоридної кислоти подається для приготування середовища, до складу якого входять фосфорні солі, що можуть утворювати нерозчинні осади. Натрій гідроксид додається для оптимізації рівня рН до 7,0 під час

					НУХТ БТЕК 04.01.15 КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. Охорона довкілля	Літера	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Сарницька А.О.					93	107
Перевір.		Стабніков В.П.						93
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

отримання посівного матеріалу у інокуляторах і виробничого біосинтезу в ферментері. Рідкі відходи на даному етапі виробництва можуть утворюватися лише у випадку невідповідності титрувальних розчинів нормативним показникам і рівню асептики. *Відходи титрувальних агентів не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.*

3. Приготування і стерилізація розчину мікроелементів. Етап передбачає приготування і стерилізацію концентрованого розчину солей мікроелементів, який потім додається в поживні середовища для одержання інокуляту. Тверді відходи даного етапу представлено пакувальними матеріалами від сировини для приготування розчину. *Відходи розчину мікроелементів не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів і передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

4. Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу. На даному етапі існує можливість виявлення невідповідності сировини заявленим нормам із наступним її відбракуванням. Тверді відходи даного етапу представлено пакувальними матеріалами від сировини для приготування поживного середовища. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих відходів.*

5. Підготовка посівного матеріалу. Етап передбачає отримання і масштабування посівного матеріалу в інокуляторах. Зважаючи на те, посівний матеріал використовується для засіву ферментера і, як наслідок, виробничого біосинтезу, відходи від посівного матеріалу не враховуємо у загальному об'ємі рідких відходів.

Продуцент *Azotobacter chroococcum* 7В є аеробом, тому під час культивування необхідно забезпечити достатній рівень аерації поживного середовища. У процесі культивування виникає великий об'єм відпрацьованого повітря. Оскільки продуцент належить до групи азотфіксуючих бактерій, відпрацьоване повітря на виході з інокулятора буде містити великі кількості аміаку у якості побічного продукту метаболізму. Спори продуцент не утворює. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

6. Виробничий біосинтез. Даний етап передбачає отримання культуральної рідини з накопиченням біомаси бактерій *Azotobacter chroococcum* 7В. Оскільки культуральна рідина далі надходить до збірника для виділення цільового продукту, рідкі відходи на даному етапі не враховуємо. Відпрацьоване повітря на виході з виробничого ферментера містить аміак. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

7. Відділення біомаси. Даний етап передбачає центрифугування культуральної рідини для виділення біомаси продуцента. Відходом даного процесу є надосадова рідина. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів рідких відходів.*

8. Сушіння біомаси. На цьому етапі пропонується сушити біомасу бактерій *Azotobacter chroococcum* 7В у сублімаційній сушарці, принцип роботи і особливості конструкції якої налічують у собі наявність конденсатора, який конденсує вологу, що вийшла з біомаси. Тому *даний етап є місцем емісії великих об'ємів рідких відходів.*

9. Екстракція. На даному етапі висушена біомаса продуцента оброблюється хлороформом. Процес відбуватиметься при нагріванні, а оскільки хлороформ є небезпечною легкою речовиною, передбачається, що *даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоповітряних відходів.*

10. Ультрафільтрація. Даний етап передбачає ультрафільтрування екстракту з попереднього етапу від клітинних залишків, отже, *даний етап є місцем емісії великих об'ємів твердих відходів.*

11. Осадження. Розчинений полігідроксибутират осаджують ізопропанолом. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів рідких відходів.*

12. Сушіння полігідроксибутирату. Даний етап передбачає виділення залишкової вологи із полігідроксибутирату шляхом його сушіння у сушарці з «киплячим шаром». Процес супроводжується виділенням газу-носія – відпрацьованого повітря, який містить аерозоль механічних часток від сухого полігідроксибутирату. *Даний етап є місцем емісії великих об'ємів газоподібних відходів.*

10.2. Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Коротка характеристика рідких відходів виробництва полігідроксибутирату наведена у таблиці 10.2.1.

Таблиця 10.2.1.

Характеристика рідких відходів у виробництві полігідроксибутирату

Назва складової рідких відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
0,1% розчин «Хлормісепт Люкс»	натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти, ПАР, спеціальні компоненти	24,075	III, IV
4% розчин «Фамідез Екстра»	гліоксаль, бензалконію хлорид, ізотридеканолетоксилат, 1,2,3-бензотриазол, барвник, вода	24,075	III, IV
0,5% розчин «Сурфаніос Преміум НПК UA»	N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3-діамін, дидецилдиметиламонію хлорид, детергенти, хелатний агент, регулятор рН, функціональні домішки, вода	2,315	III, IV
Культуральна рідина без біомаси	сахароза, гідроортофосфат калію трьохводний, дигідроортофосфат калію, сульфат магнію семиводний, сульфат заліза семиводний, молібдат натрію двухводний, цитрат натрію, кальцію хлорид	5713	IV
Хлороформ	хлороформ	281,3	II
Ізопропанол	ізопропанол	843,9	III
Конденсована вода	вода	293,34	IV
	Усього:	7182	

Одним з методів зменшення об'ємів рідких відходів є повторне використання миючого розчину за допомогою СІР-мийки, яка здійснює миття

обладнання. Мийний розчин повторно використовується після фільтрування, що дозволяє зменшити викиди помірно- і малонебезпечних речовин у каналізацію.

Найдешевшим та найефективнішим способом зменшення відходів таких речовин як хлороформ та ізопропанол є їх регенерація з метою повторного використання. Для цього відпрацьовані розчини очищають дистиляцією всередині бака-випарювача з нержавіючої сталі. В результаті такого процесу пари розчинника проходячи через охолоджуючий елемент конденсуються у вигляді чистої рідини і стікають в накопичувальний резервуар. Розчинник, отриманий таким чином не втрачає своїх фізичних властивостей, що дозволяє використовувати його повторно в технологічному процесі [42].

Оскільки після етапу виділення рідкі відходи містять у собі суміш розчинників, перед очисткою необхідно їх розділити.

Авторами патенту [43] для розділення багатокомпонентних сумішей розчинників або інших речовин пропонується використовувати установку, схему якої наведено на *рисунку 10.2.1*.

Для здійснення заявленого способу запропоновано пристрій для фракціонування багатокомпонентних сумішей, що містить ємність (1) з пристосуванням для підтримки в ній постійного рівня розчину і забезпечує безперервну подачу розчину в колону для фракціонування (2 – 6). Остання складається з ряду секцій, розташованих в формі "гармошки", число яких дорівнює або кількості виділяються із суміші компонентів, або груп компонентів. Усередині кожної секції в її нижній частині розташовані теплоелектронагрівачі (ТЕНи), які підігрівають розчин секції до температури кипіння певного компонента суміші з підвищенням температури нагріву кожної наступної секції в напрямку зверху вниз. Кожна секція, яка містить теплоізоляційний шар, являє собою порожню трубу, заповнену скляними кульками, розташованими навколо ТЕНів, поверхня яких хімічно модифікована алкіл(арил)силанами або силанами, що містять комплекси, в результаті чого відбувається хроматографія суміші з одночасним

випаровуванням компонентів в безперервному режимі. Пароподібні продукти рухаються вгору за рахунок кута нахилу по верхньому, вільному від скляних кульок об'єму, виводяться через верхній отвір колони і конденсуються в холодильнику. Розчин стікає вниз в обсязі, заповненому скляними кульками за рахунок цього ж кута нахилу, і виводиться з колони через нижній отвір. В результаті в колоні здійснюють протитечія газоподібних і рідких продуктів без їх перемішування.

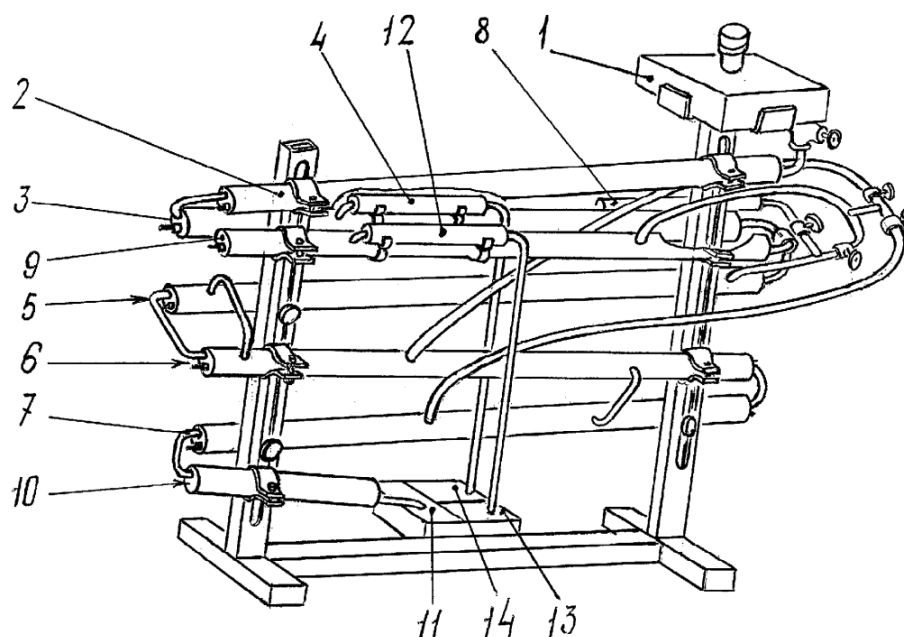


Рис. 10.2.1. Схема установки [43]

Рідкі відходи у виробництві полігидроксибутирату, головним чином, складаються зі стічних вод з миючими засобами, відпрацьованою культуральною рідиною, з якої попередньо вилучають біомасу, і конденсованою водою з сублимаційної сушки. Оскільки миючі засоби, що використовуються, мають у своєму складі складні і досить токсичні речовини, для очистки буде доцільно використовувати мембранну фільтрацію, застосування якої дозволяє підвищити якість скиданих вод, знизити кількісно скидання забруднюючих речовин у водойми і мінімізувати забір природних вод за рахунок можливості повторного використання очищених стічних вод в замкнутих системах водопостачання.

З екологічної точки зору в останні роки все більше виправданим і перспективним стає використання гібридних методів очищення з використанням каталітичного окислення і мембранної сепарації в апаратах нового покоління, тому що вони сприяють утворенню простих і менш токсичних сполук.

Каталітичний мембранний реактор виключає послідовність двох стадій – конверсії в реакторі, а потім розділення на мембрані, так як ці стадії в ньому протікають одночасно. У мембранному окислювальному каталізі мембрани виступають як носії каталізаторів окиснення. Мембрани дозволяють сконцентрувати забруднювачі води, а каталізатори прискорити їх окислення або відновлення, що дозволяє значно зменшити забруднення мембран і, тим самим, збільшити час фільтроцикла [44].

Принцип роботи таких фільтрів заснований на очищенні води шляхом пропускання її через мембрану. Вода під тиском потрапляє на мембрану, забруднення залишаються зі зворотного боку і не проходять далі.

Узагальнений процес утилізації рідких відходів наведено у *рисунку 10.2.2.*

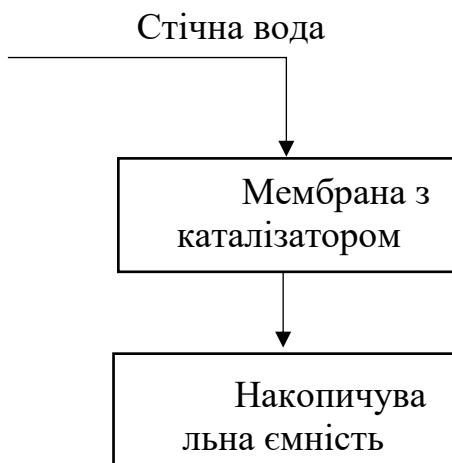


Рис. 10.2.2. Схема утилізації рідких відходів

Очищається вода, потрапляючи в торцеву частину, де проходить уздовж мембрани. З одного кінця трубка запаяна, а з іншого розташована кришка. Це забезпечує утворення сильного напору, що допомагає воді пройти через мембрану. Осередки мембрани затримують всі частинки, які більші за отвори.

Складні токсичні молекули під дією каталізу на мембрані окиснюються або відновлюються, перетворюючись на менш токсичні сполуки. Після цього завислі частинки вимиваються потоком води. Потім очищена вода виводиться назовні і переміщається в накопичувальну ємність [44, 45].

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи, головним чином, утворюються на етапах санітарної підготовки виробництва, підготовки поживних середовищ та при виділенні продукту. В основному вони представлені пакувальною тарою для мийних засобів, компонентів поживного середовища та відділеною біомасою продуцента.

Матеріалом для пакувальної тари рідин є поліетилен високої щільності. Деякі з сухих компонентів поступають в упаковках з поліпропілену, а деякі – з щільного поліетилену. Усі ці види пакувальних матеріалів піддаються вторинній переробці.

Продуцент *Azotobacter chroococcum* 7B належить до класу безпеки BSL-1, тобто він не є потенційним збудником захворювань людини або тварини, тому відходи від його культивування не потребують деконтамінації.

Точнішу характеристику твердих відходів виробництва полігідроксibuтирату наведено у таблиці 10.2.2.

Таблиця 10.2.2.

Характеристика твердих відходів у виробництві полігідроксibuтирату

Назва складової твердих відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, кг	Клас небезпеки
Пластикова тара для мийних засобів та піногасника	HDPE-2 – поліетилен високої щільності	1	IV
Упаковка для компонентів поживного середовища	HDPE – поліетилен високої щільності, PP – поліпропілен	0,15	IV
Залишки біомаси	Біомаса продуцента <i>A. chroococcum</i> 7B	4	IV BSL-1
	Усього:	5,15	

Аналізуючи *таблицю 10.2.2.*, можна сказати, що тверді відходи, що утворюються на етапах санітарної підготовки і підготовки поживних середовищ, характеризуються невеликими кількостями та здатністю матеріалів, з яких вони зроблені, до переробки. Доцільніше утилізацію цих відходів буде проводити у пунктах прийому вторинної сировини із подальшою переробкою.

Тверді відходи після культивування продуценту також складають невеликі обсяги і мають четвертий клас безпеки. Відпрацьовану біомасу можна використовувати як добавку до добрив для рослин.

10.2.3. Система знешкодження газоподібних викидів

Газоподібні відходи утворюються на етапі отримання посівного матеріалу, виробничого біосинтезу і сушіння полігідроксибутирату. Відходи складаються з відпрацьованого повітря, де наявний аміак у вигляді газу.

Аміак має клас небезпеки IV. Характеристику газоподібних відходів виробництва полігідроксибутирату наведено у *таблиці 10.2.3.*

Таблиця 10.2.3.

Характеристика газоподібних відходів у виробництві полігідроксибутирату

Назва складової газоподібних відходів	Речовини, які входять до складу відходів	Приблизний об'єм відходів на 1 цикл виробництва, л	Клас небезпеки
Відпрацьоване повітря після ферментації	Аміак	30240	IV
Відпрацьоване повітря після сушіння	Повітря	489,6	IV
	Усього:	30729,6	

Відпрацьоване повітря після етапів вирощування посівного матеріалу та виробничого біосинтезу, яке містить аміак, можна додатково очищати та використовувати для виробництва азотних добрив для рослин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Коваль Л. М., Церклевич В. С., Антошкова Н. А. Тренди фастфуду у першій чверті ХХІ ст.: споживацькі запити “міленіалів” та їстівний посуд. Підприємництво і торгівля, 2019. 25: 45 – 53. doi: <https://doi.org/10.36477/2522-1256-2019-25-06>
2. Николаева Д. А. Биосинтез поли-3-гидроксибутирата разной молекулярной массы культурой *Azotobacter chroococcum* и его биodeградация. Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва, 2004. 28 с.
3. Салата А. М., Салата О. С., Федун Н. О., Васильченко О. А. Перспективи використання мікробних біополімерів полігидроксибутирату та полілактату. *Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. 2011, 1/9(49): 13 – 15.
4. Киселева О. П. Почвенные и водные бактерии деструкторы полигидроксиалканоатов. Бакал. раб. Красноярск, 2013.
5. Bonartsev A. P., Bonartseva G. A., Myshkina V. L., Voinova V. V., Mahina T. K., Zharkova I. I. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by strain *Azotobacter chroococcum* 7B. *ACTA NATURAE*. 2016, 8(3): 77 – 87.
6. Bhagowati P., Pradhan S., Dash H. R., Das S. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015, с. 1 – 10. doi:10.1080/09168451.2015.1034651.
7. Севастьянов Д. В., Сутубалов И. В., Дасковский М. И., Шеин Е. А. Полимерные биокompозиты на основе биоразлагаемых связующих, армированных натуральными волокнами (обзор). *Авиационные материалы и технологии*. 2017, 4(49): 42 – 50. doi: 10.18577/2071-9140-2017-0-4-42-50.
8. Бычук М. А. Получение и свойства полимерных пленок на основе поли-3-гидроксибутирата и поли-ε-капролактона. Дис. на соиск. уч. ст. канд. техн. наук. Москва, 2016. 169 с.

9. BIOPOL – BIODEGRADABLE PLASTIC [Электронный ресурс]
Режим доступа: <http://www.technologystudent.com/prddes1/biopola.html>
10. Шишацкая Е., Беляев Б., Васильев А., Миронов П., Волгова Т. Структура и физико-химические свойства гибридного композита полигидроксibuтират/гидроксиапатит. *Перспективные материалы*. 2005, 1:47 – 51.
11. Глазачева Е., Воронова А., Успенская М.В. Изучение физикохимических свойств полимерных пленок на основе смеси хитозана и полигидроксibuтирата. *Advances in Science and Technology. Сборник статей XV международной научно-практической конференции, «Научно издательский центр «Актуальность.РФ»*. 2018, 66 – 68.
12. Wang B., Sharma-Shivappa R. R., Olson J. W., Khan S. A. Upstream process optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using twostage batch and fed-batch fermentation strategies. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012. doi:10.1007/s00449-012-0749-6.
13. Sivakumar K., Shree C. G., Palani P. Polyhydroxybutyrate by *Streptomyces* sp.: Production and Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.028.
14. Minimal Broth Davis w/o Dextrose. HiMedia Laboratories – Technical Data [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://himedialabs.com/TD/M390.pdf>
15. Хоулт Дж., Криг Н. Определитель бактерий Берджи. Том 1. 1997, с. 79.
16. Урюмцева Т. И., Кабдрасилова А. М. Разработка рецептуры питательной среды для культивирования бактерий *Azotobacter*. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2019, 3 (173): 61 – 65.
17. BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://bacdive.dsmz.de/>

18. Про відходи у «МакДоналдз» [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://sostav.ua/publication/makdonaldz-v-ukra-n-zapuska-pro-kt-sortuvannya-j-pereroblennya-v-dkhod-v-z-zal-v-86441.html>
19. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.genome.jp/kegg/>
20. Наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502 «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» [Електронний ресурс] Режим доступу: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907__487517
21. Методичні вказівки щодо застосування засобу «СУРФАНІОС ПРЕМІУМ НПК UA» з метою дезінфекції [Електронний ресурс] Режим доступу: https://dezplus.com.ua/files/45/137/MU_Surfanios_premium_NPK_UA.pdf
22. Инструкция по применению дезинфицирующего средства с моющим эффектом «Хлормисепт люкс» (ООО «Полисепт», Россия) [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://dezshare.ru/documents/789/hlormisept-luks-instr-28-12-2012-pdf>
23. Методичні вказівки щодо застосування засобу "Фамідез" з метою дезінфекції [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://desomark.com.ua/doc/2014%20MI%20Famides.pdf>
24. Инструкция по применению дезинфицирующего средства «Микробак форте» производства фирмы «Боде Хеми ГмбХ и Ко.», Германия [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://dezshare.ru/documents/645/microbak-forte-instr-26-07-07-2007-pdf>
25. Пат. RU 2333962С2. Способ выделения полигидроксибутирата из сухой биомассы микроорганизма / Прудскова Т.Н., Кирилович В.И., Заковряшина Н.А., Ермилина Н.И., Андреева Т.И., Бонарцева Г.А. – Оpubл. 20.09.2008.

26. Демиденко А.В., Виноградский О.Н., Киселев Е.Г. Влияние режима высушивания бактериальной биомассы на полноту экстракции и физико-химические свойства продукта (полимера). *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2016, 2(): 180 – 189.
27. Киселев Е.Г., Шишацкий О.Н., Сински Э.Дж. Техно-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2012, 3(5): 300 – 310.
28. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Кожевников И.В. Штайнбюхель А. Биосинтез многокомпонентных полигидроксиалканоатов бактериями *Wautersia eutropha*. *Микробиология*. 2007, 76(6): 797 – 804.
29. Киселев Е.Г., Демиденко А.В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2014, 2(7): 148 – 160.
30. Ультрафильтрация – руководство по эксплуатации [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.kaufmanntec.ru/images/ultraf.pdf>
31. Sathiyarayanan G., Seghal Kiran G., Selvin J., Saibaba G. Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 60: 253–261.
32. Упаковка з поліетилену [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://granula.at.ua/publ/1-1-0-17>
33. Мешки бумажные многослойные [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://papirstok.com/>
34. “Dushka-UA” - виробництво металовиробів: реактори [Электронный ресурс] Режим доступа: https://www.dushka-ua.com/reactor/?url=https://www.dushka-ua.com/reactor/&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=11153354131&utm_content=466490347631&utm_term=%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%20%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B

[8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9&gclid=CjwKCAiA2O39BRBjEiwApB2IkvjzDFS_gQ95kFCUCAIVbVEAKJ57qtFvNIEjH2ztsyuRnlDhN7P3hoCp6AQA_vD_BwE](https://doi.org/10.1007/s12010-017-2687-x)

35. Klasener da Silva C., Costa J. A. V., Greque de Morais M. Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Spirulina* sp. LEB 18 Using Biopolymer Extraction Waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018. doi:10.1007/s12010-017-2687-x [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-017-2687-x>

36. Кучеренко М. Є., Бабенюк Ю. Д., Войціцький В. М. Сучасні методи біохімічних досліджень: Учбовий посібник. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с.

37. Пат. RU2528872C2. Способ культивирования хлебопекарных дрожжей / Чечина О. Н., Мартынов К. А., Сокол О. В., Зимичев А. В. – Оpubл. 20.09.2014 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://edrid.ru/rid/216.012.f63f.html>

38. Харитонов В. Е. Разработка методики определения сахаров при микробиологическом способе получения молочной кислоты: выпуск. квалиф. раб. бакал. – Томск, 2016 г.

39. Ольхов А.А., Маркин В.С., Косенко Р.Ю., Гольдштрах М.А., Иорданский А.Л. Влияние способа формования пленок на взаимодействие в смесях полигидроксibuтират–полиуретан. *Журнал прикладной химии.* 2015, 88(2): 307 – 312.

40. Ольхов А.А., Маркин В.С., Косенко Р.Ю., Гольдштрах М.А., Иорданский А.Л. Метод контроля состава тонких пленок на основе смеси полигидроксibuтирата и полиамида. *Заводская лаборатория. Диагностика материалов.* 2016, 6(82): 33 – 37.

41. Марчевський В. М., Гробовенко Я. В. Задача ефективного управління процесом отримання тонкодисперсного порошку діоксиду титану в ході вихрової сушки. *Automation of technological and business processes.* 2018, 10(3): 59-66.

42. Проблема утилизации органических растворителей [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://regenerators.ru/utilizatsya-rastvoritelya>
43. Пат. RU 2261751С1. Способ фракционирования многокомпонентных смесей и устройство для его осуществления / Свиридов Б. Д., Лебедев Ю. А., Серков С. В. – Оpubл. 16.04.2004 [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37956566>
44. Баландина А. Г., Хангильдин Р. И., Ибрагимов И. Г., Мартяшева В. А. Развитие мембранных технологий и возможность их применения для очистки сточных вод предприятий химии и нефтехимии. Электронный научный журнал «Нефтегазовое дело». 2015, 5: 336 – 375. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://ogbus.ru/files/ogbus/issues/5_2015/ogbus_5_2015_p336-375_BalandinaAG_ru.pdf
45. Все о мембранном фильтре для очистки воды [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://wootchnik.ru/articles/vse-o-membrannom-filtre/#i-2>

ДОДАТКИ

Додаток 1

Схема катаболізму сахарози у *Azotobacter chroococcum* 7В

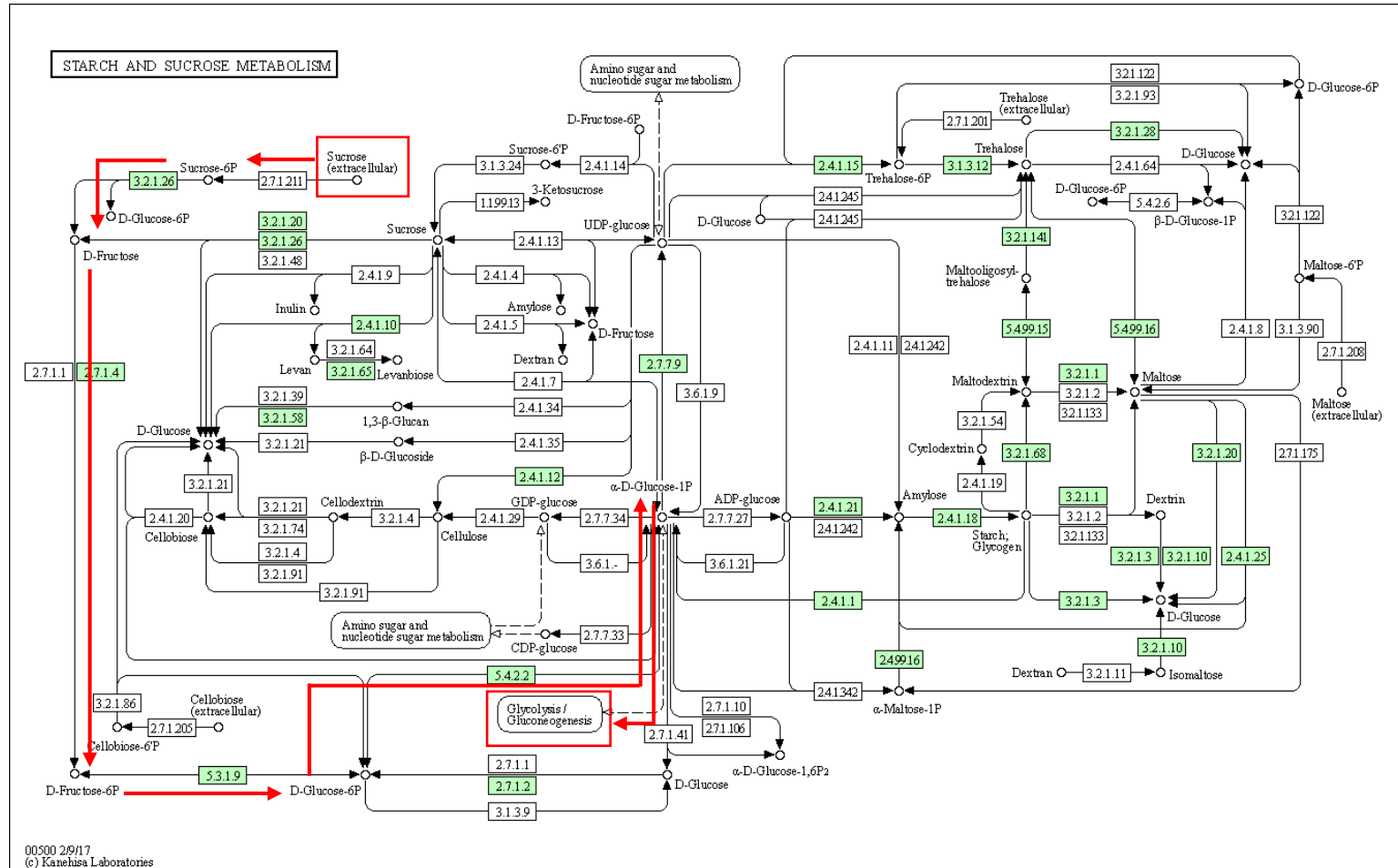
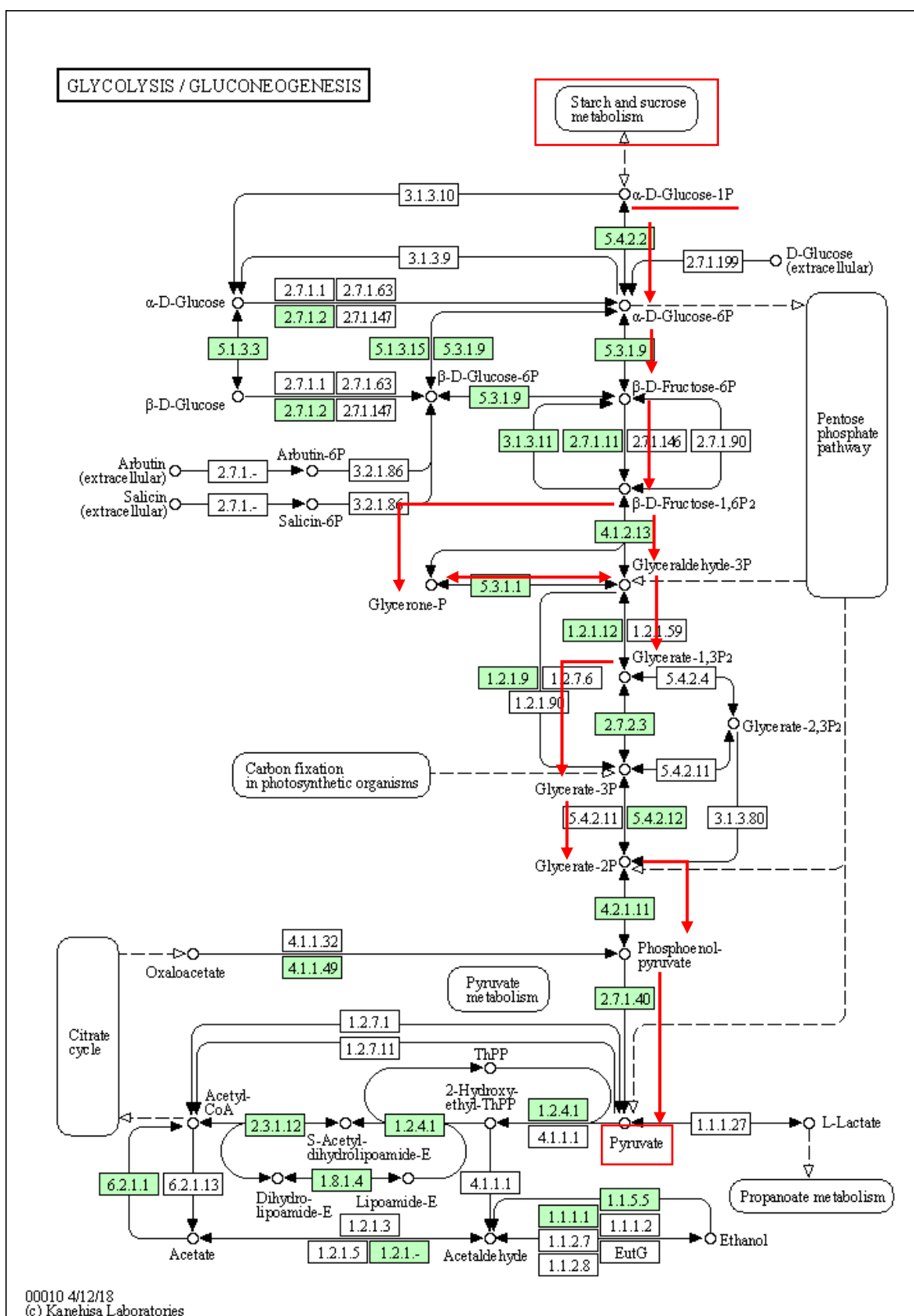


Схема катаболізму глюкози у *Azotobacter chroococcum* 7В за шляхом
Ембдена-Мейєргофа-Парнаса



00010 4/12/18
(c) Kanehisa Laboratories

Схема біосинтезу полігідроксибутирату у *Azotobacter chroococcum* 7В

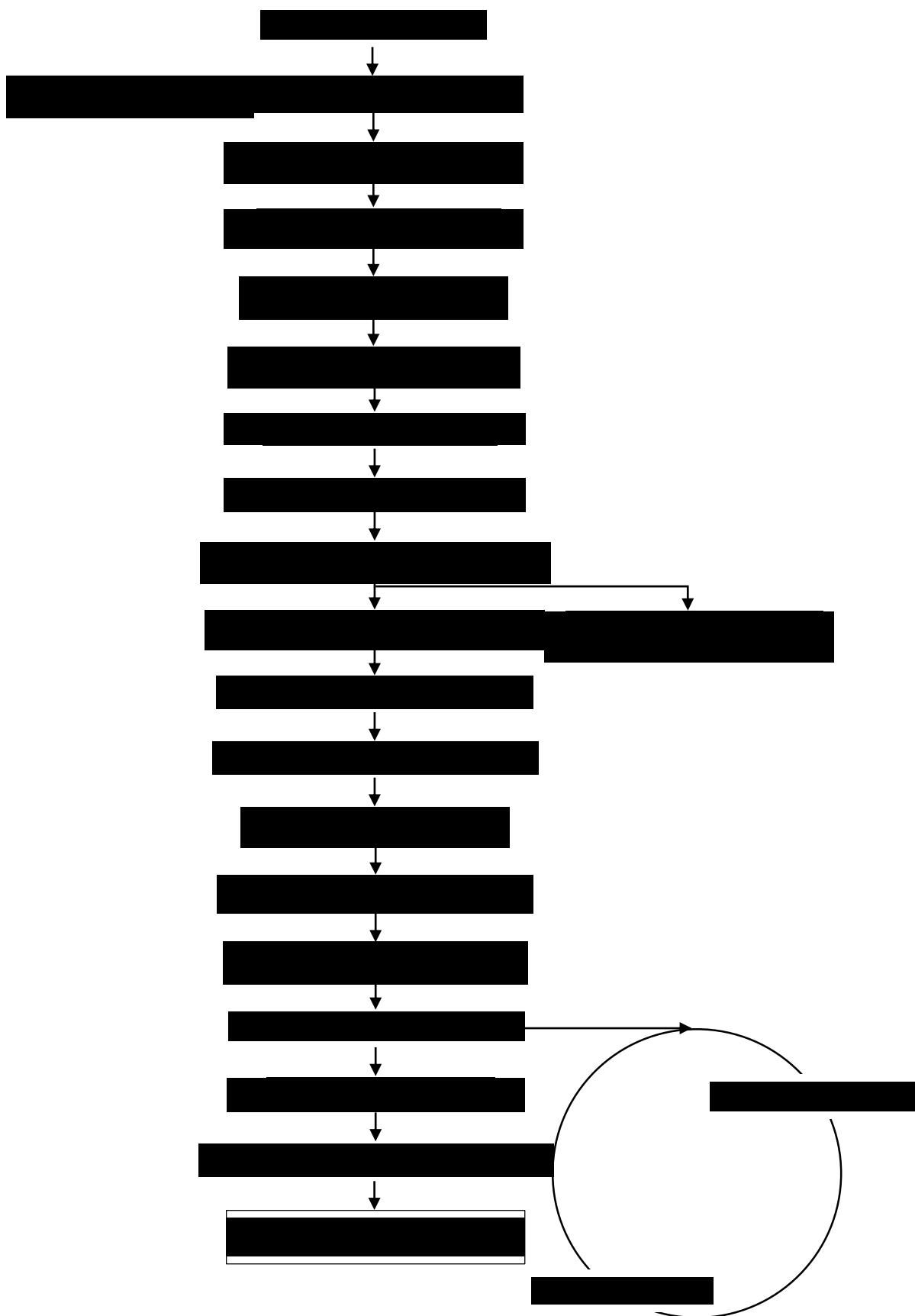
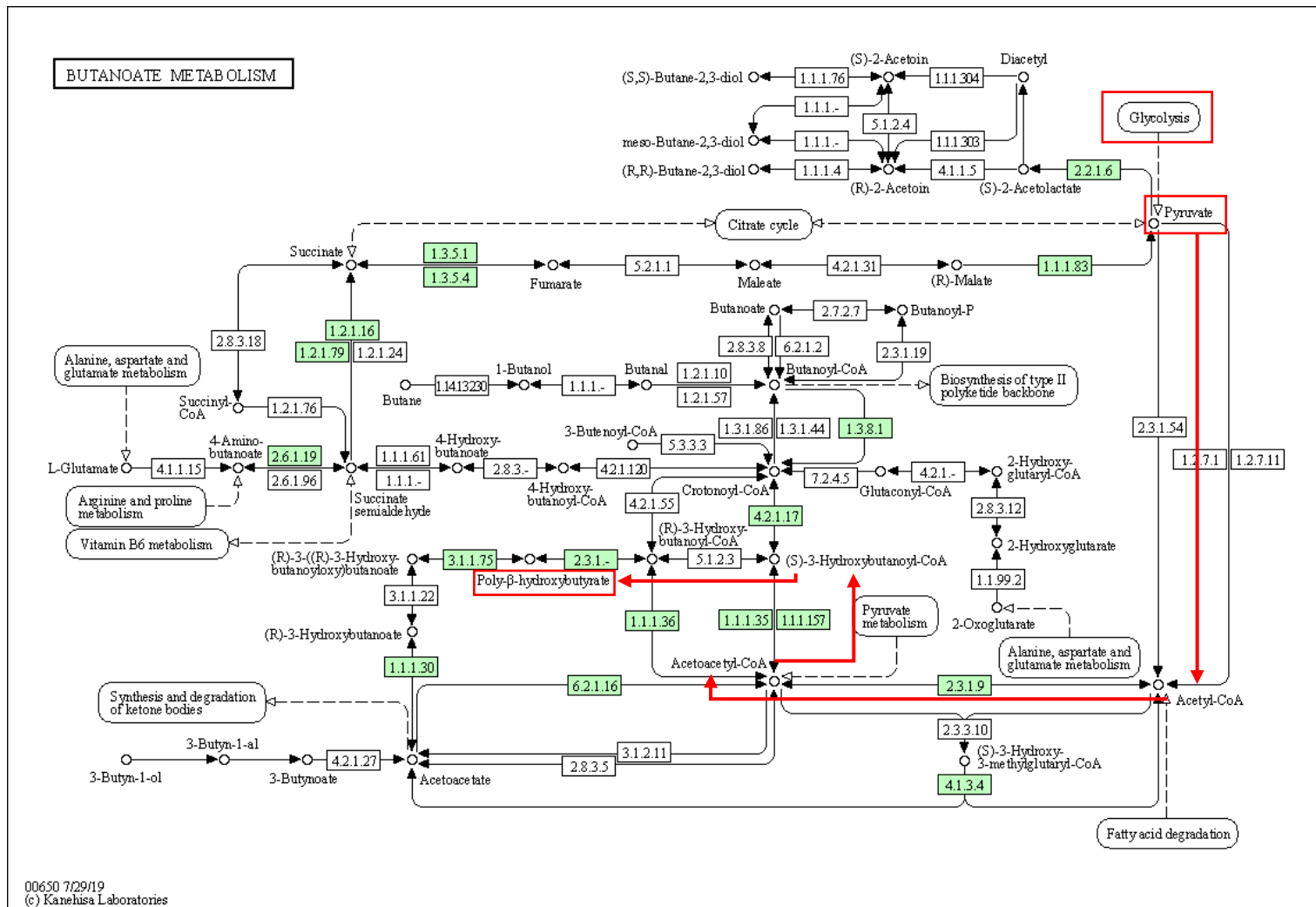


Схема біосинтезу полігідроксибутирату у *Azotobacter chroococcum* 7В



Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by Strain *Azotobacter chroococcum* 7B

A.P. Bonartsev^{1,2,*}, G. A. Bonartseva², V. L. Myshkina², V. V. Voinova¹, T. K. Mahina², I. I. Zharkova¹, S. G. Yakovlev², A. L. Zernov¹, E. V. Ivanova¹, E. A. Akoulina², E. S. Kuznetsova¹, V. A. Zhuikov², S. G. Alekseeva³, V. V. Podgorskii⁴, I. V. Bessonov⁵, M. N. Kopitsyna³, A. S. Morozov⁵, E. Y. Milanovskiy⁶, Z. N. Tyugay⁶, G. S. Bykova⁶, M. P. Kirpichnikov¹, K. V. Shaitan¹

¹Faculty of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1-12, Moscow, 119234, Russia

²A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 33, bld. 2 Leninsky Ave., Moscow, 119071, Russia

³JSC «Institute of Plastics», Petrovskiy proezd, 35, Moscow, 111024, Russia

⁴Federal scientific-clinical center of physics-chemical medicine, Federal medical-biological agency, Malaya Pirogovskaya str., 1a, Moscow, 119435, Russia

⁵Bauman Moscow State Technical University, 5, 2-nd Baumanskaya, Moscow, 105005, Russia

⁶Faculty of Soil Science, M.V.Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, 1-12, Moscow, 119234, Russia

*E-mail: ant_bonar@mail.ru

Received October 26, 2015; in final form, June 21, 2016

Copyright © 2016 Park-media, Ltd. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT Production of novel polyhydroxyalkanoates (PHAs), biodegradable polymers for biomedical applications, and biomaterials based on them is a promising trend in modern bioengineering. We studied the ability of an effective strain-producer *Azotobacter chroococcum* 7B to synthesize not only poly(3-hydroxybutyrate) homopolymer (PHB) and its main copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), but also a novel copolymer, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) (PHB4MV). For the biosynthesis of PHB copolymers, we used carboxylic acids as additional carbon sources and monomer precursors in the chain of synthesized copolymers. The main parameters of these polymers' biosynthesis were determined: strain-producer biomass yield, polymer yield, molecular weight and monomer composition of the synthesized polymers, as well as the morphology of *A. chroococcum* 7B bacterial cells. The physico-chemical properties of the polymers were studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), differential scanning calorimetry (DSC), contact angle test, and other methods. *In vitro* biocompatibility of the obtained polymers was investigated using stromal cells isolated from the bone marrow of rats with the XTT cell viability test. The synthesis of the novel copolymer PHB4MV and its chemical composition were demonstrated by NMR spectroscopy: the addition of 4-methylvaleric acid to the culture medium resulted in incorporation of 3-hydroxy-4-methylvalerate (3H4MV) monomers into the PHB polymer chain (0.6 mol%). Despite the low molar content of 3H4MV in the obtained copolymer, its physico-chemical properties were significantly different from those of the PHB homopolymer: it has lower crystallinity and a higher contact angle, i.e. the physico-chemical properties of the PHB4MV copolymer containing only 0.6 mol% of 3H4MV corresponded to a PHBV copolymer with a molar content ranging from 2.5% to 7.8%. *In vitro* biocompatibility of the obtained PHB4MV copolymer, measured in the XTT test, was not statistically different from the cell growth of PHB and PHBV polymers, which make its use possible in biomedical research and development.

KEYWORDS *Azotobacter chroococcum* 7B; poly(3-hydroxybutyrate); poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate); biosynthesis; crystallinity; biocompatibility; bone marrow stromal cells.

medical devices and formulations, including polyhydroxyalkanoates (PHAs), polyanhydrides, polyalkylcyanoacrylates, polyphosphazenes, polyphosphoesters, polyorthoesters, some polysaccharides (chitosan, hyaluronic acid, agarose, dextran, alginates, chondroitin sulfate), and proteins (collagen, fibrin, silk fibroin, spidroin, gelatin) [1–5]. These polymers are used in medical implants in reconstructive surgery [4, 5], tissue engineering [3, 6, 7], for creating new dosage forms in biopharmaceutics [8, 9], new dental materials, and they have other applications [1, 2].

Despite the wide range of polymers used in medicine, the vast majority of them are produced by chemical synthesis or isolated from natural raw materials (algae, higher plants, mushrooms, crustaceans, tissues of domestic animals). Unfortunately, the methods used in the chemical synthesis and isolation of polymers from natural raw materials cannot yield the full range of properties required for biomedical polymers. The obtained polymers require deep, and very expensive, purification, must fulfill very narrow requirements for chemical structure and properties, as well as be biologically safe, etc. Additionally, synthetic polymers and the products of their biodegradation may be toxic, while natural polymers may display pronounced immunogenicity or be contaminated with viruses or prion proteins [10, 11].

Biodegradable poly(3-hydroxyalkanoates), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its copolymers (according to the Russian chemical nomenclature of macromolecular compounds and IUPAC [12]), attract particular attention among developed and used biomedical polymers. In contrast to natural polymers (chitosan, alginate, dextran, collagen, etc.) and chemically synthesized polymers, PHAs are produced by biotechnological methods that allow one to achieve a high degree of purity, and to control and specify the physico-chemical properties of the biopolymers within narrow limits during their biosynthesis. PHAs have a set of unique properties: high mechanical strength and thermal plasticity that allows easy processing and obtainment of a wide range of products, ability to form composites with synthetic polymers, inorganic materials, and medicinal products, complete biodegradability to non-toxic products, biocompatibility (including hemocompatibility) with human and animal tissues and organs, and environmental safety. Therefore, PHAs are considered promising for use in medicine [13–16].

PHAs also have a unique nanostructure. As partially crystalline compounds, PHAs can form various supra-molecular structures, such as lamellae and spherulites. Such a partially crystalline structure and morphology largely defines the biological properties of PHAs, such as the kinetics of its biodegradation [17, 18].

However, PHAs and other polymeric materials, such as PHB homopolymer, can have certain disadvantages, as well: high hydrophobicity and crystallinity, long-term biodegradation and low plasticity, which in some cases severely limits their use as bioengineered materials in medicine, for example for the manufacture of vessel grafts [19, 20]. Therefore, the development of novel biotechnological methods for obtaining new PHB copolymers for biomedical applications with an optimum combination of the physico-chemical and biological properties of the biomaterials produced from them is considered the most promising trend in modern bioengineering [1, 2, 13–16].

Previously, we had demonstrated that it was possible to biosynthesize different PHB copolymers by the high-performance PHAs strain-producer *Azotobacter chroococcum* 7B using a variety of methodological approaches and had conducted a comprehensive study of the physico-chemical and biological properties of the resulting polymers. This strain is characterized by an ease of culturing and biotechnological process (it requires only the most basic equipment, does not require highly specific culture media, gas feeding, high-precision control of specific parameters, etc.), high productivity (high biomass yield, polymer and dry biomass content in cells up to 80% and above), and high molecular weight of the synthesized polymer (more than 1.5×10^6 Da). These characteristics are extremely important for the biotechnological production of polymers for biomedical applications, since they require technically simple and deep purification, in addition to an assured efficient production [15, 21]. However, these strain-producers have certain limitations in the synthesis of PHB copolymers containing monomers of 3-hydroxycarboxylic acids with a chain length of more than five carbon atoms [22, 23]. The biosynthesis of a new PHB copolymer, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate), has been demonstrated using such bacterial producers as *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia* sp., *Chromobacterium* sp., which can biosynthesize PHAs with short- and long-chain monomers of carboxylic acids [24–27]. However, the chemical structure of the copolymer (its monomer, 3-hydroxy-4-methylvalerate, has a Y-shaped R-group) makes it particularly interesting for the study of its biosynthesis by such bacterial strain-producers as *Azotobacter* sp. due to these restrictions.

The possibility of biosynthesizing new PHB copolymers through such bacterial strain-producers as *Azotobacter* sp. is of great scientific and practical interest. We examined the possibility of biosynthesizing a new PHB copolymer, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate), by the highly efficient PHA strain-producer *A. chroococcum* 7B, determined

its physico-chemical properties, as well as its *in vitro* biocompatibility.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Sodium salt of valeric acid or sodium valerate (VA), sodium salt of 4-methylvaleric acid or sodium methylvalerate (4MVA), sodium salt of hexanoic acid or sodium hexanoate (HxA); components of the culture medium: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CaCO_3$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, sodium citrate, $CaCl_2$, KH_2PO_4 , sucrose, agar, phosphate-buffered saline (PBS). All reagents were purchased from Sigma Aldrich (Germany) and used "as purchased."

Biosynthesis of polymers

Highly efficient PHB strain-producer *A. chroococcum* 7B, non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria capable of overproducing the polymer (up to 80% of the cells' dry weight) was used for polymer biosynthesis [28–31]. The strain was isolated from the rhizosphere of wheat (sod-podzolic soil) and maintained in Ashby's medium containing 0.2 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/l NaCl, 0.006 g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 5.0 g/l $CaCO_3$, 20 g/l of sucrose and 20 g/l agar. All experiments were carried out under laboratory conditions. To achieve high productivity, the culture of *Azotobacter* cells was grown in shake flasks on a microbiological Innova 43 shaker (New Brunswick Scientific, USA) with constant stirring and at 30 °C in Burk medium under conditions of excess car-

RESEARCH ARTICLES

Table 1. The biosynthesis of PHB copolymers by *A. chroococcum* 7B on a sucrose-containing culture medium supplemented with salts of carboxylic acids

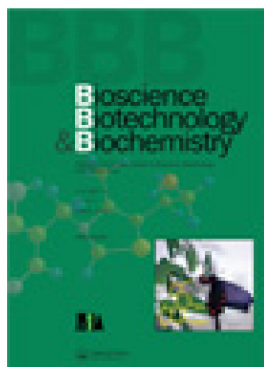
Substrate	Time of addition of salts of the carboxylic acid to the culture medium, h	Biomass yield, g/l of the medium	PHA content in biomass, % of dry cells' weight	Molecular weight of PHA, kDa	Content of 3HB/3H4MB in the copolymer, mol. %
Sucrose, 50 mM	-	5.8 ± 0.6	83.4 ± 3.1	1710	0
S + 20 mM PA	12	2.2 ± 0.7*	63.3 ± 3.3*	890	2.9
S + 5 mM VA	12	4.4 ± 0.9*	76.2 ± 3.0*	1290	2.5
S + 20 mM					

bon source in a medium containing 0.4 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.006 g/l $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.5 g/l sodium citrate, 0.1 g/l $CaCl_2$, 1.05 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2 g/l KH_2PO_4 and 17 g/l (50 mM) sucrose as the main carbon source. The volume of the medium in the flask was 100 ml, which at high productivity of the *A. chroococcum* 7B strain with sampling at the end of the experiment allows one to analyze the biosynthetic processes and have a sufficient number of samples for statistical processing (each experiment was performed in eight replicates). The salts of carboxylic acids (propionic, valeric, 4-methylvaleric, hexanic) were added to the culture medium as additional carbon sources for the biosynthesis of the PHB copolymers. VA in a concentration of 5 and 20 mM was added to the culture medium immediately and after 12 hours of culturing as a monomer precursor of 3-hydroxyvalerate within the PHA composition. These concentrations and time points were selected to produce PHBV copolymers with different contents of 3-hydroxyvalerate in the copolymer chain [28, 29]. 4MVA and HxA were added to the culture medium as potential monomer precursors of 3-hydroxy-4-methylvalerate and 3-hydroxyhexanoate in the composition of the synthesized PHAs at a concentration of 20 mM at 0

hour and concentration of 5, 10, 20 and 35 mM after 12 hours of culturing of the strain-producer. These concentrations of the carboxylic acid were selected by analogy with the other carboxylic acids used for the biosynthesis of new PHB copolymers and according to [24–27, 29]. The strain-producer was cultured for 72 hours. The optical density of the culture medium was monitored by nephelometry. The growth and accumulation of the polymer was also monitored by light microscopy using a Biomed-1 microscope ("Biomed", Russia) with a digital camera. The parameters of the copolymers biosynthesis: the biomass yield (g/l medium) and total polymer content in the cells (% by weight of dry cell weight) (Table 1) were measured according to the previously developed techniques. The process of isolation and purification of the polymer from strain-producer biomass includes chloroform extraction, filtration, precipitation with isopropyl alcohol, purification by multiple cycles of dissolution-precipitation, and drying [28–31].

Study of the chemical composition of the polymer by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

1H NMR spectra of 1% (w/v) polymer solutions in deuterated chloroform were recorded on a 300 MHz



Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.tandfonline.com/loi/tbbb20>

Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp.

Pabitra Bhagowati^a, Shreema Pradhan^a, Hirak R. Dash^a & Surajit Das^a

^a Laboratory of Environmental Microbiology and Ecology (LEnME), Department of Life Science, National Institute of Technology, Rourkela, India

Published online: 22 Apr 2015.

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is the intracellular lipid reserve accumulated by many bacteria. The most potent terrestrial bacterium *Bacillus cereus* SE-1 showed more PHB accumulating cells (22.1 and 40% after 48 and 72 h) than that of the marine *Bacillus* sp. CS-605 (5 and 33% after 48 and 72 h). Both the isolates harbored *phbB* gene and the characteristic C=O peak was observed in the extracted PHB by Fourier transformed infrared spectroscopy analysis. Maltose was found to be the most suitable carbon source for the accumulation of PHB in *B. cereus* SE-1. The extracted PHB sample from *B. cereus* SE-1 was blended with a thermoplastic starch (TS) and an increased thermoplasticity and decreased crystallinity were observed after blending in comparison to the standard PHB. The melting temperature (T_m), melting enthalpy (ΔH_f), and crystallinity (X_c) of the blended PHB sample were found to be 109.4 °C, 64.58 J/g, and 44.23%, respectively.

Key words: poly- β -hydroxybutyrate; *Bacillus*; fluorescence activated cell sorter (FACS); FTIR; melting enthalpy

Thus, the recent issues concerning global environment and solid waste management have shifted the interest for the development of biodegradable plastics with desired physical and chemical properties of synthetic plastics such as polypropylene (PP) and polyethylene (PE).³⁾ However, biologically degradable polymers are still underdeveloped and need urgent attention. In this context, biodegradable polymer, PHB, has been found to be a promising material. PHB is a polyhydroxyalkanoate (PHA) polymer which belongs to the polyester class and is of huge interest due to their biological origin and biodegradability.⁴⁾

In the case of PHB producing micro-organisms, synthesis takes place when suitable carbon source is available in excess amount and cellular growth is limited due to other nutrient limitation. More than 75 bacterial genera have been reported so far for PHB accumulation as intracellular granules. However, the most common studied organisms for PHB accumulation include genera of *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Rhodospirillum*, and *Pseudomonas*.⁵⁾ It has also been found that, micro-organisms rich in poly-beta-hydroxybutyrate have a slower rate of autolysis than organisms with poor PHB production capability, thus PHB can act as a reserve carbon and energy source.⁶⁾ PHB

2

P. Bhagowati et al.

mineralization. Biomedical and biodegradable properties of PHB have led to the design of medical devices and tissue engineering.⁸⁾ However, PHB possesses many deficiencies to be used as a practical polymer material such as high crystallinity and thermal instability near the melting point.⁹⁾ Thus, physical blending and chemical modifications have been carried out to improve its properties such as strength, film formation, mechanical strength, amphiphilicity, biodegradability, and biocompatibility.¹⁰⁾

Though much advancement has taken place regarding the microbial biosynthesis of PHB, industrial-scale production and application are still at far away from reality. In this regard, proper selection of the microbial strains for PHB production holds the key and soil microbes provides the better resources. Thus, the current work aims to obtain a proper microbial system for significant PHB production and their characterization to increase the suitability of use of PHB with suitable physical and chemical properties.

the microscope field by ImageJ analysis.¹²⁾ The integrated density of the PHB accumulating cells of the isolates was carried out by analyzing the Nile blue-stained images obtained from fluorescent microscopy study by plugin of ImageJ program.

Characterization of the potent PHB-producing isolates. Morphological and physiological characterization of the potent isolates was carried out by Gram staining, Scanning electron microscopy (SEM), biochemical tests, and antibiotic susceptibility testing. Biochemical tests were performed manually¹³⁾ for triple sugar iron test, citrate utilization, mannitol utilization, motility test, nitrate reduction, gelatin hydrolysis, urease production, and oxidase test. Biochemical test was carried out to study the comparative account of the morphological as well as physiological differences between the two most potent isolates. Similarly, antibiotic susceptibility test was conducted by disc diffusion method¹⁴⁾ using commercially available antibiotic discs

Screening of PHB accumulating isolates. In order to screen the PHB positive isolates, Nile blue staining technique was used.¹¹⁾ Briefly, the isolates were grown in 10 mL of Minimal Davis broth (Hi-Media, India) supplemented with 1% dextrose as sole carbon source. The tubes were incubated at 37 °C for 72 h with shaking at 180 rpm. Grown bacterial cultures were subjected to centrifugation at 6000 rpm for 10 min at 4 °C. The cell pellet was resuspended with 1 mL of sterile distilled water. Smears of these cell suspensions were heat fixed to glass slides and stained with 1% Nile blue (Hi-Media, India) and observed under fluorescence microscope (Olympus 1X71) with excitation wavelength of 460 nm. Nile blue stains PHB granules in the cells to orange.

The most potent PHB producers among the bacterial isolates were selected by analyzing the intensity of Nile blue staining and the number of positive cultures under

Optimization of carbon sources for PHB production. The potent isolate was subjected to growth under various carbon sources (dextrose, lactose, sucrose, maltose, fructose, and galactose) for the optimum production of PHB. Briefly, the isolate was inoculated in Minimal Davis broth (Hi-Media, India) supplemented with individual carbon sources (at a final concentration of 1%) and incubated at 37 °C at 180 rpm for 72 h. After incubation, PHB was extracted from the grown culture by sodium hypochlorite-chloroform method.¹⁶⁾ About 20 mL of grown culture was centrifuged at 6000 rpm for 20 min to collect the cell pellet. The cell pellet was resuspended in 2.5 mL of 4% sodium hypochlorite for digestion followed by addition of 2.5 mL of hot chloroform and incubated at 37 °C for 1 h. The suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the bottom phase containing PHB and chloroform were collected. Further extraction was carried out with hot chloroform and precipitated with ethanol and acetone (1:1). The precipitate was allowed to evaporate by incubating at 30 °C over-night to obtain PHB crystals. After lyophilization, the dry weight of the PHB granules was taken to determine the maximum production of PHB under varying conditions of carbon sources. The time course of PHB production at optimized conditions was studied till 72 h with respect to the dried cell mass.

Optimization of carbon sources for PHB production
Out of all the five carbon sources tested, in the presence of maltose, a higher level of PHB production (5.63 g/L) was obtained, whereas a lower level of PHB production was obtained with dextrose (0.4 g/L) alone as the carbon source. Similarly, biomass of *B. cereus* SE-1 was in the trend of maltose, fructose, galactose, fructose, and dextrose (Fig. 5(a)). Time course of PHB accumulation study revealed that with an increase in time, the dry cell mass as well as PHB content also increases (Fig. 5(b)).

Amplification of *phbB* gene in the potent isolates. *phbB* gene was amplified using bacterial lysate as template. PCR was carried out using the primer set of *phbB* 5'-ATGAGCAATCAACGAATTGCA-3' and *phbB*R- 5'-TCATTGCATGTTTCAGACCGC-3'.¹⁵⁾ The amplification reaction was performed in a total volume of 25 µL using a thermal cycler (Bio-Rad, USA). The PCR mixture contained 1 U/µL Taq polymerase (Sigma-Aldrich), 1X enzyme buffer, 200 µM of each dNTPs (Sigma-Aldrich), 1.25 mM mgCl₂, and 0.5 µM of each primer. The optimized amplification conditions included a pre-denaturation step at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles of 95 °C for 2 min, 60 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, and a final extension of 72 °C for 10 min and hold at 4 °C forever. The PCR product was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and the banding pattern was visualized in a Gel documentation system (Bio-Rad, USA) under UV light.

Characterization of polymer blend by differential scanning calorimetry (DSC). DSC thermograms were recorded on a DSC instrument (DSC200 F3 Maia, NETZSCH, Germany), and calibrated with indium (mp —156.61 °C; $\Delta H = 28.54$ J/g). The data were collected by heat and cool method. Samples of cast films weighed 5–10 mg were packed in aluminum pan and then heated from 20 to 200 °C at a scanning rate of 10 °C per min under nitrogen atmosphere. The melting temperature (T_m) and melting enthalpy (ΔH_f) were determined from DSC endothermic peaks. The crystallinity (X_c) of PHB in blend was calculated as per the equation given below.

$$X_c = \Delta H_f \times 100 / \Delta H_o \times w$$

where ΔH_f is the melting enthalpy of the sample (J/g), ΔH_o is the melting enthalpy of the 100% crystalline PHB which is assumed to be 146 J/g, and w is the weight fraction of PHB in the sample.

Results

Screening of potent PHB producers

A total of 32 bacterial isolates (12 from marine sources and 20 from organic waste sample) were screened for PHB accumulation. PHB accumulating bacterial isolates flourish orange under fluorescence microscope, whereas no such fluorescence was observed for non-PHB producers. The acquired images

microbial origin. In this regard, many *Bacillus* strains have been reported possessing tremendous potential of PHB accumulation in their cytoplasm under nutrient limiting conditions at a level of 6–97% of dry cell weight.^{18–21)} In a similar line with that, the two most potent isolates of the current study were also identified as *Bacillus*. Fluorescence microscopy is a useful tool for the assessment of PHB accumulation by bacteria as Nile blue selectively binds with the produced PHB and is permeable to the bacterial cell. Screening of all the isolates by Nile blue staining followed by fluorescent microscope revealed the varied amount of PHB production by the bacterial isolates. These results cor-

Upstream process optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using two-stage batch and fed-batch fermentation strategies

Bingqing Wang · Ratna R. Sharma-Shivappa ·
Jonathan W. Olson · Saad A. Khan

Received: 1 November 2011 / Accepted: 2 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract This research focused on optimizing the upstream process time for production of polyhydroxybutyrate (PHB) from sucrose by two-stage batch and fed-batch fermentation with *Alcaligenes latus* ATCC 29714. The study included selection of strain, two-stage batch fermentations with different time points for switching to nitrogen limited media (14, 16 or 18 h) and fed-batch fermentations with varied time points (similar to two stage) for introducing nitrogen limited media. The optimal strain to produce PHB using sucrose as carbon source was *A. latus* ATCC 29714 with maximum-specific growth rate of $0.38 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ and doubling time of $1.80 \pm 0.05 \text{ h}$. Inducing nitrogen limitation at 16 h and ending second stage at 26 h gave optimal performance for PHB production, resulting in a PHB content of $46.7 \pm 12.2 \%$ (g PHB per g dry cell weight) at the end of fermentation. This was significantly higher ($P \leq 0.05$) (approximately 7 %) than the corresponding fed batch run in which nitrogen limitation was initiated at 16 h.

Keywords Biodegradable plastics · Polyhydroxyalkanoate (PHA) · *Ralstonia eutropha* · Sucrose fermentation · Nitrogen limitation

Abbreviations and symbols

DCW	Dry cell weight, g/L
DCW ₁	Dry cell weight at start of exponential phase (g/L) in Eq. (2), g/L
DCW ₂	Dry cell weight at end of exponential phase (g/L) in Eq. (2), g/L
HPLC	High-performance liquid chromatography
OD	Optical density
OD ₁	Optical density measured at 600 nm at the start of exponential phase in Eq. (1)
OD ₂	Optical density at end of exponential phase in Eq. (1)
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PHB	Polyhydroxybutyrate
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
PHB4B	Poly(2-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)

umes or
idues in
milar to
, which
t recent
as high
d resis-
pa) and
to bulk

sweet sorghum and maple, while glucose and fructose are typically derived from corn, a major food and feed crop around the world.

A. latus is a growth associated PHB producer which can synthesize PHB with sucrose as carbon source and can accumulate PHB up to 80 % of dry cell weight [30]. It has been reported that nitrogen limitation in the media can enhance PHB accumulation from 50 to 88 % (w/w) by *A. latus* [15] making downstream processing much easier

4-5H₂O 0.5 g, CaCl₂·2H₂O 2 g, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.23 g, (NH₄)₆Mo₄O₂₄ 0.1 g, 35 % HCl 10 mL.

Med. 4 (*A. latus* growth kinetics and nitrogen-rich fermentation phase): Media used for studying *A. latus* growth kinetics and PHB production under nitrogen-rich phase [14] contained (per L): sucrose 20 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, KH₂PO₄ 1.5 g, Na₂HPO₄·12H₂O 9 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g,

FeCl₂·H₂O 60 mg, CaCl₂·2H₂O 10 mg, and TES 1 mL. Each liter of TES contained H₃BO₃ 0.3 g, CoCl₂·6H₂O 0.2 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·4H₂O 30 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 30 mg, NiSO₄·7H₂O 28 mg, and CuSO₄·5H₂O 10 mg. pH of the formulated media was 7.0 (unadjusted).

Med. 5 (nitrogen limited *A. latus* fermentation phase): Media for studying *A. latus* fermentation for PHB production under nitrogen limitation [7] was similar to **Med. 4**, however only 0.2 g of (NH₄)₂SO₄ (10 % of **Med. 4**) was added.

Med. 6: Feeding solution for fed-batch fermentation under nitrogen limitation had (per L) 52 g sucrose.

Two-stage nitrogen limited batch fermentation

PHB fermentation studies on initiating nitrogen limitation by replacing **Med. 4** at $t_0 - 2$, t_0 or $t_0 + 2$ h were conducted with 100 mL **Med. 4** in 250 mL centrifuge bottles with plastic foam stoppers. Each bottle (250 mL × 36) was inoculated with 2.5 mL inoculum prepared as described earlier and incubated at 33 °C, 200 rpm in an incubator shaker (Series 25, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, USA). Samples were drawn at 4 h intervals up to and at $t_0 - 2$, t_0 or $t_0 + 2$ h. At the time point for initiating nitrogen limitation, the remaining bottles were centrifuged at 4,000 rpm, 4 °C for 15 min. Residual **Med. 4** was decanted and the same volume of nitrogen limited media (**Med. 5**) was added. Bottles were incubated at 33 °C, 200 rpm in the incubator shaker for up to 28 h from start of second stage. Three bottles each were taken out for analyses at 4, 8, 12, 20, 24, 26, 27 and 28 h after initiating of nitrogen limitation [31].

precipitation. The non-solvent used was a mixture of methanol and water (7:3 v/v), the amount of non-solvent used was 1/10 volume of chloroform used for each individual sample (1.25 mL per gram dry cell mass). After extraction, uncapped tubes with PHB-rich aliquots were left in a fume hood for 48 h to volatilize any excess solvent. The final PHB pellet was weighed and the various parameters calculated.

Analytical procedures

Optical density (OD) and dry cell weight (DCW)

As per the method reported by Grothe et al. [16] and Patwardhan et al. [3], optical density (OD) of the suitably diluted cell suspension was measured at 600 nm [16] against a media blank in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Suzhou Instruments Manufacturing CO., Ltd., Suzhou, China). Dry cell weight was determined gravimetrically. Culture samples were centrifuged (4,000 rpm, 15 min, 4 °C) and the supernatant was refrigerated for further analysis. The cell pellet was re-suspended

by substrate limitation due to accumulation of relatively high-sugar concentration in the media over time which suppressed the synthesis of PHB by *A. latus*.

The final PHB concentration measured in this study was higher (3.96 vs. 2.97 g/L) than that obtained by Grothe et al. [16] in 500 mL flasks with culture time set at 93 h using optimized media without nitrogen limitation. The PHR yield coefficient (Y_{PHR}) though slightly lower was

Accepted Manuscript

Title: Polyhydroxybutyrate by *Streptomyces* sp.: Production and Characterization

Authors: Krishnan Sivakumar, Chinnadurai Gandhi Shree, Perumal Palani



PII: S0141-8130(17)30685-2
 DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.028>
 Reference: BIOMAC 7836

To appear in: *International Journal of Biological Macromolecules*

among the 20 different isolates screened for PHB production. The chosen organism was grown in medium containing the cheaply available and agriculturally regarded as waste

3

ACCEPTED MANUSCRIPT

materials as substrates (carbon source) such as paddy straw, wheat bran, rice bran, sugarcane molasses and oil cake. The organism produced relatively higher quantity of PHB when oil cake was used as the substrate compared than other substrates used. The produced PHB was purified using hot chloroform extraction method. The purity, structure, crystallinity and and the resulting sample was serially diluted to the extent of 10^{-6} . The samples with a dilution factors 10^{-4} and 10^{-5} were plated on starch casein agar medium (pH 7.0) and the inoculated plates were incubated at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ for 21 days [19]. The pure cultures were obtained and maintained on starch casein agar slants at 4°C until further use.

The PHB positive cultures were grown in starch casein broth and kept under shaking (130 rpm) condition for 12 days at room temperature. The cells were collected by centrifugation at

1) however a strain designated as MAPPL 011 produced relatively higher PHB ($4.26\text{g}^{-\text{L}}$)

ОПРЕДЕЛИТЕЛЬ БАКТЕРИЙ БЕРДЖИ

Под редакцией
Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита,
Дж. Стейли и С. Уилльямса

Девятое издание. В двух томах
Том 1

Перевод с английского
под редакцией
акад. РАН Г. А. Заварзина

торые штаммы могут также фиксировать азот и при pH 4,6–4,8. Встречаются в почве и воде.

Типовой вид: *Azomonas agilis*.

Дифференциация видов рода *Azomonas*: См. табл. 4,16.

Род *Azorhizobium*

От редакции: Род *Azorhizobium* не приведен в «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology». Этот род описан в 1988 г. (Dreyfus et al., Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 89–98).

Палочки, 0,5–0,6 × 1,5–2,5 мкм. Подвижные; при росте на плотной среде имеют перитрихальные жгутики, а в жидкой среде — один латеральный. Колонии на агаризованной среде округлые, кремового цвета. Облигатные азоты. В микроаэробных условиях фиксируют N₂ и хорошо растут за счет использования N₂ в среде без азота в присутствии витаминов. Оксидазо- и каталазоположительные. Уреазаотрицательные. Из сахаров окисляют только глюкозу. Как при NH₄⁺, так и при N₂-зависимом росте в качестве углеродных субстратов предпочтительны органические кисло-

Род *Azotobacter*

Крупные клетки овальной формы, диаметром 1,5–2,0 мкм, плеоморфные, от палочковидных до кокковидных. Располагаются одиночно, парами или группами неправильной формы, иногда в виде цепочек разной длины. Эндоспор не образуют, но образуют цисты. Грамотрицательные. Подвижные за счет перитрихальных жгутиков или неподвижные. Азоты, но могут также расти при пониженном парциальном давлении кислорода. У всех видов некоторые штаммы продуцируют водорастворимые и водонерастворимые пигменты. Хемоорганотрофы; используют для роста сахара, спирты и соли органических кислот. Азотфиксаторы; обычно в несимбиотическом состоянии фиксируют не менее 10 мг N₂ в расчете на 1 г потребленного углевода (как правило, глюкозы). Для азотфиксации нуждаются в молибдене, который, однако, может быть частично заменен ванадием. Белки не гидролизуют. В качестве источников азота используют нитрат и (за исключением одного вида) соли аммония, а также некоторые аминокислоты. Каталазоположительные. Диапазон pH для роста в присутствии источников связанного азота 4,8–8,5; оптимальный диапазон pH

79

Определитель бактерий Берджи

для роста и азотфиксации 7,0–7,5. Встречаются в почве и воде, один вид — в ассоциации с корнями растений.

Типовой вид: *Azotobacter chroococcum*.

Род *Bordetella*

Мелкие коккобациллы, 0,2–0,5 × 0,5–2,0 мкм, часто биполярно окрашенные, одиночные или в парах, реже в цепочках. Грамотрицательные. Могут

УДК 579.64

Т.И. Урюмцева, А.М. Кабдрасилова
T.I. Uryumtseva, A.M. Kabdrasilova**РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРЫ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ AZOTOBACTER****DEVELOPMENT OF NUTRIENT MEDIA FORMULATION FOR AZOTOBACTER BACTERIA CULTIVATION**

на питательных сред. Скорость роста оценивали на 2-, 3- и 4-е сут. Первый видимый рост зафиксирован на через 48 ч на средах № 2 и 4. Через 72 ч рост зафиксирован на всех средах, колонии круглые выпуклые блестящие непрозрачные слизистой консистенции размером 2-3 мм (рис.). По истечении 5 сут. самый обильный рост зафикс-

ре
мс
лу
но
ba
ма
фс



Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Spirulina* sp. LEB 18 Using Biopolymer Extraction Waste

Cleber Klasener da Silva¹ · Jorge Alberto Vieira Costa² · Michele Greque de Morais¹

Received: 13 October 2017 / Accepted: 19 December 2017
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Quantification of the Biopolymer in the Cell

The biopolymer concentration in the biomass was determined by gas chromatography (GC) at 0, 3, 6, 9, 11, 13, 15, 17, and 20 days of cultivation. The dried biomass (105 °C for 24 h) was subjected to cell lysis, hydrolysis of the polymer, and methanolysis in 1 mL of chloroform, 0.85 mL of methanol, and 0.15 mL of sulfuric acid at 100 °C for 3.5 h [26]. The methyl ester groups formed were analyzed on a gas chromatograph (2014 Shimadzu, Japan) equipped with Restek Rtx-5 silica capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm) and a flame ionization detector (FID). The operating conditions were 250 °C for injector and detector. The program used to separate the methyl esters was as follows: 60 °C for 2 min, rate of increase of 25 °C/min until 180 °C/8 min. The calibration curve was constructed using poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) 88 mol% HB and 12 mol% HV (Sigma-Aldrich) as standard [26, 27].

М.С. КУЧЕРЕНКО, Ю.Д. БАБЕНЮК,

В.М. ВОЙЦЬКИЙ

СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**КИЇВ
ФІТОСОЦІОЦЕНТР
2001**

12.3. ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Взагалі газова хроматографія — це метод розділення летких сполук, який базується на розподіленні речовин між двома фазами (рухомою та нерухомою). Якщо нерухома фаза повинна бути тільки твердою або рідкою, то рухома фаза може бути й газоподібною. Відповідно до цього існує дві системи: газова хроматографія на твердій основі (газоадсорбційна хроматографія) і газорідинна хроматографія.

У випадку *газоадсорбційної хроматографії* розділення визначається адсорбційними властивостями наповнювача колонки (силікагель, активоване вугілля) відносно до компонентів, що розділяються.

Для *газорідинної хроматографії* рухомою фазою служить газ, а нерухомою — рідка фаза і розділення базується на різній спорідненості речовин до рідини на колонці. Метод газорідинної хроматографії характеризується дуже високою ефективністю та швидким виконанням аналізу (до 1 хв). Він може бути використаний для якісної та кількісної характеристики будь-яких органічних речовин, здатних випаровуватися без зміни структури. Але деякі

22.05.2020

ЕДРИД

20.09.2014

№216.012.f63f

Способ культивирования хлебопекарных дрожжей

Вид РИД

Изобретение

Юридическая информация**Авторы**[Сокол Ольга Владимировна](#),[Мартынов Константин Александрович](#),[Чечина Ольга Николаевна](#),[Зимичев Анатолий Викторович](#)**Правообладатели**[Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Самарский государственный технический университет](#)

№ охранного документа

0002528872

Дата охранного документа

20.09.2014

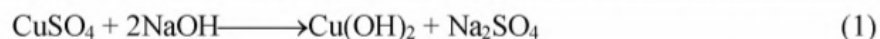
поддерживая концентрацию сахарозы в культуральной жидкости 8%. Культивирование ведут до концентрации дрожжевых клеток 1450 млн/мл в течение 6 ч. Концентрацию сахарозы в культуральной жидкости определяют методом Бертрана. Концентрацию дрожжевых клеток определяют фотометрически на длине волны 600 нм и подсчетом клеток в камере Горяева (Микробиологический контроль, управление дрожжевого производства. М.: Экология, 1991

1.2.1.1 Определение восстанавливающих сахаров по методу Бертрана.

Сахара, имеющие свободные альдегидные или кетонные группы, обладают способностью в определенных условиях восстанавливать щелочные растворы окиси меди до закиси, которая может быть учтена весовым или объемным путем. Метод дает хорошие результаты при содержании глюкозы в испытуемом растворе в количестве от 10 до 90 мг. Следует избегать одновременного наличия в растворах аммонийных солей, аминокислот и пептонов, способствующих переводу осадка закиси меди в растворимое состояние.

12

Принцип метода основан на способности окиси меди в щелочной среде окислять альдегидные соединения с образованием красного осадка закиси меди. При этом закись меди при наличии серной кислоты окисляется окисным сернокислым железом, которое при этом восстанавливается (1):



**ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ФОРМОВАНИЯ ПЛЕНОК
НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В СМЕСЯХ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТ–ПОЛИУРЕТАН**

© А. А. Ольхов¹, В. С. Маркин², Р. Ю. Косенко²,
М. А. Гольдштрах², А. Л. Иорданский²

¹ Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова, Москва

² Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва

E-mail: aolkhov72@yandex.ru

Поступило в Редакцию 21 февраля 2015 г.

Изучены структурные особенности полимерных композиций на основе полигидроксibuтирата и сегментированного полиуретана. Методами изотопного H–D обмена и ИК спектроскопии показано, что при использовании одного растворителя между полигидроксibuтиратом и полиуретаном отсутствует межмолекулярное взаимодействие. При использовании двух растворителей и высоко-температурного воздействия наблюдается взаимодействие полимеров.

В работе изучали смесевые пленки, полученные двумя различными способами. По первому способу (серия А) определенные массы СПЭУ и ПГБ растворяли при $T = 60^{\circ}\text{C}$ и непрерывном перемешивании соответственно в тетрагидрофуране (ТГФ) и хлороформе (ХЛФ), затем смешивали два раствора и заливали в чашки Петри. Чашки накрывали крышками и выдерживали при комнатной температуре в течение 48 ч до полного испарения растворителей. Согласно данной методике были получены пленки СПЭУ/ПГБ в соотношениях от 0/100 до 100/0 (мас%) с 10%-ным инкрементом изменения концентрации. Все растворители являлись химически чистыми.

УДК 678.01:53

МЕТОД КОНТРОЛЯ СОСТАВА ТОНКИХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ СМЕСИ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА И ПОЛИАМИДА© А. А. Ольхов^{1,2}, В. С. Маркин², Р. Ю. Косенко²,
М. А. Гольдштрах², А. Л. Иорданский²*Статья поступила 13 февраля 2015 г.*

Рассмотрено влияние способа смешения (в общем растворителе и в расплаве с помощью обогреваемых валцов с фрикционной муфтой) полигидроксibuтирата и полиамида на их диспергирование. Предложен неразрушающий метод контроля состава тонких пленок смесей полигидроксibuтирата и полиамида с использованием ИК-Фурье-спектроскопии. Метод отличается высокой чувствительностью и малым количеством анализируемого образца. Экспериментально установлено, что смешение полимеров в расплаве приводит к неоднородности диспергирования полигидроксibuтирата и полиамида. При смешении в растворе диспергирование полимеров идет более однородно. Предложенный подход может быть распространен и на другие полимерные композиции.

Ключевые слова: полиамид; полигидроксibuтират; полимерные смеси; пленки; ИК-спектроскопия.

Исследовали композиции на основе следующих полимерных материалов: поли-3-гидроксibuтират производства компании Biomer (Германия) (ПГБ) и смола

полиамидная П-54С (ПА). ИК-спектры образцов в виде пленок регистрировали на ИК-спектрометре с Фурье-преобразованием Bruker IFS-48 при разрешении 2 см^{-1} и числе сканирований 15. Содержание ПГБ варьировалось от 10 до 90 % масс. Исследовали также чистые ПА и ПГБ.

¹ Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова,

Смеси композитов для приготовления пленок по-

МИКРОБИОЛОГИЯ, 2007, том 76, № 6, с. 797–804

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 579.8.017.735

**БИОСИНТЕЗ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ БАКТЕРИЯМИ
*WAUTERSIA EUTROPHA***

© 2007 г. Т. Г. Волова*, Г. С. Калачева*¹, И. В. Кожевников**, А. Штайнбюхель***

*Институт биофизики СО РАН, Красноярск

**Красноярский государственный университет

***Институт молекулярной микробиологии и биотехнологии, Мюнстер, Германия

Поступила в редакцию 26.06.2006 г.

... полимеров от ...
Анализ химической структуры выделенного и дважды переосажденного полимера выполняли аналогичным образом на хромато-масс-спектрометре. Идентификацию мономеров проводили по временам удерживания и их масс-спектрам.

□